

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 018**

51 Int. Cl.:

A01N 43/04 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2004 PCT/US2004/005896**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.09.2004 WO04078922**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2004 E 04715642 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 1664267**

54 Título: **Modulación de la expresión del receptor de la hormona de crecimiento y de IGF-I**

30 Prioridad:

28.02.2003 US 451455 P

25.07.2003 US 490230 P

26.02.2004 US 789526

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

31.01.2018

73 Titular/es:

IONIS PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)

2855 Gazelle Court

Carlsbad, CA 92010, US y

ANTISENSE THERAPEUTICS LTD (50.0%)

72 Inventor/es:

TACHAS, GEORGE;

DOBIE, KENNETH;

HEFFERNAN, MARK;

JAIN, RAVI y

BELYEA, CHRISTOPHER

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 652 018 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 de la expresión del receptor de la hormona de crecimiento y de IGF-I**Descripción****5 ÁREA DEL INVENTO**

Este invento se refiere a las composiciones y métodos para modular la expresión del receptor de la hormona de crecimiento. En particular, este invento se refiere a compuestos, particularmente compuestos de oligonucleótidos, que, en secciones importantes, se hibridan con las moléculas de ácidos nucleicos que codifican al receptor de la hormona de crecimiento. Aquellos compuestos han demostrado en este estudio que modulan la expresión del receptor de la hormona de crecimiento y también modulan la expresión del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1 - insulin-like growth factor 1) a niveles terapéuticos equivalentes en animales y humanos que son relevantes para el tratamiento de enfermedades incluyendo la acromegalia, el gigantismo, la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética, la nefropatía diabética, la diabetes, y tumores dependientes de la hormona de crecimiento y de la IGF-I. Los efectos de la modulación del receptor de la hormona de crecimiento también son relevantes para el tratamiento de la artritis y otras condiciones que involucran al receptor de la hormona de crecimiento y/o el eje de la hormona de crecimiento/del factor de crecimiento similar a la insulina. Asimismo, los compuestos antisentido dirigidos a cualquier objetivo individual o a cualquier grupo de objetivos en el de hormonas de crecimiento/factor de crecimiento similar a la insulina I, incluyendo la hormona de crecimiento, el receptor de la hormona de crecimiento, el IGF-I y el receptor del IGF-I, pueden ser utilizados en el tratamiento de las mismas condiciones.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

La hormona de crecimiento, liberada por la pituitaria, es un miembro de un grupo de hormonas que regulan el crecimiento del cuerpo y sus órganos. La secreción de la hormona de crecimiento a la sangre es seguida por enlaces al receptor de la hormona de crecimiento (GHR - growth hormone receptor) en muchos tipos de células y órganos. La señalización de la hormona de crecimiento es mediada por esta interacción. La señalización de la hormona de crecimiento causa la producción de otra hormona, el factor de crecimiento similar a la insulina I (OGF-I o IGF-1 - insulin-like growth factor-I), el cual es producido en el hígado, el tejido adiposo y en el riñón y es secretado a la corriente sanguínea. Alrededor de 75% del IGF-I sérico es producido en el hígado en respuesta a la estimulación de la hormona de crecimiento. Muchas enfermedades son causadas por, y/o asociadas con, niveles elevados de la hormona de crecimiento y/o niveles elevados del IGF-1 en el plasma y/o en tejidos incluyendo a la acromegalia, al gigantismo, a la retinopatía, a la degeneración macular, a la nefropatía, a la diabetes y cánceres. Este rol del IGF-I en la mediación de muchos efectos de la hormona de crecimiento es bien reconocido y la interacción es referida como un eje de la hormona de crecimiento/del factor de crecimiento similar a la insulina-I. En un circuito normal de retroalimentación, el IGF-I también causa que se reduzca la producción de la hormona de crecimiento por la pituitaria.

La hormona de crecimiento es producida y secretada por un conjunto de células especializadas en la pituitaria frontal. La hormona de crecimiento tiene efectos directos e indirectos en muchos tejidos, tales como la estimulación ósea y el crecimiento de tejido suave y la influencia al metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos. Actividades biológicas directas de la hormona de crecimiento incluyen al enlace de receptores, la internalización del complejo hormonal/receptor, y la activación de proteínas involucradas en la transducción de señales.

Las transcripciones proteínicas y de ARN para los receptores de la hormona de crecimiento (GHR - receptors of growth hormone) han sido detectadas en muchos de los tejidos influenciados por la hormona. Se determinó que una sola molécula de la hormona de crecimiento enlaza secuencialmente a 2 moleculares receptoras, formando un complejo activo. Éste complejo, a su vez, señala la estimulación de otros genes, incluyendo al IGF-I. El IGF-I que es producido y secretado por el hígado y otros tejidos objetivos, regula algunos de los efectos indirectos de la hormona de crecimiento en el crecimiento y el desarrollo. Otros eventos intracelulares que ocurren después de la interacción de la hormona de crecimiento/receptor de la hormona de crecimiento incluyendo la activación de quinasas de tirosina tales como la quinasa de Jano 2 (Jak-2 - Janus kinase 2), que conlleva a la fosforilación y a la activación de otras proteínas incluyendo al transductor de señales y al activador de las transcripciones 5A y 5B (STAT 5A y 5B) y la quinasa proteínica activada por mitógenos (MAP - mitogen activated protein) que, a su vez, activa otras proteínas y genes.

La ADNc que codifica al receptor de la hormona de crecimiento ha sido clonada para muchas especies. El receptor consiste de una región extracelular enlazadora de hormonas (exón 2-7), una sola membrana que se extiende por la región (exón 8), y una región intracelular (exones 9-10). Existen también regiones múltiples alternas no interpretadas de 5' que son los primeros exones alternos del gen, en las transcripciones humanas y de ratones. El receptor de la hormona de crecimiento no tiene un dominio intrínseco de quinasas, pero la región intracelular juega un rol importante en el proceso de transducción de señales. Una forma truncada del receptor, conocida como la proteína de enlace de la hormona de crecimiento (GHBP - growth hormone binding protein), no tiene las regiones

de la membrana e intracelulares del receptor de la hormona de crecimiento y es secretada al suero. La proteína truncada es producida por 1 o 2 procesos diferentes, dependiendo de la especie animal. En ratones y ratas, un empalme alternativo del ARN mensajero del precursor del receptor de la hormona de crecimiento reemplaza a las regiones de la membrana e intracelulares con una cola hidrofílica muy corta (codificada por el exón 8A; 15, 16).
 5 En los humanos, las vacas y los cerdos (entre otros) ningún empalme alternativo de ARN es aparente, pero en vez de eso la GHBP es producida por la proteólisis del receptor de la hormona de crecimiento. La función de la proteína de enlaces parece ser el modular del nivel de la hormona de crecimiento circulante.

10 El receptor de la hormona de crecimiento es expresado en muchos órganos y tejidos incluyendo al hígado, al tejido adiposo, al músculo, al cartílago, a los huesos, a los dientes, al riñón, a los ojos, al sistema cardiovascular, a los intestinos, a los órganos reproductivos, a la piel, al cerebro, al sistema endocrino y al sistema inmunológico.

15 Se ha establecido la estructura tridimensional del dominio extracelular del receptor de la hormona de crecimiento. Consiste de 2 módulos, cada uno de alrededor de 100 aminoácidos, colocados en forma de 2 emparedados cada uno con 7 hebras de láminas beta. La forma secretada del dominio extracelular del receptor de la hormona de crecimiento es la GHBP.

20 El receptor de la hormona de crecimiento es biológicamente responsivo a la estimulación de la hormona de crecimiento. La JAK2 es la molécula activadora principal para la señalización del receptor de la hormona de crecimiento. La JAK2 es activada después de la dimerización del receptor de la hormona de crecimiento. Cuando la hormona de crecimiento dimeriza a sus receptores, las JAKs son juntadas, y con una alineación apropiada se transfosforilatan entre sí, conllevando a su activación completa. Los objetivos intracelulares de las JAKs incluyen a residuos de tirosina en el dominio citoplásmico receptor en sí, el cual a su vez activa a los dominios SH2 (STATs, Shc y SHP2). Esto podría continuar hasta activar al sendero de quinasas MAP, que regula a la proliferación celular.
 25 Las JAK2s también fosforilizan y activan otras moléculas de señalización, tales como el IRS-1 y -2 y la quinasa de 3-inositol de fosfatidilo, que son partes importantes del mecanismo de señalización de la insulina y pueden explicar las acciones similares a la insulina de la hormona de crecimiento. Los JAK2s activados también fosforilizan a los STAT5, y cuando son activados, se involucran en la transcripción de varios genes.

30 La activación del receptor de la hormona de crecimiento conlleva a muchas acciones en muchos órganos incluyendo a los siguientes resultados en los siguientes órganos:

35 El hígado: se incrementa la secreción del factor de crecimiento similar a la insulina-I, la síntesis de proteínas del plasma, la regulación de las enzimas de balance del nitrógeno, una síntesis/almacenamiento incrementado de carbohidratos, y una descomposición incrementada de las grasas; el tejido adiposo: una descomposición de los almacenamientos grasos; el músculo: una síntesis incrementada de proteínas, una descomposición proteínica reducida; el cartílago: una altura incrementada por la proliferación incrementada y la diferenciación de condrocitos en el cartílago de crecimiento; los huesos y los dientes: una rotación incrementada del tejido, una síntesis y una descomposición incrementada; los riñones: una retención incrementada del sodio, del bicarbonato y del agua; los ojos: una neovascularización retinal incrementada; el sistema cardiovascular: hipertrofia, una contractilidad, fuerza de latidos y caudales cardiacos incrementados; los intestinos: hipertrofia, absorción incrementada de aminoácidos, sodio, calcio, fosfato y B12; sistema reproductivo: una producción y motilidad de esperma incrementada, una secreción incrementada de la glándula adicional en los hombres, un número incrementado de folículos y de la tasa de ovulación, una tasa incrementada de la maduración folicular, una producción de leche incrementada; la piel: un grosor y fortaleza incrementada de la piel, un crecimiento y grosor incrementado del cabello; el cerebro: una proliferación y conectividad neuronal prenatal incrementada, una formación incrementada de mielinas, una memoria mejorada a largo plazo; sistema endocrino: una síntesis y secreción incrementada de la insulina, una esteroidogénesis adrenal incrementada; el sistema inmunológico: una proliferación incrementada de las células inmunológicas, una eliminación incrementada por parte de los monocitos, los macrófagos y las células NK, una producción incrementada de anticuerpos.

60 Corriente abajo del receptor de la hormona de crecimiento en el sendero de señalización de la hormona de crecimiento se encuentran el IGF-I y el receptor de IGF-I. Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) son importantes en la proliferación. En particular, el IGF-I y el IGF-2 son polipéptidos ubicuos cada uno con efectos mitogénicos potentes en un amplio rango de células. Las moléculas de tipo factor de crecimiento similar a la insulina también son conocidas como "factores de progresión" que promueven a células "competentes" a través de la síntesis del ADN. Los factores de crecimiento similares a la insulina actúan a través de un receptor conocido como el receptor de tipo I o IGF-IR, que es vinculado por la quinasa de tirosina.

65 Proteínas particulares, denominadas proteínas enlazadoras del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBPs- insulin-like growth factor binding proteins), parecen estar involucradas en la regulación autocrítica/paracrina de la disponibilidad del factor de crecimiento similar a la insulina de los tejidos (Rechler y Brown, Growth Regulation, 1992,2, 55-68). 6 IGFBPs han sido identificados hasta el momento. Los efectos exactos de los IGFBPs todavía no son claros y efectos observados in vitro han sido inhibitorios o estimuladores dependiendo

del método experimental utilizado (Clemmons, Growth Regn. 1992, 2, 80,). Existe alguna evidencia, sin embargo, que ciertos IGF-BPs están involucrados en la dirección del factor de crecimiento similar a la insulina I hacia su receptor superficial celular. También la expresión del IGF-BP-3 es regulada por la hormona de crecimiento (Karen et al, mencionado anteriormente).

5 La IGF-IR es un receptor superficial celular vinculado a la quinasa de tirosina (Ullrich et al., EMBO J. 1986, 5, 2503-2512,) que regula la división, la transformación y la apoptosis celular en muchos tipos celulares (LeRoith et al., Endocr. Rev., 1995, 16, 143-163; Rubin y Baserga, Laboratory Investigation (investigación de laboratorio), 1995, 73, 311-331).

10 Si la regulación de la retroalimentación de la producción de la hormona de crecimiento se pierde y la pituitaria continúa liberando montos aberrantes de la hormona de crecimiento, el nivel del factor de crecimiento similar a la insulina I continuará elevándose, conllevando a un crecimiento óseo y crecimiento de los órganos. Un exceso de la hormona de crecimiento también causa cambios en el metabolismo del azúcar y de los lípidos, que
15 podría conllevar a la diabetes. Defectos en los senderos de señalización de la hormona de crecimiento a menudo conlleva a anomalías de tamaño de estatura, de cuerpo y/u órganos. Mutaciones en el gen del receptor de la hormona de crecimiento resultan en estaturas extremadamente cortas (el síndrome de Laron). Una producción excesiva de la hormona de crecimiento puede conllevar a una acromegalia o gigantismo.

20 La acromegalia y el gigantismo son enfermedades relacionadas de crecimiento donde un exceso de la hormona de crecimiento, a veces causado por un tumor pituitario, causa una desfiguración cosmética progresiva y manifestaciones de órganos sistémicos. Afecta a 40-50 personas por cada millón a nivel mundial con alrededor de 15,000 personas que lo padecen en cada uno de los Estados Unidos y Europa y una incidencia anual de alrededor de 4-5 por cada millón. Es caracterizado inicialmente por un crecimiento anormal de las manos y de los pies y
25 cambios óseos en las características faciales. Los pacientes tienen una calidad de vida reducida con el hipercrecimiento de la quijada, alargamiento de los pies y de las manos, engrosamiento de la voz, engrosamiento de la piel, olor corporal ofensivo, problemas articulares de los cartílagos, hiperfosfatemia, neuropatías periféricas, presión sanguínea elevada, diabetes, enfermedades cardíacas y el cáncer, y tienen expectativas de vida reducidas si no se trata. La tasa de mortalidad es de alrededor de 2 veces la de la población normal debido a enfermedades cardio -
30 respiratorias y cardiovasculares, la diabetes y la neoplasia, particularmente el cáncer del colon. El objetivo de los tratamientos actuales es revertir los efectos de la hipersecreción de la hormona de crecimiento y normalizar la producción del IGF-I que tiene una elevación de alrededor del 50% en estos pacientes. Cuando un tratamiento es efectivo, se moderan los síntomas de la enfermedad y la mortalidad asociada con la enfermedad.

35 El gigantismo, la enfermedad de un exceso de hormona de crecimiento en los niños, es una enfermedad rara. En el gigantismo, un crecimiento lineal excesivo ocurre mientras los ligamentos de crecimiento están abiertos durante la niñez con un exceso de hormona de crecimiento causado por medio de un tumor pituitario benigno. En el gigantismo y la acromegalia, todos los parámetros de crecimiento son afectados, aunque no necesariamente simétricamente. Muchos de los resultados relacionados con el crecimiento son mediados por niveles elevados del
40 IGF-I sérico. Los niveles sanguíneos séricos del IGF-I son elevados en alrededor de un 50% en los pacientes y la reducción del IGF-I sérico es utilizado para monitorear el éxito del tratamiento.

Los tratamientos para la acromegalia y el gigantismo involucran la capacidad de reducir al IGF-I elevado en el plasma. Esto podría lograrse por medio de una remoción quirúrgica o terapia de radiación en el tumor pituitario
45 benigno, pero esto sólo es efectivo en el 50% de los pacientes. Agonistas de dopamina tales como mesilato de bromocriptina o cabergolina podrían administrarse oralmente lo cual es conveniente pero estas solo reducen la producción de la hormona de crecimiento y son asociadas suficientemente por la IGF-I en un 10% de los casos. Éstas producen además efectos colaterales gastrointestinales y centrales significativos en el 20-30% de los pacientes. También se usa en el tratamiento de la acromegalia a los análogos de somatostatina tales como la Sandostatina o el octreótido, que inhiben la liberación de la hormona que libera a la hormona de crecimiento (GHRH -
50 growth hormone releasing hormone) desde el hipotálamo, y/o la pituitaria y por lo tanto reduce la producción de la hormona de crecimiento en la pituitaria. Este compuesto es efectivo en el 60-65% de los pacientes con acromegalia, pero debe ser inyectada bajo la piel cada 8 horas o intramuscularmente para un tratamiento efectivo.

55 Recientemente un antagonista del receptor de la hormona de crecimiento, Trovert, también conocido como Somavert, Pegvisomant y B2036- PEG, ha demostrado ser efectiva en ensayos clínicos en un 90-95% de los pacientes. La experiencia de ensayos clínicos a la fecha demuestra una tasa de un 10% de abandonos y efectos adversos tal como la inhabilitación del hígado. Trovert es una molécula de la hormona de crecimiento con una
60 sustitución de 9 aminoácidos con 4-5 pegilaciones para incrementar la vida media. Al igual que todas las proteínas modificadas, esta es inmunogénica, creándose anticuerpos para Trovert en el primer mes de administración. Esto puede afectar la utilidad a corto y largo plazo de Trovert y dificulta el pronóstico de sus dosis. Trovert fue administrado inicialmente una vez al mes por medio de una administración subcutánea (sc), pero la práctica clínica actual sugiere que se necesitarán dosis una vez al día subcutáneamente. Trovert interfiere con los enlaces de la hormona de crecimiento a su receptor, pero no al fragmento de la proteína enlazadora de la hormona de crecimiento
65 (GHBP - Growth Hormone Binding Protein) del receptor de la hormona de crecimiento. La GHBP enlaza a la

hormona de crecimiento y prolonga su acción, lo cual puede ser desventajoso en condiciones que involucran a excesos de la hormona de crecimiento y/o excesos del IGF-I. La pegilación también podría afectar el perfil de seguridad a largo plazo de Trovert.

5 La diabetes y sus complicaciones que amenazan la vida tales como la retinopatía y la nefropatía diabéticas también son enfermedades asociadas con los niveles de la hormona de crecimiento y/o del IGF-I. El tratamiento de primera línea de estas condiciones involucra controlar a la hiperglicemia. Medicamentos que controlan la diabetes reducen la incidencia de la nefropatía por un 60% y también reducen la incidencia de la retinopatía. Sin embargo, alrededor de la mitad de todos los diabéticos no están conscientes de la enfermedad y por lo tanto se mantienen sin tratamiento, por lo que la nefropatía y la retinopatía diabéticas tienen la posibilidad de permanecer siendo una condición importante donde se requieren otros tratamientos. En la retinopatía, se utilizan tratamientos ablativos quirúrgicos de tales como la fotocoagulación pan-retinaria por medio de láser, pero esto permanece siendo incompletamente efectivo y destruye al tejido retinal, causando una pérdida parcial del campo de la visión. En los diabéticos de tipo I, ACE y todos los inhibidores reducen la expresión de albuminuria al actuar en el riñón y en los diabéticos de tipo II los mismos inhibidores actúan localmente en el riñón y también reducen la presión sanguínea para reducir el riesgo de muerte por falla de riñones por otro 50%. Sin embargo, el 20-30% de pacientes permanecen resistentes al tratamiento con medicamentos actuales de control glucémico y medicamentos ACE. Existe por lo tanto una necesidad de mejores tratamientos.

20 La causa principal de la diabetes, de la retinopatía diabética y de la nefropatía diabética puede ser la hiperglicemia relacionada con la insulina, pero un exceso de la hormona de crecimiento y/o del factor de crecimiento similar a la insulina-I también es importante. Inhibidores octreótidos de la GHRH que reducen la producción de la hormona de crecimiento pituitaria, reduciendo esa forma los niveles sistémicos de la hormona de crecimiento y del IGF-I, y/o los niveles moduladores de tejidos locales muestran un potencial en los aspectos clínicos. Un estudio con octreótidos por Grant et al., (Diabetes Care (Atención Diabética), 2000,2, 504-9) que redujo al sIGF-1 × un 51% con dosis toleradas al máximo de 5000 µg/día subcutáneamente de octreótidos redujo la necesidad de cirugía por medio de láser en pacientes de retinopatía a un paciente de 22 pacientes en vez de 9/22 pacientes a los que se administró un placebo en un estudio de 15 meses. Además, una enfermedad ocular fue reducida al 27% versus el 42% de los pacientes que estaban recibiendo placebos lo cual alcanza a ser significativo (P 0.06). 3 estudios humanos utilizando octreótidos a niveles que redujeron al sIGF1 en alrededor de un 45%, alrededor de un 20% y alrededor de un 10% respectivamente fueron efectivos por lo menos parcialmente en ensayos clínicos de nefropatía. Los resultados reportados por Serin et al., (JAMA, 1991, 265, 888-92) con 11 pacientes usaron dosis altas de octreótidos en un estudio de 12 semanas que redujeron al IGF-I sérico por un 45%. En ese momento se declaró que se observó que tuvo un mejor efecto para reducir la tasa de filtraciones glomerulares con una reducción del 22-33% en relación al grupo que estaba tomando placebos. Esta dosis, sin embargo, estaban cerca del nivel máximo tolerado de octreótidos.

40 Estudios animales de modelos patológicos con octreótidos y con Trovert también apoyan la perspectiva de que agentes que modulan al eje de la hormona de crecimiento / factor de crecimiento similar a la insulina-I son beneficiosos para el tratamiento de estas condiciones diabéticas. La hormona de crecimiento y su receptor están implicados en la inducción de la hipertrofia glomerular y la esclerosis en la nefrectomía parcial y la nefropatía diabética con inhibidores de somatostatina octreótidos y de PTR-3173 (Groenbaek et al., J. Endocrinol., 2002, 172, 637-643 y Landau et al., Kidney International (Riñón, Internacional), 2001, 60, 505-512) y el antagonista del receptor de la hormona de crecimiento, G120K-PEG, una versión más débil de Trovert, previniendo complicaciones en ratones diabéticos de tipo I y de tipo II (Chen et al., Endocrinology (Endocrinología), 1996, 137, 11, 5136-5165; Flyvbjerg et al., Diabetes, 1999, 40,377-382, y Segev et al., J. Am. Soc. Nephrol. 1999, 10,2374-81). La hormona de crecimiento y su receptor están implicados en la inducción de una neovascularización a través del IGF-I con octreótidos y antagonistas del receptor de la hormona de crecimiento MK678 que son inhibidores de la somatostatina, inhibiendo una neovascularización en ratones. La reducción de MK678 de la neovascularización se correlacionó con un bajo IGF-I sérico Smith et al, Science (Ciencia), 1997, 276, 1706-9). La retinopatía inducida por el oxígeno en el ratón también fue responsiva a los octreótidos tal como se reportó por Higgins et al., Exp. Eye (Ojo) Res, 2002, 74,553-9.

55 La degeneración macular también es asociada con los niveles elevados de la hormona de crecimiento y/o del IGF-I. Una degeneración macular relacionada con la edad (AMD - Age-related macular degeneration) es causada por el deterioro de la parte central de la retina, la mácula, lo cual resulta en la pérdida de la visión detallada. La AMD húmeda, una forma menos común, es causada por una fuga proveniente de los nuevos vasos sanguíneos que crecen atrás de la retina. El eje de la hormona de crecimiento / IGF-I está involucrado en la formación de nuevos vasos sanguíneos que son relevantes a esta condición y a la retinopatía diabética.

60 Varios cánceres también son asociados con niveles aberrantes de la hormona de crecimiento y/o del IGF-I. La reducción del IGF-I sérico por un 20-50% utilizando Trovert redujo el volumen tumoral en el cáncer de la mama en modelos animales y ayudó en el cáncer del colon, en la metástasis del hígado y en meningiomas (Friend et al., Proceedings 11th NCI EORTC. AACR Symposium (Simposio AACR) y Friend, Growth Horm. (Hormona de Crecimiento) IGF Res., 2001, Jun: 11 Suppl A: S121-3). La incidencia de cánceres de la mama, del colon, de la

próstata y de los pulmones es incrementada en individuos con un alto rango normal del IGF-I sérico. No han habido estudios clínicos con Trovert en cánceres. Sin embargo, se receta a octreótidos para cánceres gastro-pancreáticos.

5 Otras condiciones que podrían ser asociadas con niveles elevados de la hormona de crecimiento y/o del IGF-I incluyen a la artritis reumatoide. Un estudio clínico piloto demostró que los octreótidos fueron útiles para el tratamiento de la artritis reumatoide refractaria en un subconjunto de pacientes (Paran et al., Ann. Rheum. Dis., 2001, 60, 888-91. Con comentarios y respuestas del autor en Ann. Rheum. Dis., 2002, 61, 1117).

10 La longevidad también podría mejorarse al modular al receptor de hormona de crecimiento (Coschigano et al., Endocrinology (Endocrinología), 2000, 241, 2608-2613). Existió un incremento significativo de la duración de vida de cerca de un año en animales knockout con niveles bajos de IGF-I y niveles altos de la hormona de crecimiento.

15 Otra aplicación de la modificación de los niveles de la hormona de crecimiento y/o del IGF-I por medio del receptor de la hormona de crecimiento puede permitir la diferenciación de células madre hacia una producción de células neurales puesto que la hormona de crecimiento inhibe la diferenciación neuronal de las células progenitoras neurales (Turnley et al., Nature Neuroscience (Neurociencia Natural), 7 de octubre de 2002, publicado en el Internet). Otras aplicaciones serán conocidas para aquellas personas con conocimiento normal en la técnica.

20 Aunque los roles principales en varias enfermedades o condiciones podrían ser diferentes, las condiciones ya mencionadas surgen, por lo menos en parte, de factores sistémicos y/o locales provenientes de niveles incorrectos de la expresión de la hormona de crecimiento y del IGF-I de crecimiento y/o sus receptores, el receptor de la hormona de crecimiento y el IGF-IR. En estas situaciones, los agonistas de la dopamina, los agonistas de la somatostatina, y los antagonistas del receptor de la hormona de crecimiento dirigidos a las proteínas han sido utilizados y/o han demostrado potencial.

25 Mientras que una gama de tratamientos se ha desarrollado para agentes que modifican el eje de la hormona de crecimiento/factor de crecimiento similar a la insulina, y el receptor de la hormona de crecimiento y el IGF-IR, ninguno es completamente efectivo y/o libre de efectos colaterales adversos. Además, existen desventajas potenciales en las rutas y/o frecuencia de administración que pueden afectar su cumplimiento.

30 Existe, por lo tanto, un objetivo de esta presentación para suministrar productos y composiciones nuevas donde uno o más de los problemas y limitaciones que se acaban de mencionar puedan aliviarse.

35 En la última década, han existido informes del uso de oligonucleótidos antisentido para explorar la función genética y varios reportes en el desarrollo de medicamentos que se basan en ácidos nucleicos. Los oligonucleótidos antisentido que inhiben a la interpretación del ARNm por medio de varias formas alternas incluyendo la destrucción del ARNm objetivo a través del reclutamiento de la ribonucleasa H, o la interferencia con el procesamiento, la exportación nuclear, el plegamiento o la detección de ribosomas del ARN.

40 Pellegrini et al. intentó bloquear la síntesis de receptor de la hormona de crecimiento en el sistema nervioso central al infundir intracerebroventricularmente un oligonucleótido antisentido 18-mer que es complementario a una porción de la secuencia codificadora del ARNm del receptor de la hormona de crecimiento de la rata superponiendo al codón de iniciación de la interpretación J. Neurosci. 1996, 16, 8140-8148.

45 Este invento tal como se expone en este documento por primera vez, demuestra que un oligonucleótido antisentido dirigido específicamente al receptor de la hormona de crecimiento reduce un parámetro clínico de la actividad de la hormona de crecimiento, específicamente el factor de crecimiento similar a la insulina-I sérico. En una forma importante, nuestros estudios antisentido explican la capacidad para utilizar antisentidos en el receptor de la hormona de crecimiento para reducir al factor de crecimiento similar a la insulina-I sérico a niveles similares a los requeridos para el tratamiento clínico de gigantismo y acromegalia. Los niveles séricos del factor de crecimiento similar a la insulina-I son elevados en los pacientes que tienen acromegalia y reducidos por medio de dosis terapéuticas humanas de Trovert por un 50% en ambos estudios de 12 semanas (Trainer et al, The New England J of Med (la Revista de Nueva Inglaterra de Medicina) 20 de abril de 2000) que muestra una reducción de 1.3 a 2 veces, y en estudios a largo plazo superiores a un año tal como se informó por van der Lely et al., Lancet 2001, 24 de noviembre: 358 (9295) 1754-1759.

50 Niveles similares de reducción del factor de crecimiento similar a la insulina-I sérico también fueron reportados con ensayos clínicos de retinopatía diabética de 15 meses con octreótidos (Grant et al, mencionado anteriormente) y ensayos clínicos de nefropatía diabética (Serri et al, *mencionado anteriormente*). Niveles similares de reducción del 20-50% también son suficientes como para prevenir el crecimiento de ciertos tipos de cánceres en modelos animales (Friend, mencionado anteriormente).

65 Este invento enseña por primera vez que el antisentido del receptor de la hormona de crecimiento puede lograr resultados terapéuticos equivalentes en humanos y animales. Enseña que el antisentido al ARNm de un componente del eje hormona de crecimiento / factor de crecimiento similar a la insulina-I, específicamente al

receptor de la hormona de crecimiento, puede afectar un parámetro en el eje, por ejemplo, el IGF-I. En una forma importante, enseña que los anti sentidos dirigidos a cualquier otro objetivo en el eje de la hormona de crecimiento / factor de crecimiento similar a la insulina-I es potencialmente capaz de lograr niveles terapéuticos en condiciones que dependen de niveles excesivos de la hormona de crecimiento y del factor de crecimiento similar a la insulina-I.

5

RESUMEN DEL INVENTO

El invento proporciona un oligonucleótido dirigido a una molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de la hormona de crecimiento humana, en donde la secuencia de base nitrogenada de dicho oligonucleótido consiste de las IDENTIFICACIONES SECUENCIALES NÚMEROS: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 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, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 93 o 94, en donde los vínculos internucleosídicos de dicho oligonucleótido se modifican, y en donde dicho oligonucleótido hibrida específicamente con dicha molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de la hormona de crecimiento e inhibe la expresión del receptor de la hormona de crecimiento.

15

En este documento se presentan compuestos, especialmente ácidos nucleicos u oligómeros similares a ácidos nucleicos, que son dirigidos a un ácido nucleico que codifican al receptor de la hormona de crecimiento, y que modulan la señalización de la hormona de crecimiento o el eje hormona de crecimiento / factor de crecimiento similar a la insulina-I, particularmente a la expresión del receptor de la hormona de crecimiento y/o el factor de crecimiento similar a la insulina-I. Además, se presentan métodos para la detección de moduladores del receptor de la hormona de crecimiento y/o el factor de crecimiento similar a la insulina-I y métodos para modular la expresión del receptor de la hormona de crecimiento y/o el factor de crecimiento similar a la insulina-I en células, tejidos o animales que comprende de contactar a dichas células, tejidos o animales con uno o más de los compuestos o composiciones de la especificación. Se presentan también a Métodos y botiquines de diagnóstico. Los métodos para el tratamiento de un animal, particularmente un humano, que se sospecha que tiene o que es propenso a una enfermedad o condición asociada con la señalización de la hormona de crecimiento o el eje hormona de crecimiento / factor de crecimiento similar a la insulina-I, particularmente la expresión del receptor de la hormona de crecimiento y/o el factor de crecimiento similar a la insulina-I, también se presentan en este documento.

20

25

30

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

A. Visión general del Invento

Este invento utiliza oligonucleótidos para su uso en la modulación de la función o del efecto de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican al receptor de la hormona de crecimiento. Esto se logra al suministrar oligonucleótidos que se hibridan específicamente con una o más moléculas de ácidos nucleicos que codifican al receptor de la hormona de crecimiento. Tal como se utiliza en este documento, los términos "ácido nucleico objetivo" y "molécula de ácidos nucleicos que codifican al receptor de la hormona de crecimiento" han sido utilizados para la conveniencia de abarcar al ADN que codifica al receptor de la hormona de crecimiento, al ARN (incluyendo al pre-ARNm y al ARNm o sus porciones (incluyendo a las regiones codificadoras y no codificadoras), la transcripción de aquel ADN, y también a la ADNc entregada de aquel ARN. La hibridación de un compuesto para su uso en este invento con su ácido nucleico objetivo se denomina, generalmente, como "antisentido". Consecuentemente, el mecanismo preferido que se cree es incluido en la práctica de algunas secciones importantes del invento se denomina en este documento como la "inhibición antisentido". Aquella inhibición antisentido se basa comúnmente en una hibridación que se basa en enlaces de hidrógeno de hebras de oligonucleótidos o segmentos de tal forma que por lo menos un hebra o segmento es dividida, degradada o deshabilitada de cualquier otra forma. En este aspecto, actualmente se prefiere usar como objetivo a moléculas específicas de ácidos nucleicos y sus funciones para aquella inhibición antisentido.

35

40

45

50

Las funciones del ADN que van ser interferidas pueden incluir la replicación y la transcripción. La replicación y la transcripción, por ejemplo, pueden ser de una plantilla celular endógena, un vector, una estructura de plásmidos o de otro tipo. Las funciones del ARN que serán interferidas pueden incluir a funciones tales como la translocación del ARN a un lugar de interpretación proteínica, la translocación del ARN a lugares dentro de la célula que están distantes del lugar de la síntesis del ARN, la interpretación de proteínas del ARN, el empalme del ARN para generar una o más especies de ARN, y la actividad catalítica o formación de complejos que involucra al ARN que podría interactuar en, o ser facilitado por, el ARN. Un resultado preferido de aquella interferencia con la función del ácido nucleico objetivo es modular la expresión del receptor de la hormona de crecimiento. En el contexto de esta especificación, una "modulación" y una "modulación de la expresión" significa ya sea un incremento (estimulación) o una reducción (inhibición) en el monto o niveles de una molécula de ácido nucleico que codifica al gen, por ejemplo, el ADN o el ARN. La inhibición es a menudo la forma preferida de modulación de la expresión y el ARNm es a menudo un ácido nucleico objetivo preferido.

55

60

En el contexto de esta especificación, la "hibridación" significa el emparejamiento de hebras complementarias de compuestos oligoméricos. En esta especificación, el mecanismo preferido de emparejamiento

65

involucra a enlaces de hidrógeno, que podrían ser enlaces de hidrógeno tipo Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen en reversa, entre nucleósidos complementarios o bases de nucleótidos (bases nitrogenadas) de las hebras de los compuestos oligoméricos. Por ejemplo, la adenina y la timina son bases nitrogenadas que se emparejan a través de la formación de enlaces de hidrógeno. La hibridación puede ocurrir bajo varias circunstancias.

5

Un compuesto antisentido es capaz de hibridarse específicamente cuando enlaces del compuesto a los ácidos nucleicos objetivo interfiere con la función normal del ácido nucleico objetivo para causar una pérdida de la actividad, y existe un nivel suficiente de complementariedad para evitar enlaces no específicos del compuesto antisentido a secuencias no objetivo de ácidos nucleicos bajo condiciones en las cuales enlaces específicos son deseados, es decir, bajo condiciones fisiológicas, en el caso de ensayos in vivo, o de tratamientos terapéuticos, y bajo condiciones en las cuales los ensayos son realizados, en el caso de ensayos in vitro.

10

En esta especificación, la frase "condiciones estrictas de hibridación" o "condiciones estrictas" se refiere a condiciones bajo las cuales un compuesto para su uso en el invento se hibridará con su secuencia objetivo, pero se hibridará mínimamente con otras secuencias. Las Condiciones estrictas dependen de las secuencias y serán diferentes en circunstancias diferentes y en el contexto de esta especificación, las "condiciones estrictas" bajo las cuales los compuestos oligoméricos se hibridarán a una secuencia objetivo son determinadas por la naturaleza y la composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos en los cuales se están investigando.

15

20

El término "complementario", tal como se utiliza en este documento, se refiere a la capacidad para un emparejamiento preciso entre 2 bases nitrogenadas de un compuesto oligomérico. Por ejemplo, si una base nitrogenada en una cierta posición de un oligonucleótido (un compuesto oligomérico), es capaz de enlaces de hidrógeno con una base nitrogenada en cierta posición de un ácido nucleico objetivo, siendo dicho ácido nucleico objetivo una molécula de ADN, de ARN o de oligonucleótidos, entonces la posición de los enlaces de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico objetivo es considerada como una posición complementaria. El oligonucleótido y la molécula adicional de ADN, ARN o de oligonucleótidos son complementarias entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias en cada molécula es ocupada por bases nitrogenadas que pueden enlazarse con el hidrógeno entre sí. Por lo tanto, el término "capaz de hibridarse específicamente" y "complementario" son usados para indicar un nivel suficiente de emparejamiento preciso o complementariedad sobre un número suficiente de bases nitrogenadas para que enlaces estables y específicos ocurran entre el oligonucleótido y un ácido nucleico objetivo.

25

30

Se entiende en la técnica que la secuencia de un compuesto antisentido no necesita ser 100% complementario a aquella de su ácido nucleico objetivo con el cual es capaz de hibridarse específicamente. Además, un oligonucleótido podría hibridarse sobre uno o más segmentos de tal forma que los elementos intervenidos o adyacentes no se involucran en el evento de la hibridación (por ejemplo, una estructura tipo circuito o una estructura tipo horquilla). Se prefiere que los compuestos antisentido aquí presentados comprendan por lo menos el 70% de la complementariedad secuencial a una región objetivo dentro del ácido nucleico objetivo, y más preferiblemente que comprendan el 90% de la complementariedad secuencial y aún más preferiblemente que comprendan el 95% de la complementariedad secuencial de la región objetivo dentro de la secuencia del ácido nucleico objetivo al cual están dirigidas. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el cual 18 de 20 bases nucleótidos del compuesto antisentido son complementarias a una región objetivo, y por lo tanto, se hibridan específicamente, representando una complementariedad del 90%. En este ejemplo, las bases nitrogenadas restantes que no son complementarias podrían aglutinarse o entremezclarse con bases nitrogenadas complementarias y no necesitan ser contiguas entre sí o contiguas a bases nitrogenadas complementarias. Como tal, un compuesto antisentido que tiene una longitud de 18 bases nitrogenadas tiene 4 (cuatro) bases nitrogenadas no complementarias que están rodeadas por 2 regiones de complementariedad completa con una complementariedad general del 77.8 por ciento con el ácido nucleico objetivo y, por lo tanto, caería dentro del enfoque de esta presentación. La complementariedad porcentual de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico objetivo puede determinarse rutinariamente utilizando los programas BLAST (basic local alignment search tolos - herramientas de búsqueda de alineación local básicas) y los 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).

35

40

45

50

55 **B. Compuestos del invento**

De acuerdo a esta especificación, los compuestos incluyen compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de orientación externa (EGS - external guide sequence), empalmadores alternos, cebadores, sondas y otros compuestos oligoméricos que se hibridan a por lo menos una porción del ácido nucleico objetivo. Como tal, éstos compuestos pueden ser introducidos en la forma de compuestos oligoméricos de una sola hebra, de doble hebras, circulares o tipo horquilla y podrían contener elementos estructurales tales como protuberancias o circuitos internos o terminales. Una vez introducidos a un sistema, los compuestos para su uso en el invento podrían provocar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar modificaciones del ácido nucleico objetivo. Un ejemplo no limitante de una enzima como estas es la ribonucleasa H, una endonucleasa celular que divide a la hebra de ARN de un dúplex de ARN:ADN. Se

60

65

5 conoce en la técnica que compuestos antisentido de una sola hebra que son “similares al ADN” provocan a la ribonucleasa H. La activación de la ribonucleasa H, por lo tanto, resulta en una división del ARN objetivo, mejorando, por lo tanto, en una gran forma, a la eficiencia de la inhibición mediada por oligonucleótidos de la expresión genética. Roles similares han sido postulados para otras ribonucleasas tales como aquellas en la familia enzimática de la ribonucleasa III y la ribonucleasa L.

10 Mientras que la forma preferida de compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido de una sola hebra, en muchas especies la introducción de estructuras de doble hebra, tales como moléculas de ARN de doble hebra (dsRNA - double-stranded RNA), ha demostrado inducir una reducción potente y mediada por antisentido se específicos de la función de un gen o sus productos genéticos asociados. Este fenómeno ocurre en plantas y animales y se cree que tiene una conexión evolucionaria para defensas virales y el silenciamiento de transposones.

15 La primera evidencia de que las dsARNs podría conllevar a un silenciamiento genético en animales surgió en 1995 proveniente del trabajo en la nematoda, *Caenorhabditis elegans* (Guo y Kempheus, Cell (Célula), 1995, 81, 611-620). Montgomery et al. han demostrado que los efectos primarios de interferencia de la dsARN son post-interpretación (Montgomery et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América, 1998, 95, 15502-15507). El mecanismo antisentido post-interpretación definido en el *Caenorhabditis elegans* que resulta de la exposición a ARN de doble hebra (dsRNA - double-stranded RNA) ha sido designado desde entonces como interferencia de ARN (ARNi – RNAi - RNA interference). Este término ha sido generalizado para significar un silenciamiento genético mediado por antisentidos que involucra la introducción de dsARN que conlleva a la reducción específica de secuencias de los niveles endógenos de ARNm dirigidos (Fire et al., Nature (Naturaleza), 1998, 391, 806-811). Recientemente, se ha demostrado que, en efecto, los oligómeros de ARN de una sola hebra de polaridad antisentido de los dsARNs son los inductores potentes de ARNi (Tijsterman et al., Science, 2002, 295, 694-697).

25 En el contexto de esta especificación, el término “compuesto oligomérico” se refiere a un polímero u oligómero que comprende una pluralidad de unidades monoméricas. En el contexto de esta especificación, el término “oligonucleótido” se refiere a una oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido deoxirribonucleico (ADN) o sus miméticos, quimeras, análogos y homólogos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de bases nitrogenadas que ocurren naturalmente, azúcares y vinculaciones internucleosídicas (estructurales) covalentes, así como oligonucleótidos que tienen porciones que no ocurren naturalmente que funcionan similarmente. Aquellos oligonucleótidos modificados o sustituidos son a menudo preferidos sobre las formas naturales debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, una absorción celular mejorada, una afinidad mejorada para un ácido nucleico objetivo y una estabilidad incrementada en la presencia de nucleasas.

35 Aunque los oligonucleótidos son una forma preferida de los compuestos de esta especificación, esta especificación comprende también otras familias de compuestos, incluyendo, pero sin limitarse a, análogos y miméticos de oligonucleótidos tales como aquellos aquí descritos.

40 Los compuestos de acuerdo con esta especificación comprenden preferiblemente desde alrededor de 8 a alrededor de 80 bases nitrogenadas (es decir, desde alrededor de 8 a alrededor de 80 bases nitrogenadas vinculadas). Una persona con conocimiento normal en la técnica apreciará que esto abarca compuestos con una longitud 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, 45 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, u 80 bases nitrogenadas.

50 En una realización importante, los compuestos de la especificación tienen longitudes de entre 12 a 50 bases nitrogenadas. Una persona con conocimiento normal en la técnica apreciará que los compuestos cubren longitudes de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 bases nitrogenadas.

55 En otra realización importante, los compuestos de esta especificación son de longitudes de entre 15 a 30 bases nitrogenadas. Una persona con conocimiento normal en la técnica apreciará que estos compuestos abarcan a longitudes de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 bases nitrogenadas de largo.

Los oligonucleótidos declarados tienen longitudes que van desde las 12 a las 30 bases nitrogenadas de largo.

60 Compuestos antisentido de 8-80 bases nitrogenadas de largo comprenden un tramo de por lo menos ocho (8) bases nitrogenadas consecutivas seleccionadas de las cuales los compuestos antisentido ilustrativos son considerados también como compuestos antisentido adecuados.

65 Compuestos antisentido preferidos de ejemplo incluyen a secuencias de oligonucleótidos que comprenden por lo menos las 8 bases nitrogenadas consecutivas de la terminal 5' de uno de los compuestos antisentido preferidos ilustrativos (el resto de bases nitrogenadas son un tramo consecutivo del mismo oligonucleótido que

empieza inmediatamente corriente arriba de la terminal 5' del compuesto antisentido que es capaz de hibridarse al ácido nucleico objetivo y continuar hasta que el oligonucleótido contenga alrededor de 8 a 80 bases nitrogenadas). Asimismo, compuestos antisentido preferidos son representados por secuencias de oligonucleótidos que comprenden por lo menos las 8 bases nitrogenadas consecutivas de la terminal 3' de uno de los compuestos antisentido preferidos ilustrativos (las bases nitrogenadas restantes son un tramo consecutivo del mismo oligonucleótido que empieza inmediatamente corriente abajo de la terminal 3' del compuesto antisentido que es capaz de hibridarse específicamente al ácido nucleico objetivo y continuar hasta que el oligonucleótido contenga alrededor de 8 a 80 bases nitrogenadas). Una persona que tenga conocimiento en la técnica equipada con los compuestos antisentido aquí ilustrados será capaz, sin experimentación indebida, de identificar compuestos antisentido preferidos adicionales.

C. Objetivos del Invento

"Dirigir" un compuesto antisentido a una molécula particular de ácido nucleico, en el contexto de este invento, puede ser un proceso de varios pasos. El proceso usualmente empieza con la identificación de un ácido nucleico objetivo cuya función debe modularse. Este ácido nucleico objetivo podría ser, por ejemplo, un gen celular (o un ARNm transcrito del gen) cuya expresión es asociada con un trastorno específico o estado de enfermedad, o una molécula de ácido nucleico proveniente de un agente infeccioso. En este invento, el ácido nucleico objetivo codifica al receptor de la hormona de crecimiento.

El proceso de orientación usualmente incluye además la determinación de por lo menos una región, segmento o lugar objetivo dentro del ácido nucleico objetivo para que ocurra una interacción antisentido para que resulte el efecto deseado, por ejemplo, la modulación de la expresión. Dentro del contexto de esta especificación, el término "región" se define como una porción del ácido nucleico objetivo que tiene por lo menos una estructura, función o característica identificable. Dentro de las regiones de los ácidos nucleicos objetivos existen segmentos. Los "segmentos" son definidos como regiones más pequeñas o sub-porciones de estas regiones dentro del ácido nucleico objetivo. Los "lugares", tal como se utiliza en esta especificación, se definen como posiciones dentro de un ácido nucleico objetivo.

Puesto, que el codón de iniciación de interpretación es comúnmente el 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcrito; el 5'-ATG en la molécula correspondiente de ADN), tal como es conocido en la técnica, el codón de iniciación de interpretación también es referido como el "codón AUG", el "codón inicial" o el "codón inicial AUG". Una minoría de genes tienen un codón de iniciación de interpretación que tiene la secuencia de ARN de 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG, y 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG ha demostrado funcionar in vivo. Por lo tanto, los términos "codón de iniciación de interpretación" y "codón inicial" pueden abarcar muchas secuencias de codones, aunque el aminoácido iniciador en cada instancia sea comúnmente la metionina (en eucariotas) y la formilmetionina (en procariotas). También es conocido en la técnica que los genes eucariotas y procariotas podrían tener 2 o más codones alternos de inicio, cualquiera de los cuales podría ser utilizado preferencialmente para la iniciación de interpretación en un tipo específico de célula o tejido, o bajo un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la especificación, el "codón inicial" y el "codón de iniciación de interpretación" se refiere al codón o codones que son utilizados in vivo para iniciar la interpretación de un ARNm transcrito de un gen que codifica al receptor de la hormona de crecimiento, sin importar la secuencia o secuencias de aquellos codones. También se conoce en la técnica que un codón de terminación de interpretación (o "codón de parada") de un gen podría tener una de 3 secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

Los términos "región del codón inicial" y "región del codón de inicio de interpretación" se refieren a una porción de un ARNm o gen que abarca desde alrededor de 25 a alrededor de 50 nucleótidos continuos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de inicio de interpretación. Asimismo, los términos "región del codón de parada" y la "región del codón de finalización de interpretación" se refiere a una porción de un ARNm o gen que abarca desde alrededor de 25 a 50 nucleótidos continuos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de finalización de interpretación. Consecuentemente la "región del codón inicial" (o "región del codón de inicio de interpretación") y la "región del codón de parada" (o "la región del codón de finalización de interpretación") son todas las regiones a las cuales se puede dirigir efectivamente con los compuestos antisentido para su uso de este invento.

El marco de lectura abierto (ORF-open reading frame) o "región de codificación", que es conocida en la técnica por referirse a la región entre el codón de inicio de interpretación y el codón de finalización de interpretación, también es además una región que podría ser usada efectivamente como objetivo. Dentro del contexto de esta especificación, una región preferida es la región intragénica que abarca al codón de inicio o finalización de transcripción del marco de lectura abierta (ORF - open reading frame) de un gen.

Otras regiones objetivo incluyen a la región no interpretada de 5' (5'UTR - 5' untranslated region), conocida en la técnica por referirse a la porción de un ARNm en la dirección de 5' desde el codón de inicio de transcripción, y por lo tanto, incluye a los nucleótidos desde el sitio de finalización de 5' y el codón de inicio de interpretación de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen), y la región no interpretada de 3' (3'UTR - 3' untranslated region), conocida en la técnica por referirse a la porción de un ARNm en la dirección de 3' desde el codón de finalización de

interpretación, y por lo tanto, incluye a los nucleótidos entre el codón de finalización de interpretación y el extremo de 3' en un ARNm (o los nucleótidos correspondientes en el gen). El lugar de determinación de 5' del ARNm comprende un residuo de guanosina de N7-metilada unido a la mayoría de residuos de 5' del ARNm por medio de un enlace de 5'-trifosfato de 5'. La región de terminación de 5' de un ARNm es considerada como que incluye a la estructura en sí de terminación de 5' así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes al lugar de terminación. También es preferible usar como objetivo a la región de terminación de 5'.

Aunque algunas transcripciones de ARNm eucariotas son interpretadas directamente, muchas contienen una o más regiones, conocidas como "intrones", que son extirpadas de una transcripción antes de que se interprete. El resto de regiones (y por lo tanto las que son interpretadas) son conocidas como "exones" y son empalmadas entre sí para formar una secuencia continua de ARNm. El usar como objetivos a los lugares de empalme, es decir, a las uniones de intrones y exones o a las uniones exones-intrones, también podría ser particularmente útil en situaciones en las cuales empalmes aberrantes están implicados en la enfermedad, o donde una sobreproducción de un producto de empalme particular está implicada en la enfermedad. Uniones aberrantes de fusión debido a reconfiguraciones o eliminaciones también son lugares objetivos preferidos. Las transcripciones de ARNm producidas por medio del proceso del empalme de 2 (o más) ARNms de diferentes fuentes genéticas se conocen como "transcripciones de fusión". También es conocido que los intrones pueden ser usados como objetivos efectivamente utilizando compuestos antisentido dirigidos a, por ejemplo, el ADN o el pre-ARNm.

También se conoce en la técnica que transcripciones alternas de ARN pueden ser producidas a partir de la misma región genómica del ADN. Estas transcripciones alternas son generalmente conocidas como "variantes". Más específicamente, las "variantes de pre-ARNm" son transcripciones producidas a partir del mismo ADN genómico que difieren de otras transcripciones producidas a partir del mismo ADN genómico en la posición de inicio o de parada y contienen secuencias de intrones y de exones).

En el momento que se extirpa una o más regiones de exones o intrones, o sus porciones a lo largo del empalme, las variantes de pre-ARNm producen "variantes de ARNm" más pequeñas. Consecuentemente, las variantes de ARNm son procesadas antes de las variantes de pre-ARNm y cada variante pre-ARNm siempre debe producir una variante única del ARNm como resultado de los empalmes. Estas variantes del ARNm también son conocidas como "variantes alternas de empalmes". Si no ocurriese ningún empalme de la variante de pre-ARNm entonces la variante de pre-ARNm es idéntica a la variante del ARNm.

En el ratón, en la rata y en el mono, la proteína enlazadora de la hormona de crecimiento, que es la forma acortada soluble del receptor de la hormona de crecimiento, es producida al empalmar alternamente a la transcripción primaria del receptor de la hormona de crecimiento. En algunas secciones, podría ser preferible el utilizar como objetivo a regiones de la transcripción que están presentes en la transcripción de receptor de la hormona de crecimiento y la transcripción proteínica más corta enlazadora de la hormona de crecimiento. En algunas secciones, podría ser preferible usar como objetivo a regiones del ARNm que sólo están presentes en la transcripción más larga del receptor de la hormona de crecimiento. En los humanos, en las vacas y en los cerdos (entre otras especies), ningún empalme alternativo de ARN es aparente, pero en vez de eso la proteína más corta enlazadora de la hormona de crecimiento es producida por medio de la proteólisis del receptor de la hormona de crecimiento. Se debe entender que en el contexto de esta especificación el término "ácido nucleico que codifica al receptor de la hormona de crecimiento" incluye, por lo tanto, al ácido nucleico que codifica a la proteína enlazadora de la hormona de crecimiento.

También es conocido en la técnica que variantes pueden ser producidas a través del uso de señales alternativas para iniciar o detener la transcripción y que los pre-ARNms y los ARNms pueden tener más de un codón de inicio y de parada. Variantes que se originan de un pre-ARNm o ARNm que usan codones alternativos de inicio o de parada son conocidos como las "variantes alternativas de inicio" de aquel pre-ARNm o ARNm. Aquellas transcripciones que utilizan un codón alternativo de parada son conocidas como las "variantes alternativas de parada" de aquel pre-ARNm o ARNm. Un tipo específico de variante alternativa de parada es la "variante polyA" en la cual las múltiples transcripciones producidas resultan de la realización alternativa de una de las "señales de parada polyA" por la maquinaria de transcripción, produciendo, por lo tanto, transcripciones que terminan en lugares polyA únicos. Dentro del contexto de la especificación, los tipos de variantes aquí descritas también son ácidos nucleicos objetivo preferidos.

El ARNm del receptor de la hormona de crecimiento tiene regiones alternativas no interpretadas de 5' y una o más de estas pueden ser preferidas para ser usadas como objetivo.

Las ubicaciones en el ácido nucleico objetivo a las cuales los compuestos antisentido preferidos se hibridan se refieren desde este momento en este documento como los "segmentos objetivo preferidos". Tal como se utiliza en este documento, el término "segmento objetivo preferido" es definido como por lo menos una porción de 8-bases nitrogenadas de una región objetivo a la cual un compuesto antisentido activo es usado como objetivo. Mientras que no se desea atarse a ninguna teoría, se cree en la actualidad que estos segmentos objetivos representan porciones del ácido nucleico objetivo en el cual son accesibles para su hibridación.

Mientras que las secuencias específicas de ciertos segmentos objetivos preferidos se establecen en este documento, una persona con conocimiento en la técnica reconocerá que estos sirven para ilustrar y describir secciones específicas dentro del enfoque de esta especificación. Segmentos objetivo preferidos adicionales pueden identificarse por una persona que tenga un conocimiento normal en la técnica.

Segmentos objetivo de 8-80 bases nitrogenadas de largo comprenden un tramo de por lo menos ocho (8) bases nitrogenadas consecutivas seleccionadas de entre los segmentos objetivos preferidos ilustrativos también son consideradas como blancos adecuados.

Segmentos objetivos podrían incluir a secuencias de ADN o de ARN que comprenden por lo menos a las 8 bases nitrogenadas consecutivas desde la terminal de 5' de uno de los segmentos objetivos preferidos ilustrativos (siendo el resto de bases nitrogenadas un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN empezando inmediatamente corriente arriba de la terminal de 5' del segmento objetivo y continuando hasta que el ADN o el ARN contenga alrededor de 8 a 80 bases nitrogenadas). Asimismo, segmentos objetivo preferidos son representados por secuencias de ADN o de ARN que comprenden por lo menos las 8 bases nitrogenadas consecutivas desde la terminal de 3' de uno de los segmentos objetivos preferidos ilustrativos (siendo el resto de las bases nitrogenadas un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente corriente abajo de la terminal de 3' del segmento objetivo y continuando hasta que el ADN o ARN y que contiene alrededor de 8 a 80 bases nitrogenadas). Una persona con conocimiento en la técnica equipada con los segmentos objetivos preferidos aquí ilustrados podrá, sin experimentación indebida, identificar segmentos objetivo preferidos adicionales.

Una vez que una o más regiones, segmentos o lugares objetivos se han identificado, los compuestos antisentido son escogidos los cuales son suficientemente complementarios para orientarse, es decir, hibridarse suficientemente bien y con una especificidad suficiente, para dar el efecto deseado.

D. Examinación y Validación del Objetivo

En una realización adicional, los "segmentos objetivo preferidos" identificados en este documento podrían ser utilizados en una prueba de detección de compuestos adicionales que module la expresión del receptor de la hormona de crecimiento. Los "moduladores" son aquellos componentes que reducen o incrementan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifican al receptor de la hormona de crecimiento y que comprenden de por lo menos una porción de 8-bases nitrogenadas que es complementaria a un segmento objetivo preferido. El método de detección comprende los pasos de contactar a un segmento objetivo preferido de una molécula de ácido nucleico que codifica al receptor de la hormona de crecimiento con uno o más moduladores candidatos, y seleccionando al uno o más moduladores candidatos que reduzcan o incrementen la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifique al receptor de la hormona de crecimiento. Una vez que se demuestra que el modulador o moduladores candidatos son capaces de regular (por ejemplo, ya sea incrementar o reducir) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica al receptor de la hormona de crecimiento, el modulador podría entonces ser utilizado en estudios investigativos adicionales de la función del receptor de la hormona de crecimiento, o para su uso como un agente de investigación, de diagnóstico o terapéutico de acuerdo con esta especificación.

Los segmentos objetivo preferidos de esta especificación bien podrían combinarse con sus compuestos antisentido complementarios respectivos de este invento para formar oligonucleótidos estabilizados de doble hebra (dúplex).

Aquellas partículas de oligonucleótidos de doble hebra han demostrado en la técnica el modular la expresión objetivo y regular la interpretación, así como el procesamiento de ARN por medio de mecanismos antisentido. Además, las partículas de doble hebra pueden ser sujetas a modificaciones químicas (Fire et al., *Nature (Naturaleza)*, 1998, 391, 806-811; Timmons y Fire, *Nature (Naturaleza)* 1998, 395, 854; Timmons et al., *Gene (Gen)*, 2001, 263, 103-112; Tabara et al., *Science (Ciencia)*, 1998, 282, 430-431; Montgomery et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América*, 1998, 95, 15502-15507; Tuschl et al., *Genes (Genes) Dev.*, 1999, 13, 3191-3197; Elbashir et al., *Nature (Naturaleza)*, 2001, 412, 494-498; Elbashir et al., *Genes (Genes) Dev.* 2001, 15, 188-200). Por ejemplo, aquellas partículas de doble hebra han demostrado inhibir al objetivo por medio de una hibridación clásica de las hebras antisentido del dúplex hacia el objetivo, activando, por lo tanto, una degradación enzimática del objetivo (Tijsterman et al., *Science (Ciencia)*, 2002, 295, 694-697).

Los compuestos de esta presentación también pueden estar aplicados en las áreas de descubrimiento de medicamentos y de validación de objetivos. Esta presentación comprende el uso de los compuestos y de los segmentos objetivo preferidos aquí identificados en los esfuerzos de descubrimiento de medicamentos para elucidar las relaciones que existen entre el receptor de la hormona de crecimiento y un estado de enfermedad, fenotipo o condición. Estos métodos incluyen el detectar o modular al receptor de la hormona de crecimiento que comprenden contactar a una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos de esta presentación, midiendo el nivel de ácido nucleico o proteínico del receptor de la hormona de crecimiento y/o un punto final fenotípico o químico

relacionado un tiempo después del tratamiento, y compartir opcionalmente el valor medido para una muestra no tratada o tratada con un compuesto adicional de la presentación. Estos métodos también pueden ser realizados en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de los genes desconocidos del proceso de validación de objetivos o para determinar la validez de un producto genético específico como un objetivo para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, condición o fenotipo específico.

E. Botiquines, reactivos de investigación, diagnósticos y terapias

Los compuestos aquí presentados pueden ser utilizados para la diagnosis, la terapia, la profilaxis y como reactivos y botiquines de investigación. Además, los oligonucleótidos antisentido, que pueden inhibir la expresión genética con una especificidad exquisita, son usados a menudo por aquellas personas con conocimiento normal para elucidar la función de genes específicos o para distinguir entre funciones de varios miembros de un sendero biológico.

Para su uso en botiquines y en el diagnóstico, los compuestos de esta presentación, ya sea individualmente o en combinación con otros compuestos o terapias, pueden ser utilizados como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para elucidar los patrones de expresión de una porción o de un complemento total de genes expresados en las células y los tejidos.

Como ejemplo no limitante, los patrones de expresión dentro de células o tejidos tratados con uno o más compuestos antisentido son comparados a células o tejidos de control que no son tratados con los compuestos antisentido y los patrones producidos son analizados para detectar niveles diferenciales de la expresión genética puesto que pertenecen, por ejemplo, a la asociación de enfermedades, los senderos de señalización, la localización celular, el nivel de expresión, el tamaño, la estructura o la función de los genes examinados. Estos análisis pueden realizarse en células estimuladas o no estimuladas y en la presencia o ausencia de otros compuestos que afecten los patrones de expresión.

Ejemplos de métodos de análisis de expresión genética en la técnica incluyen ensayos o micro ensayos de ADN (Brazma y Vilo, FEBS Lett., 2000, 480, 17-24; Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16), SAGE (análisis en serie de la expresión genética - serial analysis of gene expression) (Madden, et al., Drug (Medicamento) Discov. Today (Hoy), 2000, 5, 415-425), READS (amplificación enzimática de restricción de ADNcs - restricción enzyme amplification of digested cDNAs) (Prashar y Weissman, Methods Enzymol. (Métodos de Enzimología), 1999, 303, 258-72), TOGA (análisis total de expresión genética-total gene expression analysis) (Sutcliffe, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América, 2000, 97, 1976-81), ensayos proteínicos y proteómica (Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Jungblut, et al., Electrophoresis, (Electroforesis) 1999, 20, 2100-10), secuenciación de marcaciones secuenciales expresadas (EST - expressed sequence tag) (Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson, et al., J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57), huellas substractivas de ARN (SuRF - subtractive RNA fingerprinting) (Fuchs, et al., Anal. Biochem., 2000, 286, 91-98; Larson, et al., Cytometry (Citometría), 2000, 41, 203-208), clonación substractiva, muestras diferenciales (DD - differential display) (Jurecic y Belmont, Curr. Opin. Microbiol., 2000, 3, 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli, et al., J. Cell Biochem. Suppl., 1998, 31, 286-96), técnicas FISH (hibridación fluorescente in situ - fluorescent in situ hybridization) (Going y Gusterson, Eur. J. Cancer (Cáncer), 1999, 35, 1895-904) y métodos de espectrometría de masa (para, Comb. Chem. High Throughput Screen (Detección de Alto Caudal), 2000, 3, 235-41).

Los compuestos de la presentación son útiles para investigaciones y diagnósticos, puesto que estos compuestos se hibridan a ácidos nucleicos que codifican al receptor de la hormona de crecimiento. Por ejemplo, los oligonucleótidos que han demostrado hibridarse con una eficiencia y bajo aquellas condiciones tal como se presentó en este documento para ser inhibidores efectivos del receptor de la hormona de crecimiento también serán cebadores o sondas efectivas bajo condiciones que favorezcan a la amplificación o a la detección genética, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en métodos que requieren la detección específica de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican al receptor de la hormona de crecimiento y en la amplificación de aquellas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales del receptor de la hormona de crecimiento. La hibridación de oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y las sondas, de la presentación con un ácido nucleico que codifique al receptor de la hormona de crecimiento puede detectarse con sistemas conocidos en la técnica. Aquellos sistemas podrían incluir la conjugación de una enzima a oligonucleótidos, la radio-marcación del oligonucleótido o cualquier otro medio de detección adecuado. también pueden prepararse botiquines que usen aquellos medios de detección para medir el nivel del receptor de la hormona de crecimiento en una muestra.

La especificidad y sensibilidad del antisentido también son recaudadas por aquellas personas con conocimiento en la técnica para sus usos terapéuticos. Los compuestos antisentido han sido utilizados como partículas terapéuticas en el tratamiento de estados de enfermedad en animales, incluyendo en humanos. Los medicamentos de oligonucleótidos antisentido, incluyendo a ribozimas han sido administrados en una forma segura y efectiva a humanos y numerosos ensayos clínicos están llevándose a cabo actualmente. Por lo tanto, está establecido que los compuestos antisentido pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse

para ser útiles en regímenes de tratamiento de células, tejidos y animales.

Los compuestos para su uso en este invento han demostrado poder reducir la expresión del receptor de la hormona de crecimiento y reducir los niveles de IGF-I. Se cree, por lo tanto, que estos compuestos son útiles para la prevención, el retraso o el tratamiento de condiciones asociadas con el receptor de la hormona de crecimiento o con el eje hormona de crecimiento/factor de crecimiento similar a la insulina-I, incluyendo la acromegalia, el gigantismo, la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética, la nefropatía diabética, la diabetes, la artritis y tumores que dependen de la hormona de crecimiento y del IGF-I.

Para terapias, en animales, preferiblemente en un humano, que se sospeche que tienen una enfermedad o un trastorno que puede ser tratado al modular la expresión del receptor de la hormona de crecimiento se lo trata al administrar compuestos antisentido para su uso en este invento. Por ejemplo, en una realización no limitante, los compuestos son usados en métodos que comprenden el paso de administrar al animal que necesita el tratamiento, un monto terapéuticamente efectivo y un inhibidor del receptor de la hormona de crecimiento. Los inhibidores del receptor de la hormona de crecimiento para su uso en este invento inhiben efectivamente la actividad de la proteína receptora de la hormona de crecimiento o inhiben la expresión de la proteína receptora de la hormona de crecimiento. En una realización, la actividad o expresión del receptor de la hormona de crecimiento en un animal es inhibida por alrededor del 10%. Preferiblemente, la actividad o expresión del receptor de la hormona de crecimiento en un animal es inhibida por alrededor de un 30%. Más preferiblemente, la actividad o expresión del receptor de la hormona de crecimiento en un animal es inhibida por un 45% o más.

Por ejemplo, la reducción de la expresión del receptor de la hormona de crecimiento podría medirse en un suero, el tejido adiposo, en el hígado o en cualquier otro fluido corporal u órgano del animal. Preferiblemente, las células contenidas dentro de dichos fluidos, tejidos u órganos que se están analizando contienen una molécula de ácidos nucleicos que codifican a la proteína receptora de la hormona de crecimiento y/o la proteína receptora de la hormona de crecimiento en sí.

Los compuestos para su uso en el invento pueden ser utilizados en composiciones farmacéuticas al agregar un monto efectivo de un compuesto a un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable que sea adecuado. Los compuestos para su uso en métodos del invento también podrían ser utilizados profilácticamente.

F. Modificaciones

Tal como es conocido en la técnica, un nucleósido es una combinación que se basa en azúcar. La porción base del nucleósido es normalmente una base heterocíclica. Las 2 clases más comunes de aquellas bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato vinculado covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede ser vinculado a la partícula hidroxila de 2', 3' o 5' en el azúcar. Al formar los oligonucleótidos, los grupos fosfatos se enlazan covalentemente con los nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. A su vez, los extremos respectivos de este compuesto polimérico lineal pueden unirse aún más para formar un compuesto circular, sin embargo, los compuestos lineares son generalmente preferidos. Adicionalmente, los compuestos lineares pueden tener una complementariedad interna de bases nitrogenadas y, podrían, por lo tanto, plegarse en una forma que produzca un compuesto que sea completamente o parcialmente de doble hebra. Dentro de los oligonucleótidos, los grupos fosfatos son comúnmente referidos como que forman a la estructura internucleosídica del oligonucleótido. La vinculación normal o la estructura del ARN y del ADN es una vinculación de un fosfodiéster de 3' a 5'.

Vinculaciones Internucleosídicas modificadas (estructuras)

Los compuestos antisentido útiles en este invento son los oligonucleótidos que contienen estructuras modificadas o vinculaciones internucleosídicas naturales. Tal como se define en esta especificación, los oligonucleótidos que tienen estructuras modificadas incluyen a aquellos que retienen un átomo de fósforo en la estructura y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en la estructura. Para los propósitos de esta especificación, y tal como se denomina a veces en la técnica, los nucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su estructura internucleosídica también pueden ser considerados como oligonucleósidos.

Estructuras preferidas de oligonucleótidos modificados que contienen un átomo de fósforo en ellas, incluyen, por ejemplo, a los fosfortioatos, fosfortioatos quirales, fosforo-ditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y de alquilo incluyendo a fosfonatos de 3'-alquileo, fosfonatos de 5'-alquileo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo a fosforamidatos de 3'-amino y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos, y boranofosfatos que tienen enlaces normales de 3'-5', análogos enlazados de 2'-5' de estos y aquellos que tienen una polaridad invertida donde una o más vinculaciones internucleosídicas es una vinculación de 3' a 3', de 5' a 5', o de 2' a 2'. Los oligonucleótidos preferidos que tienen una polaridad invertida comprenden una sola vinculación de 3' a 3' en la vinculación más internucleosídica de 3', es decir, un solo residuo invertido de nucleósidos que podría ser

abásico (la base nitrogenada no existe o tiene un grupo hidroxilo en su lugar). También se incluyen varias formas de sales, sales mezcladas y de ácidos libres.

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

10 Estructuras preferidas de oligonucleótidos modificados que no incluyen un átomo de fósforo en ellas tienen estructuras que son formadas por vinculaciones de cadenas cortas internucleosídicas de alquilo o cicloalquilo, vinculaciones mixtas internucleosídicas de heteroátomos y alquilo o cicloalquilo, o una o más vinculaciones de cadenas cortas internucleosídicas hetero atómicas o heterocíclicas. Estas incluyen a aquellas que tienen vinculaciones morfolinas (formadas en parte de porciones de azúcar de un nucleósido); estructuras de siloxanos; 15 estructuras de sulfuros, sulfóxidos y sulfonas; estructuras de formacetilos y tioformacetilos; estructuras de riboacetilos; estructuras que contienen alquenos; estructuras de sulfamatos; estructuras de metileneimino y metilenehidracino; estructuras de sulfonatos y sulfonamidas; estructuras de amidas; y otras que tienen partes componentes mezcladas de N, O, S, y CH₂.

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

25 *Azúcar Modificado y Vinculaciones-Miméticas Internucleosídicas*

En otras miméticas de oligonucleótidos preferidas, el azúcar y la vinculación internucleosídica (es decir, la estructura), de las unidades de nucleótidos son reemplazadas con grupos nuevos. Las unidades de bases 30 nitrogenadas son mantenidas por medio de hibridación con un ácido nucleico objetivo apropiado. Un compuesto como ese, un mimético de oligonucleótidos que ha demostrado tener excelentes propiedades de hibridación, se lo denomina como un ácido nucleico peptídico (PNA - peptide nucleic acid). En los compuestos PNA, la estructura del azúcar de un oligonucleótido es reemplazada con una estructura que contiene a amidas, en particular una estructura aminoetilglicina. Las bases nitrogenadas son retenidas y son enlazadas directamente o indirectamente a los átomos 35 de nitrógeno aza de la porción amida de la estructura. Patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de compuestos PNA incluyen, pero no se limitan a, Estados Unidos: 5,539,082; 5,714,331; y 5,719,262. Enseñanzas adicionales de los compuestos PNA pueden encontrarse en Nielsen et al., Science (Ciencia), 1991, 254, 1497-1500.

40 Secciones preferidas para su uso en el invento son oligonucleótidos con estructuras de fosforotioato y oligonucleósidos con estructuras de heteroátomos, y en particular a -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- [conocido como una estructura de metileno (metilimino) o MMI], -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- y -ON(CH₃)-CH₂-CH₂ [donde la estructura del fosfodiéster natural es presentada como -O-P-O-CH₂-] de la patente 45 de Estados Unidos referenciada anteriormente 5,489,677, y las estructuras de amidas de la patente de Estados Unidos referenciada anteriormente 5,602,240. También son preferidos los oligonucleótidos que tienen estructuras morfolinas de la patente de Estados Unidos 5,034,506 ya referenciada.

Azúcares modificados

50 Los oligonucleótidos modificados también podrían contener una o más partículas sustituidas de azúcar. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguiente en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; u O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, el alqueno y el alquino podrían ser sustituidos o no sustituidos con alquilo C1 a C10, o alqueno y alquino C2 a C10. Particularmente preferidos son 55 O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son de uno a alrededor de 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguiente en la posición 2': un alquilo C1 a C10 inferior, un alquilo inferior sustituido, un alqueno, un alquino, un alcarilo, un aralquilo, un O-alcarilo o un O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, un heterocicloalquilo, un heterocicloalcarilo, un aminoalquilamino, un polialquilamino, un sililo sustituido, un grupo de división de ARN, un grupo reportado, un intercalador, un grupo mejorador de las propiedades 60 farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades fármaco - dinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tengan propiedades similares. Una modificación preferida incluye a la 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocida como 2'-O-(2'-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504), es decir, un grupo alcoxialcoxi. Una modificación preferida adicional incluye al grupo 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se 65 describió en los ejemplos en secciones posteriores de este documento, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también

conocido en la técnica como 2'-O-dimetil-amino-etoxi-etilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂, también descritos en los ejemplos en secciones posteriores de este documento.

5 Otras modificaciones preferidas incluyen a 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-alilo (2'-CH₂-CH=CH₂), 2'-O-allyl (2'-O-CH₂-CH=CH₂) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación de 2' podría ser en la posición arabino (arriba) o en la posición ribo (abajo). Una modificación preferida 2'-arabino es el 2'-F. Modificaciones similares también pueden realizarse en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en los oligonucleótidos vinculados en 2'-5' en la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los oligonucleótidos también podrían tener miméticos de azúcar tales como las partículas de ciclobutilos en el lugar del azúcar pentofuranosilo. Patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de aquellas estructuras modificadas de azúcar incluyen, pero no se limitan a, Estados Unidos: 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785, 5,519,134 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909, 5,610,300 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873, 5,670,633 5,792,747; y 15 5,700,920.

Una modificación referida adicional del azúcar incluye a los Ácidos Nucleicos Bloqueados (LNAs - Locked Nucleic Acids) en los cuales el grupo 2'-hidroxilo está vinculado con el átomo carbono 3' o 4' del anillo de azúcar, formando, por lo tanto, una partícula bicíclica de azúcar. La vinculación es preferiblemente un grupo metileno (-CH₂-)n que sirve de puente entre el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4' donde n es uno o 2. Las LNAs y sus preparaciones se describen en WO 98/39352 y WO 99/14226.

Bases nitrogenadas naturales y modificadas

25 Los oligonucleótidos también podrían incluir a modificaciones o sustituciones de bases nitrogenadas (a menudo denominadas en la técnica como simplemente "bases"). Tal como se utiliza en este documento, las bases nitrogenadas "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases purinas, la adenina (A) y la guanina (G), y las bases pirimidinas, la timidina (T), la citosina (C) y el uracilo (U). Las bases nitrogenadas modificadas incluyen otras bases nitrogenadas sintéticas y naturales tales como la 5-metilcitosina (5-me-C), la citosina de 5-hidroximetilo, la xantina, la hipoxantina, la 2-aminoadenina, el 6-metilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, el 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, el 2-tiouracilo, la 2-tiotimina y la 2-tiocitosina, el 5-halouracilo y la citosina, el 5-propinilo (-C≡C-CH₃) el uracilo y la citosina y otros derivados de bases de la pirimidina, el uracilo de 6-azo y citosina y otros derivados de alquinos de bases de pirimidinas, uracilo de 6-azo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras 8-sustituidas adeninas y 35 guaninas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citocinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Bases nitrogenadas modificadas adicionales incluyen a pirimidinas tricíclicas tales como la citidina(1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxacina-2(3H)-ona) de fenoxacina, (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiacina-2(3H)-ona) de citidina de fenotiacina abrazadera G tales como una citidina de fenoxacina (por ejemplo, la 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxacina-2(3H)-ona), la (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona) de citidina de carabazol, la (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona) de citidina de piridoindol. Bases nitrogenadas modificadas podrían incluir aquellas en las cuales la base purina o pirimidina es reemplazada con otros heterociclo 2, por ejemplo, 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Bases nitrogenadas adicionales incluyen aquellas presentadas en la patente de Estados Unidos número 3,687,808, aquellas presentadas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering (La Enciclopedia Concisa de Ciencia e Ingeniería Polimérica), páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellas presentadas por Englisch et al., Angewandte Chemie, edición internacional, 1991, 30, 613, y aquellas presentadas por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, Antisense Research and Applications (Investigación y Aplicaciones Antisentido), páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993. Ciertas de estas bases nitrogenadas son particularmente útiles para incrementar la afinidad de enlaces de los compuestos para su uso en este invento. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas de N-2, N-6 y O-6, incluyendo a la 2-aminopropiladenina, el 5-propiniluracilo y la 5-propinilcitosina. Las sustituciones de 5-metilcitosina han demostrado incrementar la estabilidad dúplex de los ácidos nucleicos por 0.6-1.2 °C y son actualmente las sustituciones preferidas de bases, aún más específicamente cuando se combinan con modificaciones de azúcar de 2'-O-metoxietilo.

55 Patente representativa de Estados Unidos que es en la preparación de aquellas bases nitrogenadas modificadas mencionadas anteriormente así como otras bases nitrogenadas incluyen, pero no se limitan a, la patente antes mencionada Estados Unidos 3,687,808, así como Estados Unidos: 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,830,653; 5,763,588; 6,005,096; y 5,681,941, y la patente de Estados Unidos 5,750,692.

Conjugaciones

65 Otra modificación de los oligonucleótidos para su uso en el invento involucra vincularlos químicamente a los

oligonucleótidos, una o más partículas o conjugaciones que mejoran la actividad, la distribución celular o la absorción celular de los oligonucleótidos. Estas partículas o conjugaciones pueden incluir a grupos conjugados enlazados covalentemente a grupos funcionales tales como grupos de hidroxilos primarios o secundarios. Los grupos conjugados para su uso en el invento incluyen intercaladores, moléculas reportadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros. Grupos de conjugación típicos incluyen a los colesteroles, a los lípidos, a los fosfolípidos, a la biotina, a la fenacina, el folato, la fenantridina, la antraquinona, la acridina, las fluoresceínas, las rodaminas, las cumarinas, y colorantes. Grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta especificación, incluyen a grupos que mejoran la absorción, mejora la resistencia a la degradación, y/o fortalecen la hibridación específica de secuencias con el ácido nucleico objetivo. Los grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta especificación, incluyen a grupos que mejoran la absorción, la distribución, el metabolismo o la excreción de los compuestos para su uso en este invento. Grupos de conjugaciones representativas se presentan en la aplicación de patente internacional PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre de 1992, y la patente de Estados Unidos 6,287,860. Partículas de conjugación incluyen, pero no se limitan a, moléculas líquidas tales como una partícula de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, el hexil-S-tritilitol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, el dodecandiol o residuos de undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, el di-hexadecil-rac-glicerol o el trietil-amonio 1, 2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido acético de adamantano, una partícula de palmitilo, o una partícula de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. También pueden conjugarse oligonucleótidos del invento a sustancias fármaco activas, por ejemplo, la aspirina, la warfarina, la fenilbutazona, el ibuprofeno, el suprofen, el fenbufeno, el ketoprofeno, el (S)-(+)-pranoprofeno, el carprofeno, la dansilsarcosina, el ácido 2,3,5-triodobenzóico, el ácido flufenámico, el ácido folínico, una benzotiadiazida, la clorotiazida, una diazepina, una indometicina, un barbiturato, una cefalosporina, un medicamento sulfa, un antidiabético, un antibacterial o un antibiótico. Las conjugaciones oligonucleótido-medicamento y su preparación son descritas en la aplicación de patente de Estados Unidos 09/334,130 (presentada el 15 de junio de 1999).

Patente representativa de Estados Unidos que enseña la preparación de aquellas conjugaciones de oligonucleótidos incluyen, pero no se limitan a, Estados Unidos: 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465 5,541,313 5,545,730 5,552,538 5,578,717, 5,580,731 5,580,731 5,591,584 5,109,124 5,118,802. 5,138,045 5,414,077 5,486,603 5,512,439 5,578,718, 5,608,046 4,587,044 4,605,735 4,667,025 4,762,779, 4,789,737 4,824,941 4,835,263 4,876,335 4,904,582, 4,958,013, 5,082,8305, 112,963 5,214,136 5,082,830. 5,112,963 5,214,136 5,245,022 5,254,469 5,258,506, 5,262,536, 5,272,250 5,292,873,5,317,098 5,371,241, 5,391,723 5,416,203 5,451,463 5,510,475 5,512,667, 5,514,785 5,565,552 5,567,810 5,574,142,5,585,481, 5,587,371 5,595,726 5,597,696, 5,599,923 5,599,928 y 5,688,941.

35 *Compuestos quiméricos*

No es necesario para todas las posiciones en un compuesto específico estar modificadas uniformemente, y de hecho, más de una de las modificaciones ya mencionadas podría incorporarse en un solo compuesto o incluso en un solo nucleósido dentro de un oligonucleótido.

Este invento también puede incluir a compuestos antisentido para su uso los cuales son compuestos quiméricos. Los compuestos "quiméricos" antisentido o "quimeras", en el contexto de esta especificación, son compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, que contienen 2 o más regiones químicamente diferentes, cada una hecha de por lo menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleótido. Estos oligonucleótidos comúnmente contienen por lo menos una región donde el oligonucleótido es modificado para otorgar al oligonucleótido una resistencia incrementada a la degradación de las nucleasas, una absorción celular incrementada, una estabilidad incrementada y/o una afinidad de enlaces incrementada para el ácido nucleico objetivo. Una región adicional de los oligonucleótidos podría servir como un substrato para las enzimas capaz de dividir a híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. En forma de ejemplo, la ribonucleasa H es una endonucleasa que divide a la hebra del ARN de un dúplex de ARN: ADN. La activación de la ribonucleasa H, por lo tanto, resulta en la división del objetivo ARN, mejorando, por lo tanto, extensamente la eficiencia de la inhibición mediada por los oligonucleótidos de la expresión genética. La división de híbridos ARN:ARN puede, en una forma similar, lograrse a través de las acciones de las endorribonucleasas, tales como la ribonucleasa L que divide al ARN celular y viral. La división del objetivo ARN puede ser detectado rutinariamente por medio de electroforesis de gel y, si fuese necesario, técnicas de hibridación conocidas en la técnica asociadas con los ácidos nucleicos.

Los compuestos antisentido quiméricos para su uso en el invento pueden ser formados como estructuras compuestas de 2 o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, miméticos de oligonucleósidos y/o oligonucleótidos tal como se describió anteriormente. Aquellos compuestos han sido referidos en la técnica como híbridos o gapmers. Patente representativas de Estados Unidos que enseña la preparación de aquellas estructuras híbridas incluyen, pero no se limitan a, Estados Unidos: 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356; y 5,700,922.

65 *G. Formulaciones*

Los compuestos para su uso en el invento podrían ser mezclados, encapsulados, conjugados o asociados de otras formas a otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como por ejemplo, a liposomas, moléculas dirigidas a reserva por es, formulaciones orales, rectales, tópicas o de otro tipo, para asistir a la absorción, distribución y/o asimilación. Patente representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de formulaciones quedan asistencia a aquella absorción, distribución y/o asimilación incluyen, pero no se limitan a, Estados Unidos: 5,108,921; 5,354,844; 5,416,016; 5,459,127; 5,521,291; 5,543,158; 5,547,932; 5,583,020; 5,591,721; 4,426,330; 4,534,899; 5,013,556; 5,108,921; 5,213,804; 5,227,170; 5,264,221; 5,356,633; 5,395,619; 5,416,016; 5,417,978; 5,462,854; 5,469,854; 5,512,295; 5,527,528; 5,534,259; 5,543,152; 5,556,948; 5,580,575; y 5,595,756.

Los compuestos antisentido para su uso en el invento abarca a cualquier sal, éster o sal de éster o cualquier otro compuesto farmacéuticamente aceptable, que cuando sea administrado a un animal, incluyendo un humano, sea capaz de suministrar (directamente o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o su residuo. Asimismo, por ejemplo, la presentación también es sacada de pro-medicamentos y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos para su uso en el invento, las sales farmacéuticamente aceptables de dichos pro-medicamentos, y otros equivalentes biológicos. El sodio es una sal farmacéuticamente aceptable, particularmente para los compuestos de oligonucleótidos.

El término "pro-medicamentos" indica el agente terapéutico que es preparado en una forma inactiva que es convertido a una forma activa (es decir, un medicamento) dentro del cuerpo o de sus células por la acción de enzimas endógenas u otros químicos y/o condiciones. En particular, las versiones de pro-medicamentos de los oligonucleótidos para su uso en el invento son preparados como derivados de [(Sacetil-2-tioetil) fosfato] de SATE de acuerdo a los métodos presentados en WO 93/24510 a Gosselin et al., publicado el 9 de diciembre de 1993 o en WO 94/26764 y U.S. 5,770,713 de Imbach et al.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos para su uso en el invento: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto padre y no imparten efectos toxicológicos. Para los oligonucleótidos, ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos son descritos aún más en la patente de Estados Unidos 6,287,860.

Esta presentación también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen a los compuestos antisentido del invento. Las composiciones farmacéuticas de este invento podrían administrarse en varias formas dependiendo de si un tratamiento es local o sistémico es deseado y dependiendo del área que va a ser tratada. La administración podría ser tópica (incluyendo las membranas oftálmicas y mucosas incluyendo una entrega vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, por medio de la inhalación o la insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por medio de un nebulizador; intra - tráquea, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyecciones o infusiones intravenosas, intra - arteriales, subcutáneas, intraperitoneales o intramusculares; o intracraneales, por ejemplo, una administración intratecal o intraventricular. Se cree que los oligonucleótidos que tienen por lo menos una modificación de 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para una administración oral. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para una administración tópica podrían incluir parches, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos transdérmicos. Los portadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, de polvos o de aceites, enlazadores y similares podrían ser necesarios o deseables. Condones cubiertos, guantes y similares también podrían ser útiles.

Las formulaciones farmacéuticas para su uso en este invento, que podrían presentarse convenientemente en formas de dosis unitarias, podría ser preparadas de acuerdo a técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Aquellas técnicas incluyen el paso de asociar a los ingredientes activos con un portador o portadores o excipiente o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones son preparadas al asociar uniformemente e íntimamente a los ingredientes activos con portadores líquidos o portadores sólidos divididos finamente o ambos, y luego, si fuese necesario, darle forma al producto.

Las composiciones de este invento podrían ser formuladas en cualquiera de muchas formas posibles de dosis tales como, pero sin limitarse a, tabletas, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles suaves, supositorios y enemas. Las composiciones para su uso en este invento también podrían ser formuladas como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas podrían contener además sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, a la carboximetilcelulosa de sodio, al sorbitol y/o al dextrano. La suspensión tamil podría contener estabilizadores.

Las composiciones farmacéuticas para su uso en este invento incluyen, pero no se limitan a, soluciones, emulsiones, espumas y liposomas que contienen formulaciones. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para su uso en este invento podrían comprender uno o más mejoradores de penetración, portadores, excipientes u otros ingredientes activos o inactivos.

Las emulsiones son sistemas comúnmente heterogéneos de un líquido dispersado en otro en la forma de

gotas usualmente excediendo 0.1 μm de diámetro. Las emulsiones podrían contener componentes adicionales además de las fases dispersas, y el medicamento activo que podría estar presente como una solución en la fase acuosa, la fase de aceites o individualmente como una fase separada. Las micro emulsiones son incluidas como una realización de esta presentación. Las emulsiones y sus usos son bien conocidas en la técnica y son descritas aún más en la patente de Estados Unidos 6,287,860.

Las formulaciones para su uso en este invento incluyen formulaciones de liposomas. Tal como se utiliza en esta especificación, el término "liposoma" se refiere a una vesícula compuesta de lípidos anfifílicos configurados en una bi-capa o bi-capas esféricas. Los liposomas son vesículas unilamlares o multilamelares que tienen una membrana formada de un material lipofílico y un interior acuoso que contiene la composición que va a ser entregada. Los liposomas catiónicos son liposomas cargados positivamente que se cree que interactúan con las moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable. Los liposomas que son sensibles al pH o que están cargados negativamente se cree que atrapan al ADN en vez de crear complejos con el punto ambos liposomas catiónicos y no catiónicos han sido utilizados para entregar el ADN a las células.

Los liposomas también incluyen a liposomas "estabilizados estéricamente", un término que, tal como se utiliza en este documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan a los liposomas, resultan en vidas útiles mejoradas de circulación en relación a los liposomas que no tienen dichos lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estabilizados estéricamente son aquellos en los cuales una parte de la porción de lípidos que forma a la vesícula de liposoma comprende uno o más glucolípidos o es derivado con uno o más polímeros hidrofílicos, tal como una partícula de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos son descritos aún más en la patente de Estados Unidos 6,287,860.

Las formulaciones y composiciones farmacéuticas para su uso en este invento también podrían incluir surfactantes. El uso de surfactantes en productos, formulaciones y en emulsiones farmacológicas es bien conocida en la técnica. Surfactantes y sus usos son descritos aún más en la patente de Estados Unidos 6,287,860.

En una realización, esta especificación utiliza varios mejoradores de penetración para efectuar una entrega eficiente de los ácidos nucleicos, particularmente de los oligonucleótidos. Adicionalmente a ayudar a la difusión de los medicamentos no lipofílicos a lo largo de las membranas celulares, mejoradores de penetración también incrementan la permeabilidad de los medicamentos lipofílicos. Los mejoradores de penetración podrían clasificarse como que pertenecen a una de 5 categorías amplias, es decir, surfactantes, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes, y no surfactantes no quelantes. Los mejoradores de penetración y sus usos son descritos aún más en la patente de Estados Unidos 6,287,860.

Una persona con conocimiento en la técnica reconocerá que las formulaciones son diseñadas rutinariamente de acuerdo a la intención de su uso, es decir, la ruta de administración.

Otros compuestos antisentido preferidos son aquellos capaces de una administración oral tales como los compuestos antisentido 2'MOE y los fosfordiamidatos de morfolino. Esto suministra una conveniencia adicional a los usuarios en relación a los compuestos del receptor de la hormona de crecimiento en comparación con los compuestos anteriores en la técnica. Compuestos preferidos para el tratamiento de algunas condiciones serán aquellos que distribuyen ampliamente y, por lo tanto, más hábilmente efectos locales y/o sistémicos por medio del riñón. Debe entenderse, sin embargo, que en otras condiciones, la distribución a menos órganos es lo preferido.

Formulaciones preferidas para su administración tópica incluyen aquellas en las cuales los oligonucleótidos para su uso en el invento son mezclados con un agente de entrega tópica tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y surfactantes. Los lípidos y liposomas preferidos incluyen a neutrales (por ejemplo, etanolamina de DOPE de dioleoilfosfatidilo, DMPC de colina de dimiristoilfosfatidilo, colina de distearoilfosfatidilo) negativos (por ejemplo, DMPG de glicerol de dimiristoilfosfatidilo) y catiónicos (por ejemplo, DOTAP de dioleiltetrametilaminopropilo y DOTMA etanolamina de dedioleoilfosfatidilo).

Para administración tópica o de otro tipo, pueden encapsularse oligonucleótidos de este invento dentro de liposomas o pueden formar complejos compuestos, en particular a liposomas catiónicos. Alternamente, los oligonucleótidos pueden ser formados en complejos con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Ácidos grasos y ésteres preferidos, sus sales farmacéuticamente aceptables, y sus usos son descritos aún más en la patente de Estados Unidos 6,287,860. Formulaciones tópicas son descritas en detalle en la aplicación de patente de Estados Unidos 09/315,298 presentada el 20 de mayo de 1999.

Las composiciones y formulaciones para su administración oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas suspensiones o soluciones en agua o en medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, bolsitas, tabletas o mini - tabletas. Espesantes, agentes saborizantes, diluyentes, emulsionantes, asistentes de dispersión o enlazadores pueden ser deseables. Formulaciones orales preferidas son aquellas en las cuales oligonucleótidos para su uso en el invento son administrados en conjunto con uno o más surfactantes y quelantes mejoradores de penetración. Surfactantes preferidos incluyen ácidos grasos y/o sus ésteres o sus sales. Ácidos/sales biliares y

ácidos grasos preferidos y sus usos son descritos aún más en la patente de Estados Unidos 6,287,860. También son preferidas combinaciones de mejoradores de penetración, por ejemplo, ácidos/sales grasas en combinación con ácidos/sales biliares. Una combinación particularmente preferida es la sal de sodio de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Mejoradores de penetración adicionales incluyen al éter de polioxietileno-9-laurilo, el éter de polioxietileno-20-cetilo. Oligonucleótidos para su uso en el invento podrían ser entregados oralmente, en una forma granular incluyendo partículas secadas y esparcidas por aerosol, o puestas en complejos para formar micro o nanopartículas. Los agentes formadores de complejos de oligonucleótidos y sus usos son descritos aún más en la patente de Estados Unidos 6,287,860. Mutaciones orales para oligonucleótidos y su preparación son descritos en detalle en las aplicaciones de Estados Unidos 09/108,673 (presentada el 1 de julio 1998), 09/315,298 (presentada el 20 de mayo 1999) y 10/071,822 (presentada el 8 de febrero 2002).

Las composiciones y formulaciones para una administración parenteral, intratecal o intraventricular podrían incluir soluciones acuosas estériles que también podrían contener amortiguadores, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero sin limitarse a, mejoradores de penetración, compuestos portadores y otros portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Ciertas secciones de la presentación se refieren a composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o más de otros agentes quimioterapéuticos que funcionan por medio de un mecanismo antisentido. Ejemplos de aquellos agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, medicamentos quimioterapéuticos del cáncer tales como la daunorubicina, la daunomicina, la dactinomicina, la doxorubicina, la epirubicina, la idarubicina, la esorubicina, la bleomicina, la mafosfamida, la ifosfamida, la citosina, la arabinosida, la bis-cloroetilnitrosurea, el busulfano, la mitomicina C, la actinomicina D, la mitramicina, la prednisona, la hidroxiprogesterona, la testosterona, el tamoxifeno, la dacarbacina, la procarbacina, la hexametilmelamina, la pentametilmelamina, la mitoxantrona, la amsacrina, el clorambucilo, la etilciclohexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, el melfalano, la ciclofosfamida, la 6-mercaptopurina, la 6-tioguanina, la citarabine, la 5-azacitidina, la hidroxiourea, la deoxico-formicina, la 4-hidroxiperoxiciclofosforamida, el 5-fluorouracilo (5-FU), la 5-fluorodeoxiuridina (5-FUdR), el metotrexato (MTX), la colchicina, el taxol, la vincristina, la vinblastina, el etopósido (VP-16), el trimetrexato, el irinotecán, el topotecán, la gemcitabina, el tenipósido, el cisplatino y el dietilstilbestrol (DES). Cuando se usa con los compuestos para su uso en el invento, aquellos agentes quimioterapéuticos podrían ser utilizados individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótidos), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótidos durante un periodo de tiempo seguido por MTX y oligonucleótidos), o en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos adicionales (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótidos, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótidos). Medicamentos antiinflamatorios, incluyendo, pero sin limitarse a, medicamentos no esteroideos antiinflamatorios y corticoesteroides, y medicamentos antivirales, incluyendo, pero sin limitarse a la ribivirina, la vidarabina, aciclovir y el ganciclovir, también podrían ser combinados en composiciones para su uso en el invento. Las combinaciones de los compuestos antisentido y otros medicamentos antisentido también están dentro del enfoque de esta presentación. 2 o más compuestos combinados podrían ser usados juntos o secuencialmente. Combinaciones preferidas comprenden a ocreótidos, a Trovert y/u otros inhibidores o antagonistas de la hormona de crecimiento, el factor de crecimiento similar a la insulina-I, el IGFBP-3, el receptor de la hormona de crecimiento o el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina.

Las composiciones del invento podrían contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales orientados hacia un 2º objetivo de ácido nucleico. Alternamente, las composiciones para su uso en el invento podrían contener 2 o más compuestos antisentido dirigidos a regiones diferentes del mismo objetivo del ácido nucleico. Numerosos ejemplos de compuestos antisentido son conocidos en la técnica. 2 o más compuestos combinados podrían ser utilizados juntos o secuencialmente.

H. Dosis

Se cree que la formulación de las composiciones terapéuticas y su administración subsiguiente (dosis) está dentro del conocimiento de aquellas personas en la técnica. La dosis depende de la gravedad y el nivel de respuesta del estado de la enfermedad que se esté tratando, con el curso de tratamiento que dura desde algunos días hasta algunos meses, o hasta que una cura sea efectuada o una reducción del estado de la enfermedad sea alcanzada. Cronogramas óptimos de dosis pueden calcularse a partir de mediciones de la acumulación del medicamento en el cuerpo del paciente. Personas con un conocimiento normal pueden determinar fácilmente dosis óptimas, metodologías de dosis y tasas de repetición. Dosis óptimas podrían variar dependiendo de la potencia relativa de los oligonucleótidos individuales, y pueden, generalmente, estimarse basándose en los EC50s que han demostrado ser efectivos en modelos animales in vitro e in vivo. En general, dosis que van desde 0.01 microgramos a 100 g por kilogramo de masa corporal, y podrían ser entregados una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Personas con un conocimiento normal en la técnica podrán estimar fácilmente las tasas de repetición para las dosis basándose en tiempos medidos de residencia y concentraciones del medicamento en los fluidos y tejidos corporales. Después de un tratamiento exitoso, podría ser deseable exponer a un paciente a una terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado de la enfermedad, donde el oligonucleótido es administrado en dosis de mantenimiento, que varían desde 0.01 microgramos a 100 g por

kilogramo de masa corporal, una vez o más veces diariamente a una vez cada 20 años.

Oligonucleótidos antisentido preferidos son hechos con técnicas químicas capaces de reducir la frecuencia de las dosis, es decir, una vez al día, una vez a la semana o menos frecuentemente. Químicas antisentido particularmente preferidas son aquellas utilizadas en este documento que podrían ser administradas una vez cada 2 días y que son capaces de ser administradas por lo menos una vez a la semana subcutáneamente, e incluso menos frecuentemente como por ejemplo una vez al mes, basándose en las observaciones de antisentidos de la misma clase. Esto es menos frecuente que Trovert en el mismo modelo animal, que fue administrada todos los días, y menos frecuente que la experiencia clínica actual con Trovert. Esto suministra una enorme conveniencia para el tratamiento de esta condición crónica que podría potencialmente mejorar el cumplimiento.

Aunque este invento ha sido descrito con una especificidad de acuerdo a ciertas secciones importantes, los siguientes ejemplos sirven únicamente para ilustrar el invento y no tiene la intención de limitarlo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Síntesis de Fosforamiditas de Nucleósidos

Los siguientes compuestos, incluyendo las amiditas y sus intermediadores fueron preparados tal como se describe en la patente de Estados Unidos 6,426,220 y publicada en la PCT WO 02/36743; el intermediador 5'-O-Dimetoxitritil-timidina para la amidita de dC de 5-metilo, el intermediador 5'-O-Dimetoxitritil-2'-deoxi-5-metilcitidina para la amidita de 5-metil-dC, el penúltimo intermediador 5'-O-Dimetoxitritil-2'-deoxi-N4-benzoil-5-metilcitidina para la amidita de dC de 5-metilo, [5'-O-(4,4'-Dimetoxitriifenilmetil)-2'-deoxi-N4-benzoil-5-metilcitidina-3'-O-il]-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (amidita de dC de 5-metilo), 2'-Fluorodeoxiadenosina, 2'-Fluorodeoxiguanosina, 2'-Fluorouridina, 2'-Fluorodeoxicitidina, amiditas modificadas de 2'-O-(2-Metoxietilo), el intermediador 2'-O-(2-metoxetil)-5-metiluridina, el penúltimo intermediador 5'-O-DMT-2'-O-(2-metoxetil)-5-metiluridina, [5'-O-(4,4'-Dimetoxitriifenilmetil)-2'-O-(2-metoxietil)-5-metiluridina-3'-O-il]-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (amidita de T de MOE), intermediador 5'-O-Dimetoxitritil-2'-O-(2-metoxietil)-5-metiluridina, el penúltimo intermediador 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-(2-metoxetil)-N4-benzoil-5-metil-citidina, [5'-O-(4,4'-Dimetoxitriifenilmetil)-2'-O-(2-metoxietil)-N4-benzoil-5-metilcitidina-3'-O-il]-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (amidita de 5-Me-C de MOE), [5'-O-(4,4'-Dimetoxitriifenilmetil)-2'-O-(2-metoxietil)-N6-benzoiladenosina-3'-O-il]-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (amidita de MOE), [5'-O-(4,4'-Dimetoxitriifenilmetil)-2'-O-(2-metoxietil)-N4-isobutirilguanosina-3'-O-il]-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (amidita de G de MOE), amiditas de nucleósidos de 2'-O-(Aminooxietilo) y amiditas de nucleósidos de 2'-O-(dimetilamino-oxietilo), amiditas de nucleósidos de 2'-(Dimetilaminooxietoxi), 5'-O-terc-Butildifenilsilil-O2-2'-anhidro-5-metiluridina, 5'-O-terc-Butildifenilsilil-2'-O-(2-hidroxietil)-5-metiluridina, 2'-O-[(2-ftalimidoxi)etil]-5'-t-butildifenilsilil-5-metiluridina, 5'-O-terc-butildifenilsilil-2'-O-[(2-formadroximinooxi)etil]-5-metiluridina, 5'-O-terc-Butildifenilsilil-2'-O-[N,N-dimetilaminooxietil]-5-metiluridina, 2'-O-(dimetilaminooxietil)-5-metiluridina, 5'-O-DMT-2'-O-(dimetilaminoxietil)-5-metiluridina, 5'-O-DMT-2'-O-(2-N,N-dimetilaminoxietil)-5-metiluridina-3'-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita], amidita de nucleósidos de 2'-(Aminooxietoxi), N2-isobutiril-6-O-difenilcarbamoil-2'-O-(2-etilacetil)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)guanosina-3'-[(2-caanoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita], amiditas de nucleósidos de 2'-dimetilaminoetoxietoxi (2'-DMAEOE), uridina de 2'-O-[2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)etil]-5-metilo, uridina de 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-[2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)-etil]-5-metil y uridina-3'-O-(cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita de 5'-O-Dimetoxitritil-2'-O-[2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)-etil]-5-metilo.

Ejemplo 2

Síntesis de Oligonucleótidos y Oligonucleósidos

Los compuestos antisentido utilizados de acuerdo a este invento pueden ser hechos convenientemente y rutinariamente por medio de la técnica bien conocida de síntesis de fase sólida. Equipos para aquellas síntesis son vendidos por varios proveedores, incluyendo, por ejemplo, a Applied Biosystems (Foster City, CA). Cualquier otro método para aquella síntesis conocido en la técnica podría ser utilizado adicionalmente o alternativamente. Es bien conocido el usar técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como derivados de fosforotioatos y alquilatados.

Oligonucleótidos: los oligonucleótidos de fosfodiestéres (P = O) no sustituidos y sustituidos son sintetizados en un sintetizador automatizado de ADN (Applied Biosystems modelo 394) utilizando química estándar defosforamiditas con oxidación por medio de yodo.

Los fosforotioatos (P = S) son sintetizados similarmente a los oligonucleótidos de fosfodiestéres con las siguientes excepciones: la tiación fue efectuada al utilizar el 10% masa/volumen de la solución de 1,1-dióxido de 3,4-dihidro-1,2-benzoditioil-3-ona en acetonitrilo para la oxidación de los enlaces de fosfito. El tiempo del paso de la reacción de tiación fue incrementado a 180 segundos y precedido por el paso de nivelación normal. Después de la división de

la columna CPG un desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55 °C (de 12 a 16 horas), los oligonucleótidos fueron recuperados por medio de precipitaciones con >3 volúmenes de etanol desde 1 M de una solución de NH₄OAc. Oligonucleótidos de fosfinatos son preparados tal como se describe en la patente de Estados Unidos 5,508,270.

5 Los oligonucleótidos de fosfonatos de alquilos son preparados tal como se describe en la patente de Estados Unidos 4,469,863.

10 Los oligonucleótidos de fosfonato de 3'-Deoxi-3'-metileno son preparados tal como se describe en las patentes de Estados Unidos 5,610,289 o 5,625,050.

Los oligonucleótidos de fosforamidita son preparados tal como se describe en la patente de Estados Unidos 5,256,775 o en la patente de Estados Unidos 5,366,878.

15 Los oligonucleótidos de Alquifosfonotioato son preparados tal como se describe en las aplicaciones publicadas PCT PCT/US94/00902 y PCT/US93/06976 (publicadas como WO 94/17093 y WO 94/02499, respectivamente).

20 Los oligonucleótidos de fosforamidatos de 3'-Deoxi-3'-amino son preparados tal como se describe en la patente de Estados Unidos 5,476,925.

Los oligonucleótidos de fosfotriesteres son preparados tal como se describe en la patente de Estados Unidos 5,023,243.

25 Los oligonucleótidos de fosfato de borano son preparados tal como se describe en las patentes de Estados Unidos 5,130,302 y 5,177,198.

30 Oligonucleósidos: oligonucleósidos enlazados a metilenemetilimino, también identificados como oligonucleósidos enlazados a MMI, oligonucleósidos enlazados a metilenedimetilhidrazo, también identificados como oligonucleósidos enlazados a MDH, y oligonucleósidos enlazados a metilene carbonilamino, también identificados como oligonucleósidos enlazados a amida-3, y oligonucleósidos enlazados a metileneaminocarbonilo, también identificados como oligonucleósidos enlazados a amida-4, así como compuestos de estructuras mixtas que tienen, por ejemplo, enlaces alternantes de MMI y P=O son preparados tal como se describe en las patentes de Estados Unidos 5,378,825, 5,386,023, 5,489,677, 5,602,240 y 5,610,289.

35 Oligonucleótidos enlazados a formacetal y tioformacetal son preparados tal como se describe en las patentes de Estados Unidos 5,264,562 y 5,264,564.

40 Los oligonucleótidos enlazados a óxido de etileno son preparados tal como se describe en la patente de Estados Unidos 5,223,618.

Ejemplo 3

Síntesis del ARN

45 En general, la química de la síntesis del ARN se basa en la incorporación selectiva de varios grupos protectores en reacciones intermediadoras estratégicas. Aunque una persona con conocimiento normal en la técnica entenderá el uso de grupos protectores en la síntesis orgánica, una clase útil de grupos protectores incluye a éteres de sililo. En particular, éteres voluminosos de sililo son utilizados para proteger al 5'-hidroxilo en combinación con un grupo protector de orto-ésteres ácidos de lábil en el 2'-hidroxilo. Este conjunto de grupos protectores es utilizado entonces con tecnología estándar para la síntesis de fases sólidas. Es importante el remover al último al grupo protector del orto-éster lábil ácido después de todos los otros pasos sintéticos. Además, el uso temprano de los grupos protectores de sililo durante la síntesis asegura una remoción fácil cuando sea deseado, sin una desprotección no deseada de hidroxilo de 2'.

55 Después de este procedimiento para la protección secuencial del 5'-hidroxilo en combinación con la protección del 2'-hidroxilo por los grupos protectores que son removidos diferencialmente y son volubles diferencialmente y químicamente, se procedió a sintetizar a los oligonucleótidos de ARN.

60 Los oligonucleótidos de ARN son sintetizados en forma de pasos. Cada nucleótido es agregado secuencialmente (en la dirección desde 3'- a 5') a un oligonucleótido enlazado a un soporte sólido. El primer nucleósido en el extremo de 3' de la cadena está adherido covalentemente a un soporte sólido. Se agregó el precursor de los nucleótidos, una fosforamidita de ribonucleósidos, y un activador, acoplando la 2ª base en el extremo 5' del primer nucleósido. El soporte es lavado y cualquier grupo no reaccionado de 5'-hidroxilo son tapados con anhídrido acético para generar a las partículas de 5'-acetilo. La vinculación es oxidada entonces a una

65

vinculación más estable y ultimadamente deseada P (V). Al final del ciclo de adhesión de nucleótidos, el grupo 5'-sililo es dividido con flúor. El ciclo es repetido para cada nucleótido subsiguiente.

Después de la síntesis, los grupos protectores de metilo en los fosfatos son divididos durante 30 minutos utilizando 1 M de trihidrato de disodio-2-carbamoil-2-cianoetileno-1,1-ditiolato (S₂Na₂) en DMF. La solución de desprotección es lavada del oligonucleótido enlazado a un soporte sólido utilizando agua. El soporte es tratado entonces con un 40% de metilamina en agua durante 10 minutos a 55 °C. Esta liberación de oligonucleótidos de ARN a la solución, desprotege a las aminas exocíclicas, y modifica a los grupos 2'. Los oligonucleótidos pueden ser analizados por un HPLC de intercambio de aniones en esta etapa.

Los grupos 2'- orto-ésteres son los últimos grupos protectores que deben ser removidos. El grupo protector de ortoéster de monoacetato de etilenglicol desarrollado por Dharmacon Research, Inc. (Lafayette, CO), es un ejemplo de un grupo protector útil de ortoésteres que, tienen las siguientes características importantes. Es estable en las condiciones de la síntesis de fosforamiditas de nucleósidos y en la síntesis de oligonucleótidos. Sin embargo, después de la síntesis de oligonucleótidos el oligonucleótido es tratado con metilamina que divide al oligonucleótido del soporte sólido y también remueve a los grupos acetilos de los ortoésteres. Los sustituyentes resultantes de 2-etil-hidroxiolos en el ortoéster extraen menos electrones que el precursor acetilado. Como resultado, el ortoéster modificado se vuelve más voluble para la hidrólisis catalizada por medio de ácidos. Específicamente, la tasa de división es de aproximadamente 10 veces más rápida después de que los grupos acetilos son removidos. Por lo tanto, este ortoéster posee suficiente estabilidad para ser compatible con la síntesis de oligonucleótidos y aun así, cuando se modifica subsiguientemente, permite que se lleve a cabo la desprotección bajo condiciones acuosas moderadas compatibles con el producto final de oligonucleótidos del ARN.

Adicionalmente, métodos para la síntesis de ARN son bien conocidos en la técnica (Scaringe, S. A. tesis de Ph.D., University of Colorado, 1996; Scaringe, S. A., et al., J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 11820-11821; Matteucci, M. D. y Caruthers, M. H. J. Am. Chem. Soc., 1981, 203, 3185-3191; Beaucage, S. L. y Caruthers, M. H. Tetrahedron Lett., 1981, 22, 1859-1862; Dahl, B. J., et al., Acta Chem. Scand., 1990, 44, 639-641; Reddy, M. P., et al., Tetrahedron Lett., 1994, 25, 4311-4314; Wincott, F. et al., Nucleic Acids (Acidos Nucleicos) Res., 1995, 23, 2677-2684; Griffin, B. E., et al., Tetrahedron, 1967, 23, 2301-2313; Griffin, B. E., et al., Tetrahedron, 1967, 23, 2315-2331).

Los compuestos antisentido de ARN (oligonucleótidos de ARN) para su utilización en este invento pueden sintetizarse por los métodos aquí presentados o pueden ser comprados de Dharmacon Research, Inc (Lafayette, CO). Una vez sintetizados, los compuestos antisentido de ARN complementarios pueden ser recocidos por medio de métodos conocidos en la técnica para formar compuestos antisentido de doble hebra (dúplex). Por ejemplo, los dúplex pueden ser formados al combinar 30 µl de cada una de las hebras complementarias de los oligonucleótidos de ARN (50 µM de la solución de oligonucleótidos de ARN) y 15 microlitros de 5X de amortiguador de recocido (100 mM de acetato de potasio, 30 mM de HEPES-KOH pH 7.4, 2 mM de acetato de magnesio) seguido de un calentamiento durante un minuto a 90 °C, luego una hora a 37 °C. Los compuestos antisentido dúplex resultantes fueron utilizados en botiquines, ensayos, pruebas y otros métodos para investigar el rol de un ácido nucleico objetivo.

Ejemplo 4

Síntesis de Oligonucleótidos Quiméricos

Los oligonucleótidos, oligonucleósidos u oligonucleótidos/oligonucleósidos quiméricos mezclados del invento pueden ser de diferentes tipos. Estos incluyen un primer tipo donde el segmento "vacío" de nucleósidos enlazados es posicionado entre los segmentos "ala" entre 5' y 3' de los nucleósidos enlazados y un 2º tipo de "extremo abierto" donde el segmento "vacío" está ubicado en la terminal de 3' o de 5' del compuesto oligomérico. Los oligonucleótidos del primer tipo también son conocidos en la técnica como "gapmers" u oligonucleótidos con vacíos. Los oligonucleótidos del 2º tipo también son conocidos en la técnica como "hemimers" o "wingmers".

Oligonucleótidos Quiméricos de Fosfortioato [2'-O-Me]--[2'-deoxi]--[2'-O-Me]

Los oligonucleótidos quiméricos que tienen segmentos oligonucleótidos de fosfortioato de 2'-O- alquilo y 2'-deoxi son sintetizados utilizando un sintetizador de ADN automatizado de Applied Biosystems modelo 394, tal como se mencionó anteriormente. Los oligonucleótidos son sintetizados utilizando el sintetizador automatizado y 2'-deoxi-5'-dimetoxitritil-3'-O-fosfor-amidita para la porción de ADN y 5'-dimetoxitritil-2'-O-metil-3'-O-fosforamidita para las alas de 5' y de 3'. El ciclo de síntesis de estándares es modificado al incorporar pasos de acoplamiento con tiempos incrementados de reacción para la 5'-dimetoxitritil-2'-O-metil-3'-O-fosforamidita. El oligonucleótido completamente protegido es dividido del soporte y desprotegido en amonio concentrado (NH₄OH) durante 12-16 horas a 55 °C. El oligo es desprotegido y entonces recuperado por medio de un método apropiado (preparación, cromatografía de columnas, volumen reducido al vacío y analizado por medio de espectrofotometría para su producción y por pureza por medio de electroforesis capilar y por medio de espectrometría de masa.

Oligonucleótidos Quiméricos de Fosforotioato de [2'-O-(2-Metoxietil)]--[2'-deoxi]--[2'-O-(Metoxietilo)]

5 Oligonucleótidos quiméricos de Fosforotioato [2'-O-(2-Metoxietil)]--[2'-deoxi]--[2'-O-(Metoxietilo)] fueron preparados de acuerdo al procedimiento mencionado anteriormente para el nucleótido quimérico de 2'-O-metilo, con la sustitución de las amiditas de 2'-O-(metoxietil) para las amiditas de 2'-O-metilo.

Oligonucleótidos Quiméricos [2'-O-(2-Metoxietil)fosfodiéster]--[Fosforotioato de 2'-deoxi]--[Fosfodiéster de 2'-O-(2-Metoxietilo)]

10 Los oligonucleótidos quiméricos [2'-O-(2-Metoxietil)fosfodiéster]--[Fosforotioato de 2'-deoxi]--[Fosfodiéster de 2'-O-(2-Metoxietilo)] son preparados de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente para el oligonucleótido quimérico de 2'-O-metilo con la sustitución de amiditas de 2'-O-(metoxietilo) para las amiditas de 2'-O-metilo, la oxidación con yodo para generar a los enlaces internucleosídicos de fosfodiéster dentro de las porciones ala para las estructuras quiméricas y la sulfurización utilizando 1,1 dióxido de 3,4-dihidro-1,2,4-benzoditiol-3-ona (Beaucage Reagent (Reactivo)) para generar los enlaces internucleosídicos de fosforotioato para el vacío central.

Otros oligonucleótidos quiméricos, oligonucleósidos quiméricos y oligonucleótidos/oligonucleósidos quiméricos mezclados son sintetizados de acuerdo a la patente de Estados Unidos 5,623,065.

20 **Ejemplo 5**

Diseño y examinación de compuestos antisentido dúplex que usan como objetivo al receptor de la hormona de crecimiento

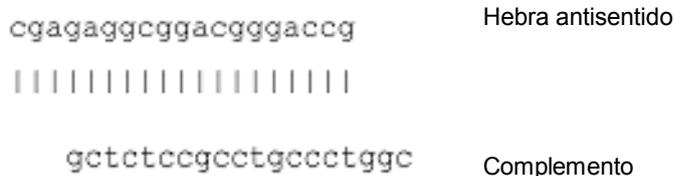
25 Una serie de dúplex de ácidos nucleicos que comprenden a los compuestos antisentido para su uso en este invento y sus complementos pueden ser diseñados para usar como objetivo al receptor de la hormona de crecimiento. En una realización, estos ácidos nucleicos dúplex son compuestos de ARN de doble hebra (ARNs pequeños que interfieren o siARNs - small interfering RNAs). En general, los lugares activos para oligonucleótidos antisentido que dependen de la ribonucleasa H predicen lugares activos del siARN (Vickers et al., 2003, J. Biol Chem. 278, 7108-7118). En una realización, la secuencia de bases nitrogenadas de la hebra antisentido del dúplex comprende por lo menos una porción de una secuencia de oligonucleótidos que se muestran en la tabla 1. Alternativamente, una nueva "caminata genética" en la cual varios dsARNs dirigidos al receptor de la hormona de crecimiento son sintetizados y probados para ver si pueden ser utilizados.

35 Los extremos de las hebras de la dsARN podrían ser modificados al agregar una o más bases nitrogenadas naturales o modificadas para formar una saliente. La hebra sentido de la dsARN es designada entonces y sintetizada como el complemento de la hebra antisentido y también podría contener modificaciones o adiciones a cualquiera de las terminales. Por ejemplo, en una realización, ambas hebras del dúplex de dsARN serían complementarias sobre las bases nitrogenadas centrales, cada una teniendo salientes en una o ambas terminales. El dúplex podría ser unimolecular o di-molecular; es decir, las 2 hebras podrían estar conectadas entre sí directamente o por medio de un vinculador, o podrían ser moléculas separadas.

45 En forma de ejemplo, un dúplex que comprende una hebra antisentido que tiene la secuencia CGAGAGGCGGACGGGACCG y que tiene una salida de 2 bases nitrogenadas de deoxitimidina (dT) tendría la siguiente estructura:



55 En otra realización, un dúplex que comprende una hebra antisentido que tiene la misma secuencia CGAGAGGCGGACGGGACCG podría prepararse con extremos romos (ni una sola saliente con hebras) tal como se mostró:



Las hebras de ARN del dúplex pueden ser sintetizadas por medio de los métodos aquí presentados o compradas de Dharmacon Research Inc., (Lafayette, CO). Una vez sintetizadas, las hebras complementarias son recocidas. Las hebras individuales son divididas en porciones y diluidas a una concentración de 50 μ M. Una vez diluidas, 30 μ l de cada hebra es combinada con 15 μ l de una solución 5X de amortiguador de recocido. La concentración final de dicho amortiguador es 100 mM de acetato de potasio, 30 mM de HEPES-KOH pH 7.4, y 2mM de acetato de magnesio. El volumen final es 75 μ l. La solución es incubada durante un minuto a 90 °C y luego centrifugada durante 15 segundos. Al tubo se le permite reposar durante una hora a 37 °C, tiempo durante el cual los dúplex de dsARN son utilizados en experimentaciones. La concentración final del dúplex de dsARN es 20 μ M. La solución puede ser almacenada en una forma congelada (-20 °C) y congelada-descongelada hasta 5 veces.

Una vez preparados, los compuestos antisentido dúplex son evaluados para detectar su capacidad para modular a la expresión del receptor de la hormona de crecimiento.

Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia, fueron tratadas con compuestos antisentido dúplex. Para células cultivadas en placas de 96 pozos, los pozos fueron lavados una vez con 200 μ l de un medio sérico reducido OPTI-MEM-1 (Gibco BRL) y luego se trató con 130 μ l de OPTI-MEM-1 que contenía 12 μ g/mililitros de LIPOFECTINA (Gibco BRL) y el compuesto antisentido dúplex deseado a una concentración final de 200 nM. Después de 5 horas de tratamiento, el medio es reemplazado con un medio fresco. Las células fueron cultivadas 16 horas después del tratamiento, en cuyo momento el ARN fue aislado y la reducción del objetivo fue medida por RT-PCR.

Ejemplo 6

Aislamiento de los Oligonucleótidos

Después de la división del soporte sólido de vidrio de poros controlados y del desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55 °C durante 12-16 horas, los oligonucleótidos o los oligonucleósidos son recuperados por medio de precipitaciones de 1M de NH₄OAc con volúmenes >3 de etanol. Los oligonucleótidos sintetizados fueron analizados por medio de espectroscopía de masa de electro aerosol (determinación de la masa molecular) y por medio de electroforesis de gel capilar y se estimó que era por lo menos un 70% de la longitud completa del material. Los montos relativos de los enlaces de fosforotioatos y fosfodiesteres obtenidos en la síntesis se determinó por la tasa de masa molecular correcta en relación a los -16 amu del producto (+/-32 +/-48). Para algunos estudios los oligonucleótidos fueron purificados por medio de HPLC, tal como se describió por Chiang et al., J. Biol. Chem. 1991, 266, 18162-18171. Los resultados obtenidos con el material purificado por HPLC fueron similares a aquellos obtenidos con el material no purificado por medio de HPLC.

Ejemplo 7

Síntesis de Oligonucleótidos - Formato de Placas de 96 Pozos

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por medio de química de fosforamiditas de fase sólida P(III) en un sintetizador automatizado capaz de ensamblar 96 secuencias simultáneamente en un formato de 96 pozos. Los enlaces internucleosídicos de fosfodiesteres fueron generados por medio de oxidación en yodo acuoso. Los enlaces internucleosídicos de fosforotioato fueron generados por medio de sulfurización utilizando 1,1 dióxido de 3,4-dihidro-2H-1,2-benzoditioal-3-ona (Beaucage Reagent) en acetonitrilo anhídrido. Las fosforamidita de beta-cianoetil-diiso-propilo de base estándar protegida fue comprada de proveedores comerciales (por ejemplo, PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, o Pharmacia, Piscataway, NJ). Los nucleósidos que no eran estándar fueron sintetizados por medio de métodos estándar o patentados. Ellos son utilizados como fosforamiditas de beta-cianoetildiisopropilo de bases protegidas.

Los oligonucleótidos fueron divididos del soporte y fueron desprotegidos con NH₄OH concentrado a temperaturas elevadas (55-60 °C) durante 12-16 horas y el producto liberado fue entonces secado al vacío. El producto seco fue entonces re-suspendido en agua estéril para generar una placa maestra de la cual todas las muestras de las placas analíticas y de prueba fueron entonces diluidas utilizando pipetas robóticas.

Ejemplo 8

Análisis de Oligonucleótidos - Formato de Placas de 96 Pozos

La concentración de los oligonucleótidos en cada pozo fue evaluada por medio de la dilución de muestras y la espectroscopía de absorción de UV. La integridad de longitud completa de los productos individuales fue evaluada por medio de electroforesis capilar (CE - capillary electrophoresis) en un formato de 96 pozos (Beckman P/ACE™ MDQ) o, para muestras preparadas individualmente, un aparato comercial de CE (por ejemplo, Beckman P/ACE™

5000, ABI 270). La composición base y de la estructura fue confirmada por análisis de masa de los compuestos utilizando espectros con espectroscopia de masa por electro aerosol. Todas las placas de pruebas de ensayo fueron diluidas de la placa maestra utilizando pipetas robóticas de un solo canal y de canales múltiples. Se estimó que las placas eran aceptables si por lo menos el 85% de los compuestos en la placa tenían un 85% de la longitud completa.

Ejemplo 9

Cultivo Celular y Tratamiento de Oligonucleótidos

El efecto de los compuestos antisentido en la expresión objetivo de ácidos nucleicos puede probarse en cualquiera de una variedad de tipos celulares siempre y cuando el ácido nucleico objetivo esté presente a niveles medibles. Esto puede determinarse rutinariamente utilizando, por ejemplo, el análisis PCR o de Northern blot. Los siguientes tipos celulares son suministrados para propósitos ilustrativos, pero otros tipos celulares pueden ser utilizados rutinariamente, siempre y cuando el objetivo esté expresado en el tipo celular escogido. Esto puede determinarse fácilmente por medio de métodos rutinarios en la técnica, por ejemplo, el análisis de Northern blot, ensayos de protección de ribonucleasas, o RT-PCR.

Células T-24:

La línea celular T-24 de carcinoma de vejiga de células de transición humanas fue obtenida del American Type Culture Collection (ATCC - la Colección Americana de Tipos de Cultivos) (Manassas, VA). Las células T-24 fueron cultivadas rutinariamente en un medio completo basal 5A de McCoy (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) suplementado con un 10% de suero fetal de ternero (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), penicilina 100 unidades por mililitro, y estreptomycin de 100 µg por mililitro (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Las células fueron pasadas rutinariamente por medio de tripnización y dilución cuando alcanzaron una confluencia del 90%. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos (Falcon-Primaria #353872) a una densidad de 7000 células/pozo para su uso en un análisis de RT-PCR.

Para análisis de Northern blot o de otro tipo, las células podrían ser sembradas en 100 mm u otras placas de cultivos de tejidos estándar y tratadas en forma similar, utilizando volúmenes apropiados de medio y de oligonucleótidos.

Células A549:

La línea celular A549 de carcinoma de pulmón humano fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC - la Colección Americana de Tipos de Cultivos) (Manassas, VA). Las células A549 fueron cultivadas rutinariamente en un medio basal DMEM (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) suplementada con un 10% de suero fetal de ternero (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), penicilina 100 unidades por mililitro, y estreptomycin de 100 µg por mililitro (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Las células fueron pasadas rutinariamente por medio de tripnización y dilución cuando alcanzaron el 90% de confluencia.

Células NHDF:

Fibroblastos dermicos neonatales humanos (NHDF - Human neonatal dermal fibroblast) fueron obtenidos de Clonetics Corporation (Walkersville, MD). Los NHDFs fueron mantenidos rutinariamente en un medio de crecimiento de fibroblastos (Clonetics Corporation, Walkersville, MD) suplementados tal como fue recomendado por el proveedor. Las células fueron mantenidas por hasta 10 pases tal como lo recomendó el proveedor.

Células HEK:

Los queratinocitos embrionarios humanos (HEK - Human embryonic keratinocytes) fueron obtenidos de Clonetics Corporation (Walkersville, MD). Los HEKs fueron mantenidos rutinariamente en un medio de crecimiento de queratinocitos (Clonetics Corporation, Walkersville, MD) formulado tal como lo recomendó el proveedor. Las células fueron mantenidas rutinariamente por hasta 10 pases tal como lo recomendó el proveedor.

MCF7:

La línea celular MCF-7 de carcinoma de mama humana fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC - la Colección Americana de Tipos de Cultivos) (Manassas, VA). Las células MCF-7 fueron cultivadas rutinariamente DMEM de glucosa baja (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD) suplementada con un 10% de suero fetal de becerro (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD). Las células fueron pasadas rutinariamente por medio de tripnización y dilución cuando alcanzaron el 90% de confluencia. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos (Falcon-Primaria #3872) a una densidad de 7000 células/pozo para su uso en el análisis RT-PCR.

Para Northern blots u otros análisis, las células pueden sembrarse a 100 mm u otras placas estándar de cultivos de tejidos y pueden ser tratadas similarmente, utilizando volúmenes apropiados de medios y oligonucleótidos.

5

Células b.END:

La línea celular b.END endotelial de cerebro de ratón fue obtenida del Dr. Werner Risau en el Max Plank Institute (Bad Nauheim, Alemania). Las células b.END fueron cultivadas rutinariamente en DMEM, de alta glucosa (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD) suplementadas con un 10% de suero fetal de becerro (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD). Las células fueron pasadas rutinariamente por medio de triplicación y dilución cuando alcanzaron el 90% de confluencia. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos (Falcon-Primaria #3872) a una densidad de 3000 células/pozo para su uso en análisis de RT-PCR.

10

15

Para un análisis de Northern blots y de otro tipo, las células pueden ser sembradas en 100 mm u otras placas de cultivo celular estándar y tratadas similarmente, utilizando volúmenes apropiados de medios y de oligonucleótidos.

Tratamiento con compuestos antisentido:

20

Cuando las células alcanzaron un 65-75% de confluencia, fueron tratadas con oligonucleótidos. Para las células cultivadas en placas de 96 pozos, los pozos fueron lavados una vez con 100 µl de un medio sérico reducido con OPTI-MEM™-1 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) y entonces fueron tratados con 130 µl de OPTI-MEM™-1 que contenía 3.75 microgramos/mililitro de LIPOFECTIN™ (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) y la concentración deseada de oligonucleótidos. Las células fueron tratadas y la información fue obtenida por triplicado. Después de 4-7 horas de tratamiento a 37 °C, el medio fue reemplazado con un medio fresco. Las células fueron cultivadas 16-24 horas después del tratamiento de los oligonucleótidos.

25

La concentración de oligonucleótidos que se utilizó vario entre cada línea celular. Para determinar la concentración óptima de oligonucleótidos para una línea celular específica, las células son tratadas con un oligonucleótido de control positivo en un rango de varias concentraciones. Para las células humanas el oligonucleótido de control positivo es seleccionado de ISIS 13920 (**TCCGTCATCGCTCCTCAGGG**, IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1) la cual fue orientada hacia H-ras, o ISIS 18078, HUMANAS (**GTGCGCGAGCCCGAAATC**, IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2) la cual fue orientada a las quinasas-2 de la terminal Jun-N humana (JNK2 - Jun-N-terminal kinase-2). Ambos controles son gapmers de 2'-O-metoxietilo (2'-O-metoxietilos mostrados en negrillas) con una estructura de fosforotioato. Para células de ratones o de ratas el oligonucleótido de control positivo es ISIS 15770, **ATGCATTCTGCCCCAAGGA**, IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 3, un gapmer 2'-O-metoxietilo (2'-O-metoxietilos mostrados en negrillas) con una estructura de fosforotioato que es orientada hacia el ratón y la rata c-raf. La concentración de oligonucleótidos de control positivo que resultaron en un 80% de inhibición de ARNm de c-H-ras (para ISIS 13920), JNK2 (para ISIS 18078) o c-raf (para ISIS 15770) es utilizada entonces como una concentración de examinación para nuevos oligonucleótidos en experimentos subsiguientes para aquella línea celular. Si el 80% de inhibición no fue alcanzado, la concentración más baja de los oligonucleótidos de control positivo que resultaron en un 60% de inhibición del ARNm de c-H-ras, JNK2 o c-raf es utilizada entonces como la concentración de examinación de los oligonucleótidos en experimentos subsiguientes para aquella línea celular. Si el 60% de inhibición no fue alcanzado, aquella línea celular específica es considerada como no apropiada para experimentos de transfección de oligonucleótidos. Las concentraciones de oligonucleótidos antisentido aquí utilizadas son de 50 nM a 300 nM.

30

35

40

45

Ejemplo 10

50

Análisis de inhibición de oligonucleótidos de la expresión del receptor de la hormona de crecimiento

La modulación antisentido de la expresión del receptor de la hormona de crecimiento puede ser probada en una variedad de formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los niveles del ARNm del receptor de la hormona de crecimiento pueden cuantificarse por medio de, por ejemplo, un análisis de Northern blots, reacciones en cadena de polimerasa competitivas (PCR - polymerase chain reaction), o PCR en tiempo real (RT-PCR - real-time PCR). El PCR cuantitativo en tiempo real es preferido actualmente. El análisis de ARN puede realizarse en ARN o poly(A)+ mRNA celular total. El método preferido de análisis de ARN es el uso de ARN celular total tal como se describió en otros ejemplos en este documento. Métodos para el aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. Los análisis de Northern blots también son rutinarios en la técnica. (PCR) cuantitativo en tiempo real puede lograrse convenientemente utilizando los sistemas de detección secuencial ABI PRISM™ 7600, 7700, o 7900 los cuales son comercialmente disponibles, de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y utilizadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

55

60

Los niveles proteínicos del receptor de la hormona de crecimiento pueden cuantificarse en una variedad de

65

formas bien conocidas en la técnica, tales como inmunoprecipitación, análisis de western blots (inmuno-manchado), ensayo por inmunoadsorción vinculado a enzimas (ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay), organización celular activada por fluorescencia (FACS - fluorescence-activated cell sorting). Los anticuerpos dirigidos al receptor de la hormona de crecimiento pueden ser identificados y obtenidos de una variedad de fuentes, tales como el catálogo MSRS de anticuerpos (Aerie Corporation, Birmingham, MI), o pueden ser preparados por medio de métodos de generación de anticuerpos monoclonales o policlonales los cuales son bien conocidos en la técnica.

La reducción en la expresión del receptor de la hormona de crecimiento también puede medirse indirectamente al medir las reducciones del factor de crecimiento similar a la insulina-I en el suero y otros fluidos, tejidos u órganos corporales.

Ejemplo 11

Diseño de ensayos fenotípicos y estudios in vivo para el uso de inhibidores del receptor de la hormona de crecimiento

Ensayos fenotípicos

Una vez que los inhibidores del receptor de la hormona de crecimiento han sido identificados por los métodos aquí descritos, los compuestos son investigados aún más en uno o más ensayos fenotípicos, teniendo cada uno puntos finales medibles los cuales son pronosticables en cuanto a su eficacia en el tratamiento de un estado o condición de enfermedad en particular. Los ensayos fenotípicos, los botiquines y los reactivos para su uso son bien conocidos para aquellas personas con conocimiento en la técnica y son utilizados en este documento para investigar el rol y/o la asociación con el receptor de la hormona de crecimiento en salud y enfermedad. Los ensayos fenotípicos representativos, los cuales pueden ser comprados de cualquiera de varios proveedores comerciales, incluyendo aquellos para determinar la viabilidad celular, la cito toxicidad, la proliferación celular o la supervivencia celular (Molecular Probes, Eugene, OR; PerkinElmer, Boston, MA), los ensayos que se basan en proteínas incluyendo ensayos enzimáticos (Panvera, LLC, Madison, WI; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ; Oncogene Research Products, San Diego, CA), la regulación celular, la transducción de señalización, la inflamación, los procesos oxidantes y la apoptosis (Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI), la acumulación de triglicéridos (SigmaAldrich, St. Louis, MO), los ensayos de angiogénesis, los ensayos de formación de cubos, los ensayos de citoquinas y hormonas y los ensayos metabólicos (Chemicon International Inc., Temecula, CA; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

En un ejemplo no limitante, células que se determinaron ser apropiadas para un ensayo fenotípico en particular (es decir, células MCF-7 seleccionadas para estudios del cáncer de la mama; adipocitos para estudios de la obesidad) son tratadas con inhibidores del receptor de la hormona de crecimiento identificadas a partir de los estudios in vitro, así como compuestos de control a concentraciones óptimas los cuales se determinaron mediante los métodos descritos anteriormente. Al final del periodo de tratamiento, las células tratadas y no tratadas son analizadas por uno o más métodos específicos para el ensayo para determinar los resultados y los puntos finales fenotípicos.

Los puntos finales fenotípicos incluyen cambios en la morfología celular a lo largo del tiempo o la dosis de tratamiento, así como cambios en los niveles de los componentes celulares tales como las proteínas, los lípidos, los ácidos nucleicos, las hormonas, los sacáridos o los metales. Mediciones del estado celular que incluye el pH, la etapa del ciclo celular, la ingestión o la excreción de indicadores biológicos por la célula, también son puntos finales de interés.

Análisis del genotipo de la célula (medición de la expresión de uno o más genes de la célula) después del tratamiento también se utilizan como un indicador de la eficacia o la potencia de los inhibidores del receptor de la hormona de crecimiento. Genes representativos, o aquellos genes que se sospecha que están asociados con un estado, condición o fenotipo de enfermedad específica, son medidos en células tratadas y no tratadas.

Estudios in vivo

Los sujetos individuales de los estudios in vivo aquí descritos son animales vertebrados de sangre caliente, que incluyen a humanos.

El ensayo clínico es sujeto a controles rigurosos para asegurar que los individuos no estén corriendo riesgos innecesariamente y que están completamente informados acerca de su rol en el estudio. Para contabilizar los efectos psicológicos de la recepción de tratamientos, los voluntarios son administrados aleatoriamente placebos o inhibidores del receptor de la hormona de crecimiento. Además, para prevenir que los doctores se parcialicen en relación a los tratamientos, ellos no están informados acerca de si el medicamento que están administrando es un inhibidor del receptor de la hormona de crecimiento o un placebo. Utilizando este método aleatorio, cada voluntario tiene la misma oportunidad de recibir al nuevo tratamiento o al placebo.

Los voluntarios reciben al inhibidor del receptor de la hormona de crecimiento o al placebo durante un período de 8 semanas con parámetros biológicos asociados con el estado o condición de la enfermedad indicada que se va midiendo al inicio (las mediciones de línea base antes de cualquier tratamiento), al final (después del final del tratamiento), y a intervalos regulares durante el período de estudio. Aquellas mediciones incluyen los niveles de las moléculas de ácido nucleico que codifican al receptor de la hormona de crecimiento o a los niveles proteínicos del receptor de la hormona de crecimiento en fluidos, tejidos u órganos corporales en comparación con los niveles pre-tratamiento. Otras medidas incluyen, pero no se limitan a, índices del estado o condición de la enfermedad que se está tratando, la masa corporal, la presión sanguínea, títulos séricos de indicadores farmacológicos de la enfermedad o de la toxicidad, así como medidas ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción).

La información registrada para cada paciente incluye la edad (años), el género, la altura (centímetros), el historial familiar del estado o condición de la enfermedad (sí/no), clasificación de la motivación (algo/moderada / bastante) y el número y tipo de regímenes previos de tratamiento para la enfermedad o condición indicada.

Voluntarios que participaron en este estudio son adultos saludables (edades entre 18 y 65 años de edad) y aproximadamente un número igual de hombres y mujeres participaron en el estudio. Voluntarios con ciertas características fueron distribuidos igualmente para el tratamiento con placebo y con el inhibidor del receptor de la hormona de crecimiento. En general, los voluntarios tratados con placebo tuvieron una respuesta pequeña o ninguna respuesta al tratamiento, mientras que los voluntarios tratados con el inhibidor del receptor de la hormona de crecimiento mostraron tendencias positivas en su índice de estado o condición de la enfermedad cuando finalizó el estudio.

Ejemplo 12

Aislamiento de ARN

Aislamiento de Poly(A) + mRNA

El Poly(A)+ mRNA fue aislado de acuerdo a Miura et al., (*Clin. Chem.*, **1996**, *42*, 1758-1764). Otros métodos para el aislamiento de poly(A)+ ARNm son rutinarios en la técnica. Brevemente, para las células cultivadas en placas de 96 pozos, el medio de crecimiento fue removido de las células y cada pozo se lavó con 200 μ l de PBS frío. Se agregaron 60 μ l de amortiguador de lisis (10 mM de Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM de EDTA, 0.5 M de NaCl, 0.5% de NP-40, 20 mM de un complejo vanadilo-ribonucleósido) fue agregado a cada pozo, la placa fue agitada suavemente y luego incubada a la temperatura del cuarto durante 5 minutos. 55 μ l del lisado fueron transferidos a placas de 96 pozos (AGCT Inc., Irvine CA) cubiertas con Oligo d(T). Las placas fueron incubadas durante 60 minutos a la temperatura del cuarto, lavadas 3 veces con 200 μ l de amortiguador de lavado (10 mM de Tris-HCl pH 7.6, 1 mM de EDTA, 0.3 M de NaCl). Después del lavado final, la placa fue manchada en toallas de papel para remover el exceso de amortiguador de lavado y luego secada con aire durante 5 minutos. Se agregaron 60 μ l de amortiguador de elución (5 mM de Tris-HCl pH 7.6), recalentados a 70 °C en cada pozo, la placa fue incubada en una placa caliente a 90 °C durante 5 minutos, y el eluido fue transferido entonces a una placa fresca de 96 pozos.

Las células cultivadas en placas de 100 mm o de otro estándar pueden ser tratada similarmente, utilizando volúmenes apropiados de todas las soluciones.

Aislamiento total de ARN

El ARN total fue aislado utilizando un botiquín RNEASY 96™ y amortiguadores comprados de Qiagen Inc. (Valencia, CA) siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante. Brevemente, para las células cultivadas en placas de 96 pozos, el medio de crecimiento fue removido de las células y cada pozo fue lavado con 200 μ l de PBS frío. Se agregaron 150 μ l de amortiguador RTL a cada pozo y la placa fue agitada vigorosamente durante 20 segundos. 150 μ l de un 70% de etanol se agregó entonces a cada pozo y los contenidos fueron mezclados por medio de pipetas 3 veces de arriba a abajo. Las muestras fueron transferidas entonces a la placa de pozos RNEASY 96™ la cual estaba adjunta a colector QIAVAC™ calzado con una bandeja de recolección de desperdicios y adjunto a una fuente de succión. El vacío fue aplicada durante un minuto. 500 μ l del amortiguador RW1 fueron agregados a cada pozo de la placa RNEASY 96™ e incubados durante 15 minutos y el vacío fue aplicado nuevamente durante un minuto. Se agregaron 500 μ l adicionales del amortiguador RW1 a cada pozo de la placa RNEASY 96™ y la succión fue aplicada durante 2 minutos. Se agregó un micro litro de amortiguador RPE a cada pozo de la placa RNEASY 96™ y la succión fue aplicada durante un período de 90 segundos. El lavado del amortiguador RPE fue repetido entonces y la succión fue aplicada durante unos 3 minutos adicionales. La placa fue removida entonces del colector QIAVAC™ y secada en toallas de papel. La placa fue adherida nuevamente entonces al colector QIAVAC™ calzado con una estantería de tubos de recolección que contenía tubos de recolección de una. 2 ml. El ARN fue diluido entonces con pipetas colocando 140 μ l de Ribó nucleasas libres de agua en cada pozo, incubándose durante un minuto, y luego aplicando el vacío durante 3 minutos.

El uso repetitivo de pipetas y de los pasos de elución pueden ser automatizados utilizando el QIAGEN Bio-Robot 9604 (Qiagen, Inc., Valencia CA). Esencialmente, después de lisar a las células en la placa del cultivo, la placa es transferida a la cubierta del robot donde el uso de pipetas, los pasos de tratamiento y de elución de la deoxirribonucleasa son ejecutados.

5

Ejemplo 13

Análisis PCR Cuantitativo en Tiempo Real del Receptor de los Niveles de ARNm de la Hormona de Crecimiento

10

La cuantificación de los niveles del ARNm del receptor de la hormona de crecimiento se logró por medio de PCR cuantitativo en tiempo real utilizando el sistema de detección secuencial ABI PRISM™ 7600, 7700, o 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este es un sistema de detección de fluorescencia de tubo cerrado, que no se basa en gel, que permite cuantificaciones de alto caudal de productos de reacción es en cadena de polimerasa (PCR - polymerase chain reaction) en tiempo real. Al contrario que en el caso del PCR estándar en el cual los productos de amplificación son cuantificados después de que el PCR ha sido completado, los productos en el PCR cuantitativo en tiempo real son cuantificados mientras se van acumulando. Esto se logra al incluir en la reacción de PCR una sonda de oligonucleótidos que reconoce específicamente entre los cebadores PCR hacia adelante y en reversa, y contiene 2 coloraciones fluorescentes. Un colorante reportador (por ejemplo, FAM o JOE, obtenidos de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Operon Technologies Inc., Alameda, CA o Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA) es adherida al extremo 5' de la sonda y una coloración neutralizadora (por ejemplo, TAMRA, obtenida de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Operon Technologies Inc., Alameda, CA o Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA) es adherida al extremo 3' de la sonda. Cuando la sonda y las coloraciones están intactas, la emisión de la coloración reportadora es neutralizada por la proximidad de la coloración de neutralización en el 3'. Durante la amplificación, el recocido de la sonda a la secuencia objetivo crea un sustrato que puede ser dividido por la actividad exonucleasa de 5' de la polimerasa Taq. Durante la fase de extensión del ciclo de amplificación del PCR, la división de la sonda por la polimerasa Taq libera a la coloración reportadora del resto de la sonda (y por lo tanto de la partícula neutralizadora) y una señal fluorescente de secuencia específica es generada. Con cada ciclo, moléculas adicionales de la coloración reportadora son divididas de sus sondas respectivas, y la intensidad de fluorescencia es monitoreada en intervalos regulares por medio de óptica láser integrada en el sistema de detección secuencial de ABI PRISM™. En cada ensayo, una serie de reacciones paralelas que contienen diluciones en serie del ARNm de muestras de control no tratadas genera una curva estándar que es utilizada para cuantificar la inhibición porcentual después del tratamiento de oligonucleótidos antisentido de las muestras de prueba.

35

Antes del análisis cuantitativo de PCR, conjuntos cebadores - sondas específicos al gen objetivo que se está midiendo son evaluados para detectar su capacidad para ser "multiplexados" con una reacción de amplificación GAPDH. En el multiplexamiento, el gen objetivo y el gen estándar interno de GAPDH son amplificados concurrentemente en una sola muestra. En este análisis, el ARNm aislado de las células no tratadas es diluido en serie. Cada dilución es amplificada en la presencia de los conjuntos de cebadores - sondas específicos, únicamente para GAPDH, únicamente para el gen objetivo ("un solo-plex"), o para ambos (multiplex). Después de la amplificación de PCR, curvas estándar de las señales ARNm GAPDH y objetivo en función de la dilución son generadas de muestras de un solo plex y de varios plex. Si la inclinación y el coeficiente de correlación de la GAPDH y las señales objetivo generadas de las muestras multiplexadas caen dentro del 10% de sus valores correspondientes generados de las muestras de un solo plexamiento, el conjunto de cebadores - sondas específico para el objetivo se estima que tiene la capacidad de ser multiplexado. Otros métodos de PCR también son conocidos en la técnica.

40

Los reactivos PCR fueron obtenidos de Invitrogen Corporation, (Carlsbad, CA). Las reacciones RT-PCR fueron ejecutadas al agregar 20 µl de un cóctel PCR (2.5x de amortiguador PCR menos MgCl₂, 6.6 mM de MgCl₂, 375 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 375 nM de cada uno de cebador hacia adelante y cebador en reversa, 125 nM de la sonda, 4 unidades del inhibidor de ribonucleasa, 1.25 unidades de PLATINUM® Taq, 5 unidades de la transcriptasa en reversa de MuLV, y 2.5x de la coloración ROX) a placas de 96 pozos que contenían 30 µl de una solución de ARN total (20-200 ng). La reacción RT fue ejecutada por medio de incubación durante 30 minutos a 48 °C. Después de una incubación durante 10 minutos a 95 °C para activar al PLATINUM® Taq, se ejecutaron 40 ciclos de 2 pasos de protocolo de PCR: 95 °C durante 15 segundos (desnaturalización) seguido por 60 °C durante 1.5 minutos (recocido/extensión).

55

Las cantidades obtenidas del objetivo genético por el RT-PCR en tiempo real son analizadas utilizando el nivel de expresión de GAPDH, un gen cuya expresión es constante, o al cuantificar al ARN total utilizando RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). La expresión GAPDH es cuantificada por medio de RT-PCR en tiempo real, o al ejecutarse simultáneamente con el objetivo, por medio de multiplexado, o por separado. El ARN total es cuantificado utilizando el reactivo de cuantificación de ARN RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). Los métodos de cuantificación de ARN de RiboGreen™ son enseñados en Jones, L.J., et al, (Analytical Biochemistry (Bioquímica Analítica), 1998, 265, 368-374).

65

En este ensayo, 170 µl del reactivo de trabajo RiboGreen™ (reactivo RiboGreen™ diluido a 1:350 en 10mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 7.5) colocado con pipetas en una placa de 96 pozos que contienen 30 µl de ARN celular purificado. La placa es leída en un CytoFluor 4000 (PE Applied Biosystems) con una excitación de 485 nm y una emisión de 530 nm.

Las ondas y cebadores para el receptor de la hormona de crecimiento humana fueron diseñadas para hibridarse a una secuencia de receptor de hormona de crecimiento humana, utilizando información secuencial publicada (acceso del GenBank (Banco Genético) número NM_000163.1, incorporado en este documento como la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 4). Para el receptor de la hormona de crecimiento humana los cebadores de PCR fueron:

cebador hacia adelante: GATGTCCCAATGTGACATGCA (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 5)
 cebador en reversa: AAGTAGGCATTGTCCATAAGGAAGTT (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 6)
 y la sonda PCR fue: FAM-CCGGAATGGTCTCACTCTGCCAAGA-TAMRA (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 7), donde FAM es el colorador fluorescente y TAMRA es el colorador neutralizador. Para la GAPDH humana los cebadores PCR fueron:

cebador hacia adelante: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 8)
 cebador en reversa: GAAGATGGTGATGGGATTTC (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 9) y la sonda PCR fue: 5' JOE-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC- TAMRA 3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 10) donde JOE es el colorante fluorescente reportador y TAMRA es el colorante neutralizador.

Las ondas y cebadores para el receptor de la hormona de crecimiento de ratón fueron designadas para hibridarse a una secuencia del receptor de la hormona de crecimiento de ratón, utilizando información secuencial publicada (acceso del GenBank (Banco Genético) número NM_010284.1, incorporado en este documento como la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 11). Para el receptor de la hormona de crecimiento los cebadores de PCR fueron:

cebador hacia adelante: TTGACGAAATAGTGCAACCTGATC (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 12) cebador en reversa: CGAATCCCGGTCAAACCTAATG (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 13) y la sonda PCR fue: FAM-CATTGGCCTCAACTGGACTTTACTAA-TAMRA (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 14) donde FAM es el colorante reportador fluorescente y TAMRA es el colorante neutralizador. Para la GAPDH de ratón los cebadores PCR fueron:

cebador hacia delante: GGCAAATTCACGGCACAGT (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 15)
 cebador en reversa: GGGTCTCGTCTCCTGGAAGAT (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 16) y la sonda PCR fue: 5' JOE-AAGGCCGAGAATGGGAAGCTTGTGCATC- TAMRA 3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 17) donde JOE es el colorante reportador fluorescente y TAMRA es el colorante neutralizador.

Ejemplo 14

Análisis de Northern blot de los niveles de ARNm del receptor de la hormona de crecimiento

18 horas después del tratamiento antisentido, las monocapas celulares fueron lavadas 2 veces con PBS frío y se lisaron en 1 ml de RNAZOL™ (TEL-TEST "B" Inc., Friendswood, TX). El ARN total fue preparado siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante. 20 µg de ARN total fueron fraccionados por medio de electroforesis a través de 1.2 por ciento de geles de agarosa que contenían 1.1 por ciento de formaldehído utilizando un sistema amortiguador de MOPS (AMRESCO, Inc. Solon, OH). El ARN fue transferido desde el gel a membranas nylon HYBOND™-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) por medio de una transferencia capilar durante la noche utilizando el sistema de amortiguación de transferencia Northern/Southern (TEL-TEST "B" Inc., Friendswood, TX). La transferencia de ARN fue confirmada por medio de visualización ultravioleta. Las membranas fueron fijadas por medio de vinculaciones transversales ultravioleta utilizando un STRATALINKER™ UV Crosslinker 2400 (Stratagene, Inc, La Jolla, CA) y luego se sondearon utilizando la solución de hibridación QUICKHYB™ (Stratagene, La Jolla, CA) utilizando las recomendaciones del fabricante para condiciones exigentes.

Para detectar el receptor de la hormona de crecimiento humana, una sonda específica para el receptor de la hormona de crecimiento humana fue preparada por medio de PCR utilizando el cebador hacia adelante GATGTCCCAATGTGACATGCA (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 5) y el cebador en reversa AAGTAGGCATTGTCCATAAGGAAGTT (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 6). Para normalizar las variaciones de eficiencia de carga y transferencia, las membranas fueron extirpadas y sondeadas para detectar ARN de deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH) (Clontech, Palo Alto, CA).

Para detectar el receptor de la hormona de crecimiento de ratón, se preparó una sonda específica del

receptor de la hormona de crecimiento de ratón por medio de PCR utilizando el cebador hacia adelante TTGACGAAATAGTGCAACCTGATC (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 12) y el cebador en reversa CGAATCCCGGTCAAATAATG (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 13) para normalizar las variaciones de eficiencia de carga y de transferencia, las membranas fueron extirpadas y sondeadas para detectar el ARN de deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato de ratón (GAPDH) (Clontech, Palo Alto, CA).

Membranas hibridadas fueron visualizadas y cuantificadas utilizando los softwares PHOSPHORIMAGER™ y IMAGEQUANT™ V3.3 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). La información fue normalizada a niveles de GAPDH en controles sin tratamiento.

Ejemplo 15

Inhibición antisentido de la expresión del receptor de la hormona de crecimiento humana por medio de oligonucleótidos quiméricos de fosforotioato que tienen alas 2'-MOE y un vacío deoxi

Una serie de compuestos antisentido fueron diseñados para usar como objetivo a diferentes regiones del ARN de receptor de la hormona de crecimiento humana, utilizando secuelas publicadas (acceso del GenBank (Banco Genético) número NM_000163.1, incorporado en este documento como la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 4, y el complemento de las posiciones 468085 a 502183 de la secuencia con el acceso del GenBank número NT_006702.8, incorporado en este documento como la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 18). Los compuestos son mostrados en la tabla 1. El "lugar objetivo" indica el primer número de nucleótidos (5'-mayoría) en la secuencia objetivo particular a la cual se enlaza el compuesto. Todos los compuestos en la tabla 1 son oligonucleótidos quiméricos ("gapmers"), con 20 nucleótidos de largo, compuestos de una región "vacía" central que consiste de 10 2'-deoxinucleótidos, que son rodeados por ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por "alas" de 5-nucleótidos. Las alas son compuestas de nucleótidos 2'-metoxietilo (2'-MOE). Los enlaces internucleosídicos (estructurales) son tipo fosforotioato (P = S) a lo largo de los oligonucleótidos. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Los compuestos fueron analizados por su efecto en los niveles de ARNm del receptor de la hormona de crecimiento humana por medio de PCR cuantitativo en tiempo real tal como se describió en otros ejemplos en este documento. Los datos son promedios de 3 experimentos en los cuales las células MCF7 fueron tratadas con los oligonucleótidos antisentido. El control positivo para cada dato es identificado en la tabla por el número de identificación secuencial. Si estuviese presente, "N.D." indica "sin datos" ("no data").

Tabla 1

Inhibición de los niveles de ARNm de receptor de la hormona de crecimiento humana por oligonucleótidos quiméricos de fosforotioato que tienen alas 2'-MOE y un vacío de deoxi							
Isis #	Región	Identificación secuencial objetivo número	Lugar objetivo	Secuencia	% inhib	Identificación n secuencial número	Identificación secuencial de control número
227452	Codificación	4	332	tcagggcattcttccattc	79	19	1
227453	Codificación	4	337	cataatcagggcattcttfc	52	20	1
227464	Codificación	4	947	cctftaatctttggaactgg	58	21	1
227468	Codificación	4	1079	tcataaatatctagctcaat	62	22	1
227465	Codificación	4	1124	cttagaagtctgtctgtgct	63	23	1
227475	Codificación	4	1514	cctgctggtgtaagtgcgct	68	24	1
227480	Codificación	4	1724	atgtaaattgcctcttggt	66	25	1
227481	Codificación	4	1729	tggtgatgtaaattgcctct	45	26	1
227402	Codificación	4	1734	ttctgtggtgatgtaaattgt	53	27	1
227483	Codificación	4	1733	aggcttctgtggtgatgta	75	28	1
227484	Codificación	4	1744	tggttaaggcttctgtggtg	63	29	1
227488	Codificación	4	1922	agttggtctgtgctcacata	86	30	1
227489	Codificación	4	1927	gttcagttggtctgtgctc	75	31	1
227490	Codificación	4	1936	gcatgatttggtcagttgg	67	32	1
227499	3'UTR	4	2656	tataaaaagggttggtaaaa	14	33	1
227500	3'UTR	4	4043	catagcagcaaagtagcaga	69	34	1
227501	3'UTR	4	4183	gctattttggctatagaaa	64	35	1
227502	3'UTR	4	4197	gattgaggatttagctatt	56	36	1
272302	Codón inicial	4	31	gatccatacctgtaggacct	60	37	1
272303	Codón inicial	4	36	ccagagatccatacctgtag	55	38	1
272304	Codificación	4	115	tgctaaggatagctgtgtg	48	39	1
272305	Codificación	4	160	ttgtcttaggcctggatta	68	40	1

(continuación)

Inhibición de los niveles de ARNm de receptor de la hormona de crecimiento humana por oligonucleótidos quiméricos de fosforotioato que tienen alas 2'-MOE y un vacío de deoxi								
5	Isis #	Región	Identificación secuencial objetivo número	Lugar objetivo	Secuencia	% inhib	Identificación n secuencial número	Identificación secuencial de control número
	272306	Codificación	4	170	ttagaagaattgtcttag	13	41	1
10	272307	Codificación	4	185	gtgaatttaggctcctaga	55	42	1
	272308	Codificación	4	274	gctgtatgggtcctagggtc	57	43	1
	272309	Codificación	4	362	taacagctgtttcccagc	85	44	1
	272310	Codificación	4	439	tttcatccactgtaccacca	76	45	1
	272311	Codificación	4	468	ttgcactatttcatcaacag	47	46	1
15	272312	Codificación	4	480	gggtggatcgtgtgcacta	57	47	1
	272313	Codificación	4	564	atgctgtgtcctccatc	77	48	1
	272314	Codificación	4	652	taggtccatcatttccat	56	49	1
	272315	Codificación	4	684	caatgagtacactggaactg	53	50	1
	272316	Codificación	4	752	aactcgccataattccaga	64	51	1
20	272317	Codificación	4	857	agccaaatattccaaagat	65	52	1
	272318	Codificación	4	913	tcagcatttaacctttgc	55	53	1
	272319	Codificación	4	979	atttccttcttgaggaga	67	54	1
	272320	Codificación	4	1000	agattgtgttcacctcctct	70	55	1
	272321	Codificación	4	1053	aaccaagagtcactcctgt	64	56	1
25	272322	Codificación	4	1084	ctggctcatcaatctagc	84	57	1
	272323	Codificación	4	1110	tgtgtctgattcctcagtct	67	58	1
	272324	Codificación	4	1236	tatgtcattggcattgaaat	53	59	1
	272325	Codificación	4	1302	aaggcataagagatctgctt	66	60	1
30	272326	Codificación	4	1420	actcagctcctcagtagga	77	61	1
	272327	Codificación	4	1560	ggacatccctgcttattct	60	62	1
	272328	Codificación	4	1623	ggcattgtccataaggaagt	85	63	1
	272329	Codificación	4	1651	acttttggcatctgcctca	63	64	1
	272330	Codificación	4	1656	gatgcacttttggcatctg	47	65	1
35	272331	Codificación	4	1861	cagtcgattgagtaggagg	67	66	1
	272332	Codificación	4	1884	ctctttgtcaggcaagggca	75	67	1
	272333	Codificación	4	1913	gtgctcacatagccatga	72	68	1
	272334	Codón de parada	4	1949	aagaaaggctaaggcatgat	61	69	1
40	272335	3'UTR	4	1973	aaatacgtagctctgggaa	47	70	1
	272336	3'UTR	4	2196	caatcactgctactaaacag	69	71	1
	272337	3'UTR	4	2249	aaacatagccattcaatgct	39	72	1
	272338	3'UTR	4	2337	gtgctatggttgattcaa	78	73	1
	272339	3'UTR	4	2454	gtttacatatccaaactat	72	74	1
45	272340	3'UTR	4	2853	catcaaccaagattggtga	69	75	1
	272341	3'UTR	4	2988	gaggctatagatcttatctc	65	76	1
	272342	3'UTR	4	3271	tagtgagaaagaaagtctt	45	77	1
	272343	3'UTR	4	3765	aatgctctcaagaatgatgt	48	78	1
	272344	3'UTR	4	3980	acactcaattctagcttttc	60	79	1
50	272345	3'UTR	4	4011	catctattacaaataacatg	24	80	1
	272346	3'UTR	4	4057	ctcttgagaaaaccatagc	67	81	1
	272347	3'UTR	4	4097	tctacactgatgatactta	62	82	1
	272348	3'UTR	4	4120	cacagctttgaattgaatta	57	83	1
	272349	3'UTR	4	4133	agtcttccaaacacacagct	68	84	1
55	272350	3'UTR	4	4156	aggctgttgaaatagtaa	67	85	1
	272351	3'UTR	4	4170	atagaaatgttgaggctg	57	86	1
	272352	3'UTR	4	4218	ccaaaatgacattctgagac	77	87	1
	272353	3'UTR	4	4245	ataatggcttatgtggccac	72	86	1
60	272354	Intrón	18	2571	agttatgtaaccctgattga	65	89	1
	272355	Unión intrón: exón	18	6416	ttgagtggttctctaaaatgaa	24	90	1
	272356	Intrón	18	8405	atggaggctggagggtcaaa	63	91	1
65	272357	Unión	18	22712	taggtccatctttcaagac	62	92	1

(continuación)

Inhibición de los niveles de ARNm de receptor de la hormona de crecimiento humana por oligonucleótidos quiméricos de fosforotioato que tienen alas 2'-MOE y un vacío de deoxi							
Isis #	Región	Identificación secuencial objetivo número	Lugar objetivo	Secuencia	% inhib	Identificación n secuencial número	Identificación secuencial de control número
272358	Intrón	18	25543	tctccagatagaatctaac	53	93	1
272359	Intrón	18	29755	tccaatattctggtacttt	72	94	1
272360	Unión intrón: exón	18	29935	tattagtacctgaggaga	0	95	1
272361	Unión intrón: exón	18	30267	atttctctctagaaaata	10	96	1

Tal como se muestra en la tabla 1, las IDENTIFICACIONES SECUENCIALES NÚMEROS 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 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, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 93 y 94 demostraron por lo menos un 45% de inhibición de la expresión del receptor de la hormona de crecimiento humana en este ensayo y son, por lo tanto, preferidas. Más preferidas son las IDENTIFICACIONES SECUENCIALES NÚMEROS 30, 44 y 57.

ISIS 272322 (la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 57) es dirigida al exón 10, una región que aparece en todas las transcripciones del receptor de la hormona de crecimiento. Los compuestos dirigidos al exón 10 son, por lo tanto, secciones preferidas para su uso en el invento. Se reportó que el exón 3 era alternamente empalmado en la transcripción o transcripciones humanas. Esta también podría ser una región objetiva preferida.

Las regiones objetivo a las cuales las secuencias antisentido preferidas de la tabla 2 complementan, son denominadas en este documento como "segmentos objetivo preferidos" y son, por lo tanto, objetivos preferidos de la dirección de los compuestos para su uso en este invento. Estos segmentos objetivo preferidos son mostrados en la tabla 3. Los segmentos representan el complemento en reversa de los compuestos antisentido preferidos que se muestra en la tabla 1. El "lugar objetivo" indica el primer número de nucleótido (5'-mayoría) en el ácido nucleico objetivo específico al cual se enlaza el oligonucleótido. También se muestra en la tabla 3 las especies en las cuales cada uno de los segmentos objetivo preferidos fueron encontrados.

Ejemplo 16

Inhibición antisentido de la expresión del receptor de la hormona de crecimiento del ratón por medio de oligonucleótidos quiméricos de fosforotioato que tienen alas 2'-MOE y un vacío de deoxi

Una 2ª serie de compuestos antisentido fue diseñada para usar como objetivo a regiones diferentes del ARN del receptor de la hormona de crecimiento del ratón, utilizando secuencias publicadas (acceso del GenBank (Banco Genético) número NM_010284.1, incorporada en este documento como la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 11, una variante del acceso del GenBank (Banco Genético) número AF120480.2 con un lugar de empalme alterno al exón 1B: exón 2, incorporada en este documento como la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 97, una variante del acceso del GenBank (Banco Genético) número AF120480.2 con un lugar alterno de empalme al exón 1C: exón 2, incorporada en este documento como la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 98, una variante del acceso del GenBank (Banco Genético) número AF120480.2 con un lugar alterno de empalme al exón 1D: exón 2, incorporado en este documento como la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 99, y una secuencia derivada de los accesos del GenBank (Banco Genético) números AF120480.2 y AC073753.1, representando una secuencia genómica, incorporada en este documento como la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 100). Los compuestos se muestran en la tabla 2. El "lugar objetivo" indica el primer número de nucleótido (5'-mayoría) en el ácido nucleico objetivo específico al cual se enlaza el compuesto. Todos los compuestos en la tabla 2 son oligonucleótidos quiméricos ("gapmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región "vacía" central que consiste de 10 2'-deoxinucleótidos, que son rodeados en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por "alas" de 5-nucleótidos. Las alas son compuestas de nucleótidos 2'-metoxietilo (2'-MOE). Los enlaces internucleosídicos (estructurales) son fosforotioatos (P = S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Los compuestos fueron analizados para detectar su efecto en los niveles de ARNm del receptor de la hormona de crecimiento del ratón por medio de PCR cuantitativo en tiempo real tal como se describió en otros ejemplos de este documento. Los datos son los promedios de 3 experimentos en los cuales las células b.END fueron tratadas con oligonucleótidos antisentido. El control positivo para cada dato es identificado en la tabla por el número de identificación secuencial. Si estuviese presente, "N.D." indica "sin datos" ("no data").

Tabla 2

Inhibición de los niveles de ARNm del receptor de la hormona de crecimiento de ratón por oligonucleótidos quiméricos de fosforotioato que tienen alas 2'-MOE y un vacío de deoxi							
Isis #	Región	Identificación secuencial objetivo número	Lugar objetivo	Secuencia	% inhib	Identificación secuencial número	Identificación secuencial de control número
227443	5'UTR	11	5	tgctggcagctcgtgggtt	0	101	1
227444	5'UTR	11	16	atggctgcgcctgctggca	53	102	1
227445	Codón inicial	11	221	tacctgagacctcggagttt	69	103	1
227446	Codón inicial	11	232	acaaagatccatacctgaga	87	104	1
227447	Codificación	11	300	gctgggtgtagcctcactcc	77	105	1
227440	Codificación	11	313	ttgccaagagtagctgggtg	60	106	1
227449	Codificación	11	391	acgacactgggtaatcgag	69	107	1
227450	Codificación	11	495	tgcttcccttttagcata	71	108	1
227451	Codificación	11	520	atgagcaabcttgcagctt	49	109	1
227454	Codificación	11	590	agttgaagtaacagctgttt	69	110	1
227455	Codificación	11	620	agtagggtatccaaatggag	43	111	1
227456	Codificación	11	717	gtccagttgagcccaatggg	97	112	1
227457	Codificación	11	812	gaattccatccctcaga	67	113	1
227458	Codificación	11	832	gtactgaattcactacca	75	114	1
227459	Codificación	11	975	ctgaactcgcgtacttttc	60	115	1
227460	Codificación	11	1041	aactggatctcttccaca	43	116	1
227461	Codificación	11	1084	tgctactccaaatattcaca	75	117	1
227462	Codificación	11	1115	gcttgaaatataactaca	31	118	1
227463	Codificación	11	1137	atcgatcttaactcttg	39	119	1
227465	Codificación	11	1190	tgagaagatcggatcaatc	51	120	1
227466	Codificación	11	1245	ttgtagttatcatgaatgcc	50	121	1
227467	Codificación	11	1265	catcattgtagaagtcgggt	33	122	1
227470	Codificación	11	1388	ctccaaggataccagctgat	82	123	1
227471	Codificación	11	1530	aggcacaagagatcagcttc	52	124	1
227472	Codificación	11	1579	agagccaagggaagcatcat	42	125	1
227473	Codificación	11	1710	aagccaatgttggcagtg	71	126	1
227474	Codificación	11	1730	tgctccttactggccataa	68	127	1
227476	Codificación	11	1837	gtaatttctggcagggcg	41	128	1
227477	Codificación	11	1850	cactgttcatgctgaattt	61	129	1
227478	Codificación	11	1878	ttttggatctgactcaca	68	130	1
227479	Codificación	11	1947	atgcctctgggtaagct	59	131	1
227485	Codificación	11	2044	cggtggttagctgggacag	45	132	1
227486	Codificación	11	2054	cggltggaaccggtgtag	39	133	1
227487	Codificación	11	2106	tcaggcaaaaggcaaacgagt	44	134	1
227491	Codón de parada	11	2182	taggaaaggctactgcatga	65	135	1
227492	3'UTR	11	2239	taaacatagtttgggtta	7	136	1
227493	3'UTR	11	2253	tccaacacagatttaaac	51	137	1
227494	3'UTR	11	2517	caaaagccacctgattgtt	56	138	1
227495	3'UTR	11	2527	tctgaaactgcaaaagccac	47	139	1
227496	3'UTR	11	2537	gcaatcaattctgaaactg	51	140	1
227497	3'UTR	11	2637	taaatgtttgcatatccaa	77	141	1
227498	3'UTR	11	197	ttgtaaaaactaaactgtt	49	142	1
227503	Unión exón: exón:	97	197	tacctgagaccccagttcat	24	143	1
227504	Unión exón: exón:	98	23	tacctgagaccccgcgacg	34	144	1
227505	Unión exón: exón:	99	61	tacctgagaccacaagcgg	39	145	1
227506	Unión exón: intrón:	100	4352	cctccagtacctcggagttt	69	146	1
227507	Unión intrón: exón:	100	4865	gtcctgctccaggttagca	89	147	1
227508	Unión intrón: exón:	100	5071	ttcactcaccagttcat	51	148	1
227509	Unión intrón: exón:	100	5153	gcagttctatcagaacttg	82	149	1
227510	Intrón	100	5196	ctccagacgtgacccgactc	64	150	1
227511	Unión intrón: exón:	100	5264	ccacgcaccacaagcggat	71	151	1
227512	Intrón	100	6350	taacctatgggactatgct	36	152	1
227513	Unión intrón: exón:	100	7123	tacctgagacctgcaagaca	40	153	1
227514	Intrón	100	9753	atgctcaagtcagctattgg	43	154	1
227515	Unión intrón: exón:	100	13932	aaattctactgtccccag	37	155	1
227516	Unión intrón: exón:	100	17200	ttggcttccctggagggtc	57	156	1

(continuación)

Inhibición de los niveles de ARNm del receptor de la hormona de crecimiento de ratón por oligonucleótidos quiméricos de fosforotioato que tienen alas 2'-MOE y un vacío de deoxi								
227517	Unión intrón	exón:	100	17224	cttcaactaaccttgacgctt	63	157	1
227518	Unión intrón	exón:	100	24259	cacggcttacctatttcgctc	6	158	1
227519	Unión intrón	exón:	100	37843	tcacacctacctttgctgct	44	159	1
227520	Unión exón	intrón:	100	40862	catcttaactccttgaaaca	42	160	1

Tal como se muestra en la tabla 2, las IDENTIFICACIONES SECUENCIALES NÚMEROS 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 117, 120, 121, 123, 124, 126, 127, 129, 130, 131, 135, 137, 138, 140, 141, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 156 y 157 demostraron por lo menos un 50% de inhibición de la expresión del receptor de la hormona de crecimiento de ratón en este experimento y son, por lo tanto, preferidas. Más preferidas son las IDENTIFICACIONES SECUENCIALES NÚMEROS 104, 147 y 149.

ISIS 227446, 227507 y 227509 (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMEROS: 104, 147 y 149) fueron sujetas a estudios de respuesta de dosis. Todos los 3 compuestos demostraron buena respuesta a dosis con IC₅₀ de aproximadamente 25 nM, 12.5 nM y 12.5 nM, respectivamente.

Las regiones objetivo a las cuales las secuencias antisentido preferidas de la tabla 2 son complementarias son referidas en este documento como los "segmentos objetivo preferidos" y son, por lo tanto, preferidas para servir de objetivo para los compuestos para su uso en este invento. Estos segmentos objetivo preferidos son mostrados en la tabla 3. Las secuencias presentan el complemento en reversa de los compuestos antisentido preferidos mostrados en la tabla 2. El "lugar objetivo" indica el primer número de nucleótido (5'-mayoría) en el ácido nucleico objetivo específico al cual el oligonucleótido se enlaza. También se muestra en la tabla 3 los espacios en los cuales cada uno de los segmentos objetivo preferidos fueron encontrados.

Tabla 3

Secuencia y posición de los segmentos objetivo preferidos identificados en el receptor de la hormona de crecimiento						
Identificación del lugar	Número de identificación secuencial objetivo	Lugar objetivo	Secuencia	Rev comp de la identificación secuencial	Activo en	Identificación secuencial número
144070	4	332	gaatggaagaatgcctga	19	<i>H. sapiens</i>	161
144071	4	337	gaaagaatgcctgattatg	20	<i>H. sapiens</i>	162
144082	4	947	ccagttccaagattaaagg	21	<i>H. sapiens</i>	163
144086	4	1079	attgagctagattgatga	22	<i>H. sapiens</i>	164
144087	4	1124	gacacagacagacttctaag	23	<i>H. sapiens</i>	165
144093	4	1514	agcgacattacaccagcagg	24	<i>H. sapiens</i>	166
144098	4	1724	aaccaagaggacatttacat	25	<i>H. sapiens</i>	167
144099	4	1729	agaggacatttacatcacca	26	<i>H. sapiens</i>	168
144100	4	1734	acatttacatcaccacagaa	27	<i>H. sapiens</i>	169
144101	4	1739	tacatcaccacagaaagcct	28	<i>H. sapiens</i>	170
144102	4	1744	caccacagaaagccttacca	29	<i>H. sapiens</i>	171
144106	4	1922	tatgtgagcacagaccaact	30	<i>H. sapiens</i>	172
144107	4	1927	gagcacagaccaactgaaca	31	<i>H. sapiens</i>	173
144108	4	1936	ccaactgaaacaaatcatgc	32	<i>H. sapiens</i>	174
144118	4	4043	tctgctactttgctgctatg	34	<i>H. sapiens</i>	175
144119	4	4183	tttctatagccaaaaatagc	35	<i>H. sapiens</i>	176
144120	4	4197	aatagctaaatacctcaatc	36	<i>H. sapiens</i>	177
188518	4	31	aggctctacaggtatggatc	37	<i>H. sapiens</i>	178
188519	4	36	ctacaggtatggatctctgg	38	<i>H. sapiens</i>	179
188520	4	115	cacagcagctatccttagca	39	<i>H. sapiens</i>	180
188521	4	160	taatccaggcctaaagacaa	40	<i>H. sapiens</i>	181
188523	4	185	tctaaggagcctaaattcac	42	<i>H. sapiens</i>	182
188524	4	274	gaacctaggaccatacagc	43	<i>H. sapiens</i>	183
188525	4	362	gctggggaaaacagctgtta	44	<i>H. sapiens</i>	184
188526	4	439	tgggtgtacagtgatgaaa	45	<i>H. sapiens</i>	185
188527	4	468	ctgttgatgaaatagtgcaa	46	<i>H. sapiens</i>	186
188528	4	480	tagtgcaaccagatccacc	47	<i>H. sapiens</i>	187
188529	4	564	gatgggaagcaccacgcaat	48	<i>H. sapiens</i>	188
188530	4	652	atgaaaaatgatggacccta	49	<i>H. sapiens</i>	189
188531	4	684	cagttccagtgactcattg	50	<i>H. sapiens</i>	190
188532	4	752	tctggaattatggcgatt	51	<i>H. sapiens</i>	191
188533	4	857	atcttgggaatattgggct	52	<i>H. sapiens</i>	192
188534	4	913	gcaaaggattaaaatgctga	53	<i>H. sapiens</i>	193
188535	4	979	tctcctaaggaaggaaaat	54	<i>H. sapiens</i>	194

(continuación)

Secuencia y posición de los segmentos objetivo preferidos identificados en el receptor de la hormona de crecimiento							
Identificación del lugar	Número de identificación secuencial objetivo	Lugar objetivo	Secuencia	Rev comp de la identificación secuencial	Activo en	Identificación secuencial número	
5	188536	4	1000	agaggagggaacacaatct	55	<i>H. sapiens</i>	195
	188537	4	1053	acagtgatgactcttgggtt	56	<i>H. sapiens</i>	196
	188538	4	1084	gctagatattgatgagccag	57	<i>H. sapiens</i>	197
10	188539	4	1110	agactgaggaatcagacaca	58	<i>H. sapiens</i>	198
	188540	4	1236	atttcaatgccaatgacata	59	<i>H. sapiens</i>	199
	188541	4	1302	aaqcagatctttatgcctt	60	<i>H. sapiens</i>	200
	188542	4	1420	tcctactgaaggagctgagt	61	<i>H. sapiens</i>	201
	188543	4	1560	agaataagggcaggatgtcc	62	<i>H. sapiens</i>	202
	188544	4	1623	acttcttatggacaatgcc	63	<i>H. sapiens</i>	203
15	188545	4	1651	tgaggcagatgccaaaaagt	64	<i>H. sapiens</i>	204
	188546	4	1656	cagatgccaaaaagtgcac	65	<i>H. sapiens</i>	205
	188547	4	1861	cctcataactaatgcgactg	66	<i>H. sapiens</i>	206
	188548	4	1884	tgcccttgcctgacaaagag	67	<i>H. sapiens</i>	207
	188549	4	1913	tcattgactatgtgagcac	68	<i>H. sapiens</i>	208
	188550	4	1949	atcatgccttagcctttctt	69	<i>H. sapiens</i>	209
20	188551	4	1973	ttcccaagagctacgtattt	70	<i>H. sapiens</i>	210
	188552	4	2196	ctgtttatgacagtgattg	71	<i>H. sapiens</i>	211
	188554	4	2337	ttgaatgcaaacatagcac	73	<i>H. sapiens</i>	212
	188555	4	2454	atagtttgatattgaaac	74	<i>H. sapiens</i>	213
	188556	4	2853	tcaccaaattctggttgatg	75	<i>H. sapiens</i>	214
	188557	4	2988	gagataagatctatagcctc	76	<i>H. sapiens</i>	215
25	188558	4	3271	agaaactctttctcacta	77	<i>H. sapiens</i>	216
	188559	4	3765	acatcattcttgagagcatt	78	<i>H. sapiens</i>	217
	188560	4	3980	gaaaagctagaattgagtg	79	<i>H. sapiens</i>	218
	188562	4	4057	gctatggtttctccaagag	81	<i>H. sapiens</i>	219
	188563	4	4097	taaagtatcatcagtgtaga	82	<i>H. sapiens</i>	220
	188564	4	4120	taattcaattcaaaagctgtg	83	<i>H. sapiens</i>	221
30	188565	4	4133	agctgtgtttggaagact	84	<i>H. sapiens</i>	222
	188566	4	4156	ttactattcacaacagcct	85	<i>H. sapiens</i>	223
	188567	4	4170	cagcctgacaacattctat	86	<i>H. sapiens</i>	224
	188568	4	4218	gtctcagaatgtcattttgg	87	<i>H. sapiens</i>	225
	188569	4	4245	gtggccacataagccattat	88	<i>H. sapiens</i>	226
35	188570	18	2571	tcaatcagggtcacataact	89	<i>H. sapiens</i>	227
	188572	18	8405	tttgaactccagcctccat	91	<i>H. sapiens</i>	228
	188573	18	22712	gtcttgaagatggacccta	92	<i>H. sapiens</i>	229
	188574	18	25543	gtttagattctatctggaga	93	<i>H. sapiens</i>	230
	188575	18	29755	aaagtcaccagaattatttgg	94	<i>H. sapiens</i>	231
40	144062	11	16	tgccaagcaggcgagccat	102	<i>M. musculus</i>	232
	144063	11	221	aaactccgagggtctcagga	103	<i>M. musculus</i>	233
	144064	11	232	tctcagatgatgattctgt	104	<i>M. musculus</i>	234
	144065	11	300	ggaagtgaggctaccagc	105	<i>M. musculus</i>	235
	144066	11	313	caccagctactcttggcaaa	106	<i>M. musculus</i>	236
	144067	11	391	ctcgattaccaagtgtcgt	107	<i>M. musculus</i>	237
	144068	11	495	tatgctaaaagggaaagcca	108	<i>M. musculus</i>	238
45	144072	11	590	aaacagctgttactcaact	110	<i>M. musculus</i>	239
	144074	11	717	cccattggcctcaactggac	112	<i>M. musculus</i>	240
	144075	11	812	tctgaaggatggataattc	113	<i>M. musculus</i>	241
	144076	11	832	tggagtataaattcagtac	114	<i>M. musculus</i>	242
	144077	11	975	gaaaagtacagcaggttcag	115	<i>M. musculus</i>	243
50	144079	11	1084	ttggaatatttgagtagca	117	<i>M. musculus</i>	244
	144083	11	1190	gattgatccagatcttctca	120	<i>M. musculus</i>	245
	144084	11	1245	ggcattcatgataactacaa	121	<i>M. musculus</i>	246
	144088	11	1388	atcagctggatccttgag	123	<i>M. musculus</i>	247
55	144089	11	1530	gaagctgatctcttctgctt	124	<i>M. musculus</i>	248
	144091	11	1710	tcactggcaaacattgactt	126	<i>M. musculus</i>	249
	144092	11	1730	ttatgcccaagtaagcgaca	127	<i>M. musculus</i>	250
	144095	11	1850	aaattacagatgaacagtg	129	<i>M. musculus</i>	251
	144096	11	1878	tgtagtcagatgccaaaaa	130	<i>M. musculus</i>	252
60	144097	11	1947	agctttaaccaagaggacat	131	<i>M. musculus</i>	253
	144109	11	2182	tcatgcagtagcctttccta	135	<i>M. musculus</i>	254
	144111	11	2253	gtttaaactgtgttggga	137	<i>M. musculus</i>	255
	144112	11	2517	aaacaatcagggtgcttttg	138	<i>M. musculus</i>	256
65	144114	11	2537	cagttcaggaattgaatgc	140	<i>M. musculus</i>	257

(continuación)

Secuencia y posición de los segmentos objetivo preferidos identificados en el receptor de la hormona de crecimiento							
Identificación del lugar	Número de identificación secuencial objetivo	Lugar objetivo	Secuencia	Rev comp de la identificación secuencial	Activo en	Identificación secuencial número	
5	144115	11	2637	ttggatatgcaaaacattta	141	<i>M. musculus</i>	258
	144124	100	4352	aaactccgaggtactggagg	146	<i>M. musculus</i>	259
	144125	100	4865	tgctaacctggagcaaggac	147	<i>M. musculus</i>	260
10	144126	100	5071	atgaactggggtgagtggaa	148	<i>M. musculus</i>	261
	144127	100	5153	caaagtctgatagaactgc	149	<i>M. musculus</i>	262
	144128	100	5196	gagtcgggtcacgtctggag	150	<i>M. musculus</i>	263
	144129	100	5264	atccgcttggtggtgcgtgg	151	<i>M. musculus</i>	264
15	144134	100	17200	gaacctccagggaagccaa	156	<i>M. musculus</i>	265
	144135	100	17224	aagctgcaaggtagtgaag	157	<i>M. musculus</i>	266

Puesto que se ha demostrado por experimentación que estos "segmentos objetivo preferidos", están abiertos para, y son accesibles para, su hibridación con los compuestos antisentido de este invento, una persona con conocimiento en la técnica reconocerá o será capaz de afirmar, utilizando experimentación rutinaria a secciones adicionales que abarcan otros compuestos que se hibridan específicamente a estos segmentos objetivos preferidos y consecuentemente inhiben la expresión del receptor de la hormona de crecimiento.

De acuerdo a esta especificación, los compuestos antisentido incluyen compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de orientación externa (EGS - external guide sequence), empalmadoras alternas, cebadores, sondas y otros compuestos oligoméricos cortos que se hibridan a por lo menos una porción del ácido nucleico objetivo.

Ejemplo 17

Análisis de Western blot de los niveles proteínicos del receptor de la hormona de crecimiento

El análisis Western blot (análisis de inmuno manchado) es ejecutado usando métodos estándar. Las células son cultivadas 16-20 horas después del tratamiento con oligonucleótidos, lavadas una vez con PBS, suspendidas en el amortiguador Laemmli (100 µl/pozo), hervidas durante 5 minutos y cargadas en un 16% de gel de SDS-PAGE. Los geles son ejecutados durante 1.5 horas a 150 V, y transferidos a la membrana para la prueba de western blots. Los anticuerpos primarios apropiados dirigidos al receptor de la hormona de crecimiento son utilizados, con un anticuerpo secundario marcado radiológicamente o fluorescentemente en contra de la especie principal de anticuerpos. Las bandas son visualizadas utilizando PHOSPHORIMAGER™ (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA).

Ejemplo 18

Reducción de IGF-I sérico en animales después del tratamiento con antisentido al receptor de la hormona de crecimiento - estudio piloto de una semana

40 ratones Balb/C(a) machos que pesaban entre 9 a 10 g fueron colocados en jaulas, 4 animales por jaula, y se les permitió asimilarse a su entorno con nuevos compañeros de camada una semana antes (día -7) del inicio del estudio de una semana. Los ratones de esta edad estarían a su máxima tasa de crecimiento. Sus masas corporales fueron medidas y registradas cada 2º día durante este periodo. Cuando los ratones tenían una masa de 11 g (día -2), una muestra de sangre fue recaudada bajo anestesia tal como es descrito más adelante, y un ensayo del IGF-I sérico fue realizado para determinar los valores pre-tratamiento y para asistir en la asignación de ratones a los grupos de tratamiento para reducir la variabilidad animal. Para obtener la muestra de sangre, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (50 mg/kilogramo i.p.) y muestras de sangre sin ayunar fueron recaudadas exactamente 5 minutos después del plexo retrobulbar a través de tubos capilares heparinizados bajo una anestesia ligera de éter. Los 40 animales fueron colocados en 5 grupos y cada grupo tenía un promedio de masa similar y una concentración promedio similar de IGF-I para el ensayo.

A los animales (n = 8/grupo) se les designó dentro de los 5 siguientes grupos de tratamiento:

- 60 Control - solución salina (una vez cada 2 días)
- ASO (Antisense to growth hormone receptor - antisentido para el receptor de la hormona de crecimiento)- ISIS 227446 (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 104) (30 miligramos/kilogramo una vez cada 2 días).
- Emparejamiento erróneo (oligonucleótidos de control negativo)- ISIS 261303 (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 12:07, emparejamiento erróneo de base 8 a ISIS 261303).

(30 mg/kilogramo una vez cada 2 días).
Ocreótido -(25 µg/kilogramo/2 veces al día).

Muestras de soluciones salinas, antisentidos, y ocreótidos fueron preparadas, y codificadas para ser administradas sin revelar el grupo. A los animales se les dio una dosis subcutánea de solución salina cada 2 días, y al control de emparejamiento erróneo o de antisentido con una administración en los días 0, 2, 4, 6. A los animales se les dio 2 veces al día dosis de 25 µg de ocreótidos. Se albergaron 4 animales por jaula, durante una semana. Tuvieron acceso a una cantidad pre-determinada de comida y agua estándar para ratones en todo momento a lo largo del experimento. Se los albergó en un entorno callado, con la temperatura y humedad adecuada durante todo el estudio. En el día cero y antes del tratamiento y cada día o cada 2 días, los animales tuvieron ediciones de su masa corporal y de su consumo alimenticio, permitiendo la administración de la dosis correcta del agente. Se monitoreo de cerca a los animales para detectar cambios en la piel, en el pelo, en los ojos, en la motricidad u otros cambios de comportamiento. No se observó ningún problema. Cada 2 días desde el día -7 hasta el día 7, se midió la masa corporal y el consumo de comida.

En el día 7, un día después de la última dosis del antisentido, y/o después de la última dosis de ocreótidos, se anestesió a los animales con pentobarbital (50 mg/kilogramo i.p.) y muestras de sangre no en ayunas fueron recaudadas exactamente 5 minutos después del plexo retro bulbar a través de tubos capilares heparinizados bajo anestesia ligera de éter (tal como en el día -7 y 0).

En el día -2 y en el día 7, se realizó una medición del IGF-I sérico por medio de un radioinmunoensayo. Los resultados fueron mostrados en la tabla 4. El nivel de IGF-I sérico es la medida más ampliamente usando de la actividad biológica de la hormona de crecimiento en terapias humanas. Es utilizado para medir la eficacia de tratamientos de antagonistas de la hormona de crecimiento similares a Trovert, que bloquean la respuesta de las células al exceso de la hormona de crecimiento, y los medicamentos de agonistas de dopamina y antagonistas de somatostatina de ocreótidos que bloquean la secreción de la hormona de crecimiento de la pituitaria.

Tabla 4

Efecto del inhibidor antisentido del receptor de la hormona de crecimiento en los niveles séricos del factor de crecimiento similar a la insulina-I			
	IGF-I (ng/ml) día -2	IGF-I (ng/ml) día 7	Reducción % de IGF-I*
Control salino	217.09 + 42.61	102.64 + 31.64	0
Ocreótido	199.72 + 44.47	114.34 + 41.36	-
ASO 3mg/kg	216.23 + 78.14	129.63 + 33.76	-
ASO 30 mg/kg	181.84 + 71.32	56.95 + 10.34	44.51
Emparejamiento erróneo 30mg/kg	184.87 + 55.6	81.1 + 19.16	20.98

*Reducción porcentual en IGF-I sérico en el día 7 en comparación con el control salino en el día 7.

Tal como se mostró en la tabla 4, el compuesto antisentido del receptor de la hormona de crecimiento, ISIS 227446 (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 104, administrado subcutáneamente con 30 mg/kilogramos cada 2° día durante una semana, produjo una reducción estadísticamente significativa y específica de IGF-I sérico al 55% del grupo de control (solución salina). Los resultados de la prueba t demostraron una diferencia significativa entre los 30 mg/kilogramos del control salino ($p < 0.005$) y el control de emparejamiento erróneo ($p < 0.01$). El control de emparejamiento erróneo no fue diferente estadísticamente que el control de solución salina ($p > 0.05$). No hubo un efecto a 3 mg/kilogramo. La reducción del 45% en los niveles de IGF-I sérico en nuestro estudio utilizando 30 mg/kilogramos de antisentido cada 2° día es comparable a aquel logrado utilizando únicamente 10 mg/kilogramos diariamente de Trovert (Van Neck et al., J. Endocrinol., 2000, 167, 295-303).

El control negativo de oligonucleótidos ISIS 261303 emparejados erróneamente de 8-nucleótidos (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 267), redujo el IGF-I sérico por un 21% en comparación al grupo salino de control, sin embargo, esta reducción no fue estadísticamente significativa (con $p > 0.05$). Los nucleótidos a 2 dosis diarias de 25 µg cada una no tuvo efecto en los niveles de IGF-I sérico en el día 7. La falta de efectos obtenida con ocreótidos es consistente con la información reportada por Groenbaek et al. (J. Endocrinol., 2002, 172, 637-643) utilizando esta dosis y 2 veces esta dosis en el día 7 en animales diabéticos. En animales diabéticos 2 dosis de 50 µg de ocreótidos por día durante 2 semanas fueron requeridos para reducir los niveles de sIGF-I.

Por lo tanto, un inhibidor antisentido del receptor de la hormona de crecimiento ha demostrado reducir específicamente los niveles séricos del factor de crecimiento similar a la insulina-I por un 45% en comparación al control. La reducción del factor de crecimiento similar a la insulina-I sérico con niveles similares a los vistos cuando se utilizan ocreótidos o Trovert, son clínicamente relevantes en el tratamiento de enfermedades incluyendo a la acromegalia, el gigantismo, la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética, la nefropatía

diabética, la diabetes, y tumores que dependen de la hormona de crecimiento y del IGF-I tal como se señaló anteriormente. Por lo tanto, se cree que esta terapia antisentido es terapéuticamente útil para el tratamiento de condiciones asociadas con el eje hormona de crecimiento/factor de crecimiento similar a la insulina-I.

5 El suero restante después del ensayo del factor de crecimiento similar a la insulina-1 fue aislado y almacenado a -80 °C. Todo el hígado fue removido rápidamente para ser pesado y congelado abruptamente en
10 parcelas etiquetadas de aluminio por medio de sumersión en nitrógeno líquido. Los riñones y los vasos también fueron congelados abruptamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C en el congelador. La carcasa fue pesada y colocada entonces en una bolsa que podía sellarse de plástico, congelada abruptamente en hielo seco y mantenida a -80 °C.

15 La reducción en el factor de crecimiento similar a la insulina-I sérico con 30 mg/kilogramos de antisentido no fue suficiente para influenciar la masa corporal o las masas de los órganos durante este periodo. Esto confirma los resultados publicados de otras personas. Van Neck et al., J Endocrinol., 2000, 167, 295-303. Observando al estudio en general, un incremento de la longitud del cuerpo durante el estudio estuvo en el rango de 7.5-10%. El incremento de longitud de la cola estuvo en proporción a los incrementos generales de longitud. El consumo de comida no varió significativamente entre los grupos de tratamiento. El crecimiento (longitud y masa del cuerpo) no fueron afectados por ningún tratamiento. La masa fue medida de 2 formas: tendencia de la masa (animal vivo), y masa final de la carcasa. Las masas absolutas del hígado no cambiaron excepto por un incremento ligero en la masa del hígado
20 (gramos/masa corporal total) para el grupo de ocreótidos. Las masas de otros órganos no fueron afectadas. Estas observaciones fueron similares a aquellas reportadas por van Neck et al. con Trovert excepto que la masa del hígado no fue afectada por Trovert, tal como fue observado con el antisentido del receptor de la hormona de crecimiento.

25 Los niveles de ARNm del receptor de la hormona de crecimiento en muestras de tejidos de este estudio fueron expuestas a ensayos del hígado y de los riñones para detectar mecanismos de acción antisentido que se basan en la ribonucleasa H. Los niveles proteínicos del receptor de la hormona de crecimiento por medio de ensayos de Western blots o de enlaces en las muestras de tejidos de este estudio fueron expuestas a ensayos del hígado y/o riñones para detectar mecanismos de acción antisentido adicionales y/o alternos. El hígado contribuyó con el 75% de los niveles séricos del factor de crecimiento similar a la insulina-I tal como se muestra en el receptor de la hormona de crecimiento de los animales knockout de Sjogren et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América, 1999, 96, 7088-7092. Análisis de muestras del factor de crecimiento similar a la insulina-I del hígado y de los riñones por análisis de ARN totales de Western y Northern blots o PCRs cuantitativos también fueron realizados tal como es entendido por aquellas personas con conocimiento en la técnica.

35 **Ejemplo 19**

40 **Reducción de la actividad del receptor de la hormona de crecimiento en los animales después del tratamiento con antisentido al receptor de la hormona de crecimiento**

Ensayos específicos de enlaces fueron ejecutados con los tejidos del hígado utilizando hormonas de crecimiento humanas yodadas [¹²⁵I] hGH.

45 Preparaciones microsomales de membranas fueron obtenidas de la siguiente forma. 400 mg de polvo de tejidos fueron homogeneizados en un amortiguador frío de homogeneización (50mM de Tris /HCl, 250mM de sacarosa, pH 7.4). Esto fue centrifugado a 200 R.P.M. durante 10 minutos a 3 °C y el sobrenadante fue guardado. Esto fue centrifugado nuevamente a 15.000 revoluciones por minuto durante 20 minutos. Los peletes fueron re-suspendidos en 0.5 mililitros de amortiguador de RRA con un inhibidor (50mM de Tris, 20mM de MgCl₂, pH 7.4). Muestras de preparaciones microsomales fueron almacenadas a -80 °C hasta el ensayo de enlaces específicos.

50 El ensayo de enlaces específicos de [¹²⁵I] hGH fue hecho de la siguiente forma. 4 tubos de vidrio fueron preparados para cada muestra, 2 para (-), 2 para (+). Diferentes muestras y soluciones fueron agregadas en cada tubo de la siguiente forma (i) 0.2ml de amortiguador RRA (50mM de Tris, 20mM de MgCl₂, 0.1% de BSA, pH 7.4); (ii) 0.1ml de membrana (1/2 o 1/4 de dilución); (iii) 0.1ml de bGH (10 mg /ml) para el tubo (+) o 0.1ml de amortiguador RRA para el tubo (-); y (iv) 0.1ml de rastreador [¹²⁵I]-hGH.

60 Se incubaron muestras a 4 °C con agitación durante la noche. La reacción fue detenida con 2.5 mililitros de RRA frío, y la muestra fue centrifugada a 2800 revoluciones por minuto durante 25 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue aspirado y los peletes fueron contados utilizando el contador de γ. La capacidad específica de enlaces fue calculada: CPM(-) - CPM(+). El contenido proteínico de las muestras microsomales fue determinado por el ensayo proteínico BCA.

65

Tabla 5

Efecto del inhibidor antisentido en la actividad de enlaces de la hormona de crecimiento con el receptor de la hormona de crecimiento			
		Enlaces específicos/miligramo de dilución proteínica (cpm) ½	Enlaces específicos/miligramo de dilución proteínica (cpm) ¼
5		5647 ± 746	9071 ± 2371
	Control salino	4205 ± 534 (26% de reducción en comparación con la solución salina)	5546 ± 789 (39% de reducción en comparación con la solución salina)
10	ASO 30 mg/kg		
	Emparejamiento erróneo 30 mg/kilogramos	7090 ± 1877	8431 ± 2663

Tal como se muestra en la tabla 5, el compuesto antisentido del receptor de la hormona de crecimiento, ISIS 227446 (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 104, administrados subcutáneamente a 30 mg/kilogramos cada 2 días durante una semana, produjo una reducción estadísticamente significativa ($p < 0.05$) y específica de los niveles del receptor de la hormona de crecimiento (medidos por su actividad de enlaces de la hormona de crecimiento) al 61% del grupo de control (solución salina). El control negativo de oligonucleótidos emparejados erróneamente de 8-nucleótidos ISIS 261303 (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 267) no tuvo ningún efecto en comparación con el grupo de control de la solución salina. El inhibidor antisentido del receptor de la hormona de crecimiento produjo una reducción estadísticamente significativa ($p < 0.01$) y específica de los niveles del receptor de la hormona de crecimiento al 59% del grupo de control (emparejamiento erróneo) en el experimento de ½ de dilución.

La reducción específica de los niveles del receptor de la hormona de crecimiento fue significativamente diferente (por medio de la prueba t) en comparación con el control de la solución salina y el control de emparejamiento erróneo en ambas diluciones ($P < 0.05$).

Estas mediciones del nivel de receptor de la hormona de crecimiento después del tratamiento antisentido son consistentes con la reducción del 45% en los niveles del factor de crecimiento similar a la insulina-I en nuestro estudio utilizando 30 mg/kilogramos de antisentido cada 2º día en relación al control (solución salina).

Ejemplo 20

Reducción de los niveles de ARNm del receptor de la hormona de crecimiento y de IGF-I sérico en los animales después del tratamiento con antisentido al receptor de la hormona de crecimiento-estudio de una semana adicional

Ratones Balb/C(a) machos fueron preparados y agrupados para su análisis de acuerdo al ejemplo 18 mencionado anteriormente.

Se designó a los animales ($n = 10$ /grupo) a los siguientes grupos de tratamiento:

Control-solución salina (una vez cada 2 días).

ASO (Antisense to growth hormone receptor - antisentido del receptor de la hormona de crecimiento)- ISIS 227446 (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 104) (30 y 50 mg/kilogramos una vez cada 2 días)

Oligonucleótidos de control negativo no relacionados - ISIS 260120 (TTACCGTATGGTTCCTCACT; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 268, (50 mg/kilogramo una vez cada 2 días).

Los animales fueron tratados y los niveles de IGF-I sérico fueron medidos tal como en el ejemplo 18 descrito anteriormente. Brevemente, durante la una semana de estudio, a los ratones se les administró una dosis subcutánea de solución salina cada 2 días, y el control de emparejamiento o antisentido erróneo con su administración en los días 0, 2, 4, 6. En el día 7, se anestesió a los animales con pentobarbital y se recolectaron muestras de sangre sin ayunar exactamente 5 minutos después del plexo retrobulbar a través de tubos capilares heparinizados bajo anestesia ligera de éter. La medición de IGF-I sérico se realizó por medio de un radioinmunoensayo en el día 7.

En el estudio de una semana, el inhibidor ISIS 227446 antisentido del receptor de la hormona de crecimiento redujo el IGF-I sérico por un 33% con la dosis de 50 mg/kilogramo, en comparación al control de solución salina ($p < 0.001$), y por un 20% en comparación con el control no relacionado ($p < 0.068$). El control no relacionado con la dosis de 50 mg/kilogramos redujo el IGF-I sérico por un 17% en comparación de la solución salina ($p > 0.05$).

Los niveles de ARNm del receptor de la hormona de crecimiento en las muestras de tejidos del hígado de ratones tratados y no tratados en este estudio de una semana fueron expuestos a ensayos. El inhibidor ISIS 227446

antisentido del receptor de la hormona de crecimiento redujo los niveles de ARNm del receptor de la hormona de crecimiento en el hígado después del estudio de una semana por un 72% con una dosis de 50 mg/kilogramos, en relación al control de solución salina ($p < 0.0001$). La dosis de 30 mg/kilogramo de ISIS 227446 generó una reducción del 50% en el ARNm del receptor de la hormona de crecimiento ($p < 0.0001$). El oligonucleótido ISIS 260120 de control no relacionado, a 50 mg/kilogramos, redujo los niveles de ARNm del receptor de la hormona de crecimiento por aproximadamente un 15% ($p > 0.05$).

Ejemplo 21

Reducción de los niveles de ARNm del receptor de la hormona de crecimiento y del IGF-I sérico después del tratamiento con antisentido al receptor de la hormona de crecimiento-estudio de 2 semanas

Un estudio de 2 semanas fue realizado en una forma similar al estudio de una semana en el ejemplo 18, esta vez utilizando ISIS 227446 con dosis de 3, 5, 10, 20 y 30 mg/kilogramo. El control de emparejamiento erróneo recibió las mismas dosis. Los ratones fueron tratados con el compuesto antisentido o la solución salina cada 2 días durante 14 días.

La tabla 5 muestra los niveles de IGF-1 sérico en ratones tratados durante 14 días. Los valores P fueron determinados por la prueba t.

Tabla 5

Estudio de 2 semanas de ratones - niveles de IGF/I sérico después del tratamiento con inhibidores antisentido del receptor de la hormona de crecimiento			
Dosis de ISIS 227446 (miligramo/kilogramo)	IGF-I sérico en el día 14 ng/mililitro	Reducción porcentual en relación a los 3 mg/kilogramo de ISIS 227446	Valor p
30	126	41	0.0002
20	122	43	0.0002
10	130	39	0.0002
5	194	9	0.3261
3	214	0	-

La reducción del IGF-I sérico a los 14 días dependió de la dosis con una reducción del 39-43% en los niveles alcanzados a >10 mg/kilogramo en comparación a los 3 mg/kilogramo. La dosis de 3 mg/kilogramo de ISIS 227446 no tuvieron efectos en los niveles de IGF-I sérico y fue equivalente al control de solución salina (sin tratamiento) (mostrado en un experimento separado).

Controles de emparejamiento erróneo dieron menores reducciones en los niveles de IGF-I sérico. Estos resultados son demostrados en la tabla 6. El efecto con 30 mg/kilogramos observado con el oligonucleótido de emparejamiento erróneo a las 2 semanas no fue observado con un oligonucleótido de control negativo no relacionado (ISIS 260120; IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 268).

Tabla 6

Estudio de 2 semanas de ratones-niveles de IGF-I sérico después del tratamiento con el control ISIS 261303 de emparejamiento erróneo			
Dosis de ISIS 261303 (miligramos/kilogramo)	IGF-I sérico en el día 14 ng/mililitro	Reducción porcentual en relación a 3 mg/kilogramos de ISIS 261303	Valor p
30	130	29	0.0094
20	164	11	0.2496
10	174	5	0.6160
5	186	0	0.9359
3	184	0	-

Los niveles del ARNm del receptor de la hormona de crecimiento en las muestras de tejidos del hígado de ratones tratados y no tratados en este estudio de 2 semanas fueron expuestas a ensayos. El inhibidor ISIS 227446 antisentido del receptor de la hormona de crecimiento redujo los niveles de ARNm del receptor de la hormona de crecimiento en el hígado después del estudio de 2 semanas por un 50% con la dosis de 20 mg/kilogramo en comparación al control de solución salina ($p < 0.001$). La dosis de 30 mg/kilogramo de ISIS 227446 generó una reducción del 53% en el ARNm del receptor de la hormona de crecimiento ($p < 0.0001$). El oligonucleótido ISIS 261303 de control de emparejamiento erróneo (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 267), con una dosis de 30 mg/kilogramo, redujo los niveles de ARNm de la hormona de crecimiento por aproximadamente un 3%.

10 **Ejemplo 22**

Efecto de la inhibición antisentido del receptor de la hormona de crecimiento en la retinopatía

15 La retinopatía de pre-madurez es una enfermedad de neovascularización que puede conllevar a la ceguera en infantes con una masa muy baja de nacimiento. La retinopatía (una formación anormal de los vasos sanguíneos) es iniciada por niveles relativamente altos de oxígeno tales como los que se encuentran en incubadoras de infantes, por ejemplo. Un modelo de ratones de retinopatía (una formación anormal de vasos sanguíneos en la retina) es utilizado para estudiar los efectos de medicamentos en la magnitud de la neovascularización.

20 Ratones de 7 días de edad son colocados en una incubadora infantes con su madre mientras son amamantados en un 75% de oxígeno desde el día posnatal 7 al día 12 para producir una retinopatía inducida por oxígeno tal como se describió anteriormente por Smith et al., 1994, Invest Ophthalmol Vis Sci 35,101-111; Robinson et al., Proc Natl Acad Sci Estados Unidos de América, 1996, May 14;93, 4851-6. La concentración de oxígeno es medida por lo menos diariamente mientras los animales se encuentran expuestos al oxígeno. En el día 12 posnatal, los animales son regresadas al aire del cuarto. Los animales son sacrificados en el día posnatal 17 cuando se observa una máxima neovascularización.

25 A los ratones se les da una dosis con oligonucleótidos antisentido en los días posnatales 12, 13, 14, 15 y 16 o los días 7, 8, 9, 11, 13, 15 y 17. Los oligonucleótidos son administrados intraperitonealmente en concentraciones de 5, 10, 20 y 30 mg/kilogramo. También se administrará el control ISIS 261303 de emparejamiento erróneo y/o del control ISIS 260120 de control antisentido negativo no relacionado.

Ejemplo 23

35 **Modelos adicionales**

Estudios utilizando inhibidores antisentido del receptor de la hormona de crecimiento también son hechos en los siguientes modelos animales de patología y en humanos tal como es entendido por aquellas personas con conocimiento en la técnica: modelos de nefropatía diabética tipo I y tipo II, modelos de cáncer, modelos de artritis y modelos de diarrea inducida por quimioterapia.

LISTAS SECUENCIALES

45 <110> George Tachas
Kenneth W. Dobie
Ravi Jain
Christopher Ian Belyea
Mark Andrew Heffernan

50 <120> MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO Y LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA

<130> BIOL0002US

55 <150> 60/451,455

<151> 2003-02-28

60 <160> 268

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 1
tccgcatcgc ctctcaggg 20

5

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 2
gtgcgcgcga gcccgaaatc 20

15

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

25

<400> 3
atgcattctg cccccaagga 20

<210> 4
<211> 4414
<212> ADN
<213> H. sapiens

30

<220>
<220>

35

<221> CDS
<222> (44)...(1960)

<400> 4

40

45

50

55

60

65

ES 2 652 018 T3

	ccgcgcctctc tgatcagagg cgaagctcgg aggtcctaca ggt atg gat ctc tgg	55
	Met Asp Leu Trp	
	1	
5	cag ctg ctg ttg acc ttg gca ctg gca gga tca agt gat gct ttt tct	103
	Gln Leu Leu Leu Thr Leu Ala Leu Ala Gly Ser Ser Asp Ala Phe Ser	
	5 10 15 20	
10	gga agt gag gcc aca gca gct atc ctt agc aga gca ccc tgg agt ctg	151
	Gly Ser Glu Ala Thr Ala Ala Ile Leu Ser Arg Ala Pro Trp Ser Leu	
	25 30 35	
15	caa agt gtt aat cca ggc cta aag aca aat tct tct aag gag cct aaa	199
	Gln Ser Val Asn Pro Gly Leu Lys Thr Asn Ser Ser Lys Glu Pro Lys	
	40 45 50	
20	ttc acc aag tgc cgt tca cct gag cga gag act ttt tca tgc cac tgg	247
	Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Arg Glu Thr Phe Ser Cys His Trp	
	55 60 65	
25	aca gat gag gtt cat cat ggt aca aag aac cta gga ccc ata cag ctg	295
	Thr Asp Glu Val His His Gly Thr Lys Asn Leu Gly Pro Ile Gln Leu	
	70 75 80	
30	ttc tat acc aga agg aac act caa gaa tgg act caa gaa tgg aaa gaa	343
	Phe Tyr Thr Arg Arg Asn Thr Gln Glu Trp Thr Gln Glu Trp Lys Glu	
	85 90 95 100	
35	tgc cct gat tat gtt tct gct ggg gaa aac agc tgt tac ttt aat tca	391
	Cys Pro Asp Tyr Val Ser Ala Gly Glu Asn Ser Cys Tyr Phe Asn Ser	
	105 110 115	
40	tcg ttt acc tcc atc tgg ata cct tat tgt atc aag cta act agc aat	439
	Ser Phe Thr Ser Ile Trp Ile Pro Tyr Cys Ile Lys Leu Thr Ser Asn	
	120 125 130	
45	ggt ggt aca gtg gat gaa aag tgt ttc tct gtt gat gaa ata gtg caa	487
	Gly Gly Thr Val Asp Glu Lys Cys Phe Ser Val Asp Glu Ile Val Gln	
	135 140 145	
50	cca gat cca ccc att gcc ctc aac tgg act tta ctg aac gtc agt tta	535
	Pro Asp Pro Pro Ile Ala Leu Asn Trp Thr Leu Leu Asn Val Ser Leu	
	150 155 160	
55	act ggg att cat gca gat atc caa gtg aga tgg gaa gca cca cgc aat	583
	Thr Gly Ile His Ala Asp Ile Gln Val Arg Trp Glu Ala Pro Arg Asn	
	165 170 175 180	
60	gca gat att cag aaa gga tgg atg gtt ctg gag tat gaa ctt caa tac	631
	Ala Asp Ile Gln Lys Gly Trp Met Val Leu Glu Tyr Glu Leu Gln Tyr	

ES 2 652 018 T3

	185	190	195	
	aaa gaa gta aat gaa act aaa tgg aaa atg atg gac cct ata ttg aca			679
	Lys Glu Val Asn Glu Thr Lys Trp Lys Met Met Asp Pro Ile Leu Thr			
	200	205	210	
5	aca tca gtt cca gtg tac tca ttg aaa gtg gat aag gaa tat gaa gtg			727
	Thr Ser Val Pro Val Tyr Ser Leu Lys Val Asp Lys Glu Tyr Glu Val			
	215	220	225	
10	cgt gtg aga tcc aaa caa cga aac tct gga aat tat ggc gag ttc agt			775
	Arg Val Arg Ser Lys Gln Arg Asn Ser Gly Asn Tyr Gly Glu Phe Ser			
	230	235	240	
15	gag gtg ctc tat gta aca ctt cct cag atg agc caa ttt aca tgt gaa			823
	Glu Val Leu Tyr Val Thr Leu Pro Gln Met Ser Gln Phe Thr Cys Glu			
	245	250	255	260
20	gaa gat ttc tac ttt cca tgg ctc tta att att atc ttt gga ata ttt			871
	Glu Asp Phe Tyr Phe Pro Trp Leu Leu Ile Ile Ile Phe Gly Ile Phe			
	265	270	275	
25	ggg cta aca gtg atg cta ttt gta ttc tta ttt tct aaa cag caa agg			919
	Gly Leu Thr Val Met Leu Phe Val Phe Leu Phe Ser Lys Gln Gln Arg			
	280	285	290	
30	att aaa atg ctg att ctg ccc cca gtt cca gtt cca aag att aaa gga			967
	Ile Lys Met Leu Ile Leu Pro Pro Val Pro Val Pro Lys Ile Lys Gly			
	295	300	305	
35	atc gat cca gat ctc ctc aag gaa gga aaa tta gag gag gtg aac aca			1015
	Ile Asp Pro Asp Leu Leu Lys Glu Gly Lys Leu Glu Glu Val Asn Thr			
	310	315	320	
40	atc tta gcc att cat gat agc tat aaa ccc gaa ttc cac agt gat gac			1063
	Ile Leu Ala Ile His Asp Ser Tyr Lys Pro Glu Phe His Ser Asp Asp			
	325	330	335	340
45	tct tgg gtt gaa ttt att gag cta gat att gat gag cca gat gaa aag			1111
	Ser Trp Val Glu Phe Ile Glu Leu Asp Ile Asp Glu Pro Asp Glu Lys			
	345	350	355	
50	act gag gaa tca gac aca gac aga ctt cta agc agt gac cat gag aaa			1159
	Thr Glu Glu Ser Asp Thr Asp Arg Leu Leu Ser Ser Asp His Glu Lys			
	360	365	370	
55	tca cat agt aac cta ggg gtg aag gat ggc gac tct gga cgt acc agc			1207
	Ser His Ser Asn Leu Gly Val Lys Asp Gly Asp Ser Gly Arg Thr Ser			
	375	380	385	
60	tgt tgt gaa cct gac att ctg gag act gat ttc aat gcc aat gac ata			1255
	Cys Cys Glu Pro Asp Ile Leu Glu Thr Asp Phe Asn Ala Asn Asp Ile			
	390	395	400	
65	cat gag ggt acc tca gag gtt gct cag cca cag agg tta aaa ggg gaa			1303
	His Glu Gly Thr Ser Glu Val Ala Gln Pro Gln Arg Leu Lys Gly Glu			
	405	410	415	420
70	gca gat ctc tta tgc ctt gac cag aag aat caa aat aac tca cct tat			1351
	Ala Asp Leu Leu Cys Leu Asp Gln Lys Asn Gln Asn Asn Ser Pro Tyr			
	425	430	435	
75	cat gat gct tgc cct gct act cag cag ccc agt gtt atc caa gca gag			1399
	His Asp Ala Cys Pro Ala Thr Gln Gln Pro Ser Val Ile Gln Ala Glu			
	440	445	450	

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

```

aaa aac aaa cca caa cca ctt cct act gaa gga gct gag tca act cac 1447
Lys Asn Lys Pro Gln Pro Leu Pro Thr Glu Gly Ala Glu Ser Thr His
      455                      460                      465

caa gct gcc cat att cag cta agc aat cca agt tca ctg tca aac atc 1495
Gln Ala Ala His Ile Gln Leu Ser Asn Pro Ser Ser Leu Ser Asn Ile
      470                      475                      480

gac ttt tat gcc cag gtg agc gac att aca cca gca ggt agt gtg gtc 1543
Asp Phe Tyr Ala Gln Val Ser Asp Ile Thr Pro Ala Gly Ser Val Val
485                      490                      495                      500

ctt tcc ccg ggc caa aag aat aag gca ggg atg tcc caa tgt gac atg 1591
Leu Ser Pro Gly Gln Lys Asn Lys Ala Gly Met Ser Gln Cys Asp Met
      505                      510                      515

cac ccg gaa atg gtc tca ctc tgc caa gaa aac ttc ctt atg gac aat 1639
His Pro Glu Met Val Ser Leu Cys Gln Glu Asn Phe Leu Met Asp Asn
      520                      525                      530

gcc tac ttc tgt gag gca gat gcc aaa aag tgc atc cct gtg gct cct 1687
Ala Tyr Phe Cys Glu Ala Asp Ala Lys Lys Cys Ile Pro Val Ala Pro
      535                      540                      545

cac atc aag gtt gaa tca cac ata cag cca agc tta aac caa gag gac 1735
His Ile Lys Val Glu Ser His Ile Gln Pro Ser Leu Asn Gln Glu Asp
      550                      555                      560

att tac atc acc aca gaa agc ctt acc act gct gct ggg agg cct ggg 1783
Ile Tyr Ile Thr Thr Glu Ser Leu Thr Thr Ala Ala Gly Arg Pro Gly
565                      570                      575                      580

aca gga gaa cat gtt cca ggt tct gag atg cct gtc cca gac tat acc 1831
Thr Gly Glu His Val Pro Gly Ser Glu Met Pro Val Pro Asp Tyr Thr
      585                      590                      595

tcc att cat ata gta cag tcc cca cag ggc ctc ata ctc aat gcg act 1879
Ser Ile His Ile Val Gln Ser Pro Gln Gly Leu Ile Leu Asn Ala Thr
      600                      605                      610

gcc ttg ccc ttg cct gac aaa gag ttt ctc tca tca tgt ggc tat gtg 1927
Ala Leu Pro Leu Pro Asp Lys Glu Phe Leu Ser Ser Cys Gly Tyr Val
      615                      620                      625

agc aca gac caa ctg aac aaa atc atg cct tag cctttctttg gtttcccaag 1980
Ser Thr Asp Gln Leu Asn Lys Ile Met Pro
      630                      635

agctacgtat ttaatagcaa agaattgact ggggcaataa cgtttaagcc aaaacaatgt 2040

ttaaacccttt tttgggggag tgacaggatg ggggatggat tctaaaatgc cttttcccaa 2100

aatggtgaaa tatgatgta aaaaaataag aagaatgctt aatcagatag atattcctat 2160

tgtgcaatgt aatatTTTTa agaattgtg tcagactggt tagtagcagt gattgtctta 2220

atattgtggg tgTTaTTTT tgatactaag cattgaatgg ctatgTTTT aatgtatagt 2280

aatcacgct ttttgaaaaa gcgaaaaaat caggtggctt ttgcggttca ggaaaattga 2340

atgcaaacca tagcacaggc taattTTTT ttgTTTTctta aataagaaac ttttttattt 2400

aaaaaactaa aaactagagg tgagaaattt aaactataag caagaaggca aaaatagttt 2460
  
```

ES 2 652 018 T3

5 ggatatgtaa aacatttact ttgacataaa gttgataaag attttttaat aatttagact 2520
 tcaagcatgg ctattttata ttacactaca cactgtgtac tgcagttggt atgacccctc 2580
 taaggagtgt agcaactaca gtctaaaget ggtttaatgt tttggccaat gcacctaaag 2640
 10 aaaaacaaac tcgtttttta caaagccctt ttatacctcc ccagactcct tcaacaattc 2700
 taaaatgatt gtagtaatct gcattattgg aatataattg ttttatctga atttttaaac 2760
 aagtatttgt taatttagaa aactttaaag cgtttgcaca gatcaactta ccaggcacca 2820
 15 aaagaagtaa aagcaaaaaa gaaaaccctt cttcaccaaa tcttggttga tgccaaaaaa 2880
 aaatacatgc taagagaagt agaaatcata gctgggtcac actgaccaag atacttaagt 2940
 gctgcaattg cacgoggagt gagtttttta gtgctgcag atggtgagag ataagatcta 3000
 20 tagcctctgc agcggaatct gttcacacce aacttggtt tgctacataa ttatccagga 3060
 aggaataag gtacaagaag cattttgtaa gttgaagcaa atcgaatgaa attaactggg 3120
 25 taatgaaaca aagagttcaa gaaataagtt tttgtttcac agcctataac cagacacata 3180
 ctcatttttc atgataatga acagaacata gacagaagaa acaaggtttt cagtccccac 3240
 agataactga aaattattta aaccgctaaa agaaactttc tttctacta aatcttttat 3300
 30 aggatttatt taaaatagca aaagaagaag tttcatcatt ttttacttcc tctctgagtg 3360
 gactggcctc aaagcaagca ttcagaagaa aaagaagcaa cctcagtaat ttagaaatca 3420
 35 ttttgcaatc ccttaatatc ctaaaccatca ttcatttttg ttggtggtgt tgttgtgag 3480
 acagagtctc gctctgtcgc caggctagag tgcggtggcg cgatcttgac tcaactgcaat 3540
 ctccacctcc cacaggttca ggcgattccc gtgcctcagc ctctgagta gctgggacta 3600
 40 caggcacgca ccaccatgcc aggctaattt ttttgtattt tagcagagac ggggtttcac 3660
 catgttggcc aggatggtct cgagtctcct gacctcgtga tccaccgac tgggctccc 3720
 aaagtgctgg gattacaggt gtaagccacc gtgccagcc ctaaaccatca ttcttgagag 3780
 45 cattgggata tctctgaaa aggtttatga aaaagaagaa tctcatctca gtgaagaata 3840
 cttctcattt tttaaaaaag cttaaaactt tgaagttagc ttttaactaa atagtatttc 3900
 50 ccatttatcg cagacctttt ttaggaagca agcttaatgg ctgataattt taaattctct 3960
 ctcttgagg aaggactatg aaaagctaga attgagtgtt taaagttcaa catgttattt 4020
 gtaatagatg tttgatagat tttctgctac tttgctgcta tggttttctc caagagctac 4080
 55 ataatttagt ttcataataa gtatcatcag tgtagaacct aattcaattc aaagctgtgt 4140
 gtttggaaga ctatcttact atttcacaac agcctgacaa catttctata gccaaaaata 4200
 60 gctaaatacc tcaatcagtc tcagaatgtc attttggtag tttggtggcc acataagcca 4260
 ttattcaacta gtatgactag ttgtgtctgg cagtttatat ttaactctct ttatgtctgt 4320
 ggattttttc cttcaaagtt taataaattt attttcttgg attcctgata atgtgcttct 4380
 65 gttatcaaac accaacataa aatgatcta aacc 4414

5 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Cebador de PCR

<400> 5
 gatgtcccaa tgtgacatgc a 21

15 <210> 6
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 6
 aagtaggcat tgtccataag gaagtt 26

25 <210> 7
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Sonda de PCR

<400> 7
 35 ccggaatgg tctcactctg ccaaga 26

<210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

45 <400> 8
 gaaggtgaag gtcggagtc 19

<210> 9
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

55 <400> 9
 gaagatggtg atgggatttc 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>
 65 <223> Sonda de PCR

<400> 10
caagcttccc gttctcagcc 20

5 <210> 11
<211> 4174
<212> ADN
<213> M. musculus

10 <220>
<221> no es seguro
<222> 2636
<223> desconocido

15 <221> no es seguro
<222> 2666
<223> desconocido

20 <221> no es seguro
<222> 2759
<223> desconocido

25 <221> no es seguro
<222> 2789
<223> desconocido

30 <221> no es seguro
<222> 3326
<223> desconocido

30 <221> no es seguro
<222> 3352
<223> desconocido

35 <221> no es seguro
<222> 3503
<223> desconocido

40 <221> no es seguro
<222> 3666
<223> desconocido

45 <221> no es seguro
<222> 3668
<223> desconocido

<223>

50 <220>
<221> CDS
<222> (240)...(2192)

<400> 11

55

60

65

ES 2 652 018 T3

5
 tgacaaccca cgagctgcca agcaggcgca gccatgggaa gaggaggcgg tctagggagc 60
 gggggcactg gcagaggcgg ctgctacagc ggcgggtgtg ggcagggctg ttactgaacc 120
 10 cgggcagccg cggggatccc gggctgggtc caagcggcct gaggcctcgg ctccagcagc 180
 ccccaagcgg acacgaaccc gcgttctgtc tcccaggcgg aaactccgag gtctcaggt 239
 15
 atg gat ctt tgt cag gtc ttc tta acc ttg gca ctg gca gtc acc agc 287
 Met Asp Leu Cys Gln Val Phe Leu Thr Leu Ala Leu Ala Val Thr Ser
 1 5 10 15
 20 agc aca ttt tct gga agt gag gct aca cca gct act ctt ggc aaa gct 335
 Ser Thr Phe Ser Gly Ser Glu Ala Thr Pro Ala Thr Leu Gly Lys Ala
 20 25 30
 tcc cca gtt ctg caa aga atc aat cca agc ctg ggg aca agt tct tct 383
 Ser Pro Val Leu Gln Arg Ile Asn Pro Ser Leu Gly Thr Ser Ser Ser
 35 40 45
 25 gga aag cct cga ttc acc aag tgt cgt tcc cct gaa ctg gag aca ttt 431
 Gly Lys Pro Arg Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Leu Glu Thr Phe
 50 55 60
 30 tca tgc tac tgg aca gaa gga gat aat cct gat tta aag acc cca gga 479
 Ser Cys Tyr Trp Thr Glu Gly Asp Asn Pro Asp Leu Lys Thr Pro Gly
 65 70 75 80
 tct att cag ctg tac tat gct aaa agg gaa agc caa cga caa gct gca 527
 Ser Ile Gln Leu Tyr Tyr Ala Lys Arg Glu Ser Gln Arg Gln Ala Ala
 85 90 95
 35 aga att gct cat gaa tgg acc cag gaa tgg aaa gaa tgc cct gat tat 575
 Arg Ile Ala His Glu Trp Thr Gln Glu Trp Lys Glu Cys Pro Asp Tyr
 100 105 110
 40 gtc tct gct gga aaa aac agc tgt tac ttc aac tca tca tat acc tcc 623
 Val Ser Ala Gly Lys Asn Ser Cys Tyr Phe Asn Ser Ser Tyr Thr Ser
 115 120 125
 att tgg ata ccc tac tgc atc aag cta act aca aat ggt gat ttg ctg 671
 Ile Trp Ile Pro Tyr Cys Ile Lys Leu Thr Thr Asn Gly Asp Leu Leu
 130 135 140
 45 gac caa aaa tgt ttc act gtt gac gaa ata gtg caa cct gat cca ccc 719
 Asp Gln Lys Cys Phe Thr Val Asp Glu Ile Val Gln Pro Asp Pro Pro
 145 150 155 160
 50 att ggc ctc aac tgg act tta cta aac att agt ttg acc ggg att cgt 767
 Ile Gly Leu Asn Trp Thr Leu Leu Asn Ile Ser Leu Thr Gly Ile Arg
 165 170 175
 55 gga gac atc caa gtg agt tgg caa cca cca ccc aat gca gat gtt ctg 815
 Gly Asp Ile Gln Val Ser Trp Gln Pro Pro Pro Asn Ala Asp Val Leu
 180 185 190
 60 aag gga tgg ata att ctg gag tat gaa att cag tac aaa gaa gta aat 863
 Lys Gly Trp Ile Ile Leu Glu Tyr Glu Ile Gln Tyr Lys Glu Val Asn
 195 200 205
 65

ES 2 652 018 T3

	gaa tca aaa tgg aaa gtg atg ggc cct ata tgg tta aca tac tgt cca	911
	Glu Ser Lys Trp Lys Val Met Gly Pro Ile Trp Leu Thr Tyr Cys Pro	
	210 215 220	
5	gtg tac tca ttg aga atg gat aaa gaa cat gaa gtg cgg gtg aga tcc	959
	Val Tyr Ser Leu Arg Met Asp Lys Glu His Glu Val Arg Val Arg Ser	
	225 230 235 240	
10	aga caa cgg agc ttt gaa aag tac agc gag ttc agc gaa gtc ctc cgt	1007
	Arg Gln Arg Ser Phe Glu Lys Tyr Ser Glu Phe Ser Glu Val Leu Arg	
	245 250 255	
15	gta ata ttt cct cag acg aac ata ttg gaa gca tgt gaa gaa gat atc	1055
	Val Ile Phe Pro Gln Thr Asn Ile Leu Glu Ala Cys Glu Glu Asp Ile	
	260 265 270	
20	cag ttt cca tgg ttc tta att att atc ttt gga ata ttt gga gta gca	1103
	Gln Phe Pro Trp Phe Leu Ile Ile Ile Phe Gly Ile Phe Gly Val Ala	
	275 280 285	
25	gtg atg cta ttt gta gtt ata ttt tca aag cag caa agg att aag atg	1151
	Val Met Leu Phe Val Val Ile Phe Ser Lys Gln Gln Arg Ile Lys Met	
	290 295 300	
30	ctg att tta ccc cca gtc cca gtt cca aag att aaa ggg att gat cca	1199
	Leu Ile Leu Pro Pro Val Pro Val Pro Lys Ile Lys Gly Ile Asp Pro	
	305 310 315 320	
35	gat ctt ctc aag gga ggg aag ttg gag gag gtg aac acc atc tta ggc	1247
	Asp Leu Leu Lys Gly Gly Lys Leu Glu Glu Val Asn Thr Ile Leu Gly	
	325 330 335	
40	att cat gat aac tac aaa ccc gac ttc tac aat gat gat tcc tgg gtc	1295
	Ile His Asp Asn Tyr Lys Pro Asp Phe Tyr Asn Asp Asp Ser Trp Val	
	340 345 350	
45	gag ttc att gag cta gat att gat gaa gca gat gtg gat gag aag act	1343
	Glu Phe Ile Glu Leu Asp Ile Asp Glu Ala Asp Val Asp Glu Lys Thr	
	355 360 365	
50	gaa ggg tct gac aca gac aga ctt cta agc aat gat cat gag aaa tca	1391
	Glu Gly Ser Asp Thr Asp Arg Leu Leu Ser Asn Asp His Glu Lys Ser	
	370 375 380	
55	gct ggt atc ctt gga gca aag gat gat gat tct ggg cgt acc agc tgt	1439
	Ala Gly Ile Leu Gly Ala Lys Asp Asp Asp Ser Gly Arg Thr Ser Cys	
	385 390 395 400	
60	tac gac cct gac att ttg gat act gat ttc cat acc agt gac atg tgt	1487
	Tyr Asp Pro Asp Ile Leu Asp Thr Asp Phe His Thr Ser Asp Met Cys	
	405 410 415	
65	gat ggt acc ttg aag ttt gct cag tca cag aag tta aat atg gaa gct	1535
	Asp Gly Thr Leu Lys Phe Ala Gln Ser Gln Lys Leu Asn Met Glu Ala	
	420 425 430	
70	gat ctc ttg tgc ctt gat cag aag aat ctg aag aac ttg cct tat gat	1583
	Asp Leu Leu Cys Leu Asp Gln Lys Asn Leu Lys Asn Leu Pro Tyr Asp	
	435 440 445	
75	gct tcc ctt ggc tct ctg cat ccc tcc att acc cag aca gta gaa gaa	1631
	Ala Ser Leu Gly Ser Leu His Pro Ser Ile Thr Gln Thr Val Glu Glu	
	450 455 460	
80	aac aag cca cag cca ctt ttg agc agc gaa act gag gca acc cac caa	1679

ES 2 652 018 T3

	Asn Lys Pro Gln Pro Leu Leu Ser Ser Glu Thr Glu Ala Thr His Gln				
	465	470	475	480	
5	ctc gcc tct aca ccg atg agt aat ccc aca tca ctg gca aac att gac	1727			
	Leu Ala Ser Thr Pro Met Ser Asn Pro Thr Ser Leu Ala Asn Ile Asp				
		485	490	495	
10	ttt tat gcc caa gta agc gac att aca cca gca ggt ggt gat gtc ctt	1775			
	Phe Tyr Ala Gln Val Ser Asp Ile Thr Pro Ala Gly Gly Asp Val Leu				
		500	505	510	
15	tcc cca ggc caa aag att aag gca ggg ata gcc caa ggc aat acc cag	1823			
	Ser Pro Gly Gln Lys Ile Lys Ala Gly Ile Ala Gln Gly Asn Thr Gln				
		515	520	525	
20	cgg gag gtg gcc acg ccc tgc caa gaa aat tac agc atg aac agt gcc	1871			
	Arg Glu Val Ala Thr Pro Cys Gln Glu Asn Tyr Ser Met Asn Ser Ala				
		530	535	540	
25	tac ttt tgt gag tca gat gcc aaa aaa tgc atc gct gtg gcc cgt cgc	1919			
	Tyr Phe Cys Glu Ser Asp Ala Lys Lys Cys Ile Ala Val Ala Arg Arg				
		545	550	555	560
30	atg gaa gcc acg tct tgt ata aaa cca agc ttt aac caa gag gac att	1967			
	Met Glu Ala Thr Ser Cys Ile Lys Pro Ser Phe Asn Gln Glu Asp Ile				
		565	570	575	
35	tac atc acc aca gaa agc ctt acc act act gcc cag atg tct gag aca	2015			
	Tyr Ile Thr Thr Glu Ser Leu Thr Thr Thr Ala Gln Met Ser Glu Thr				
		580	585	590	
40	gca gat att gct cca gat gct gag atg tct gtc cca gac tac acc acg	2063			
	Ala Asp Ile Ala Pro Asp Ala Glu Met Ser Val Pro Asp Tyr Thr Thr				
		595	600	605	
45	gtt cac acc gtg cag tct cca agg ggc ctt ata ctc aac gca act gct	2111			
	Val His Thr Val Gln Ser Pro Arg Gly Leu Ile Leu Asn Ala Thr Ala				
		610	615	620	
50	ttg cct ttg cct gac aaa aag aat ttt ccc tcc tgc tgt ggt tat gtg	2159			
	Leu Pro Leu Pro Asp Lys Lys Asn Phe Pro Ser Ser Ser Cys Gly Tyr Val				
		625	630	635	640
55	agc aca gac caa ctg aac aaa atc atg cag tag cctttcctat ctttaaatgg	2212			
	Ser Thr Asp Gln Leu Asn Lys Ile Met Gln				
		645	650		
60	caagggaaag gctgggcaca aacgcttaaa ccaaaactat gttttaaatc tgtgttggga	2272			
65	gagcatgaga gtggatatgg attctaaaat actttttctg gaaatgtcaa aatatcaata	2332			
70	agtggaaaat caagaattcg taatcagata aatgctccca ttgtgaatta taaatatttt	2392			
75	aatgaattgt ctttaagact gtatagtggc agtgattgtc tgtactgtgg gtcttaattt	2452			
80	tgtgatacta agcattaaat agctacgttt tttatgtatg tagatcatgc ttttgaaaa	2512			
85	agcaaaacaa tcagggtggct tttgcagttc aggaaattga atgcagatta tagcacaggc	2572			
90	tgattttttt tttctttttt aaataactgg gaactaaaac tctaggtgag aaggtaaaac	2632			
95	tagnttggat atgcaaaaca tttattttga catnaaattg ataaagatat ttttaataat	2692			
100	ttacacttta agcatgagkm ctttataata tgctacacac atattgtagt tcagaacaat	2752			

ES 2 652 018 T3

5 ccactcnagg atgtagcagc tacagtgtaa agagggnttc atgttttggg caatgaacgt 2812
aaagaaaacc aaacaagtta gatttttaca aagccctttt ataacttcca aaacttetta 2872
actctaaaaa tgtctaataa cctgcattat tagaaaaaaa cattttaaat ttgtaaacga 2932
10 atatTTTTTT aattttgaaa actttatTTT tttttaatgt tgaatcaacg taccatacac 2992
caaacagtaa acagaaatta taataatgga agaagtgctt tcttcgacaa atttcattc 3052
aagccacaca gctacatgta agagaagtag aagtgatgtg gtgtgattgg ctaggatgca 3112
15 gaagagcttc aggaatacaa gaagtgagag cccaaggatt gggaggaggg ggctctcaca 3172
tctccacagt gcagctctgc aaaccagct tggTTTTT agtattctaa gaattattgt 3232
gtacaaggaa aagtctcaca tgtatgaaat ccagtatcca gatggggtaa agttagcaga 3292
20 taataggata ggaaattaa gacctagatc tagnactagt ggactTTTTT cacagacagn 3352
acacaaattt ttaattcagc gagaagggac agaataaatg acttcccact cacaaagcac 3412
aactcagaag taattaaaca ggtaacagaa accttgccat caaacctttg ataagatgta 3472
25 ttttaagtag taagcagtat ttcaatgctt nttacttacc ctcccaggac aaccgatctc 3532
aaataaggga gataaggtag ataaaaatca ctttttgatt ctgtaataac ataaacatag 3592
30 ttctttgggt tagcaccccc ccaaaaaaaaa atttatggga gaaagaggac tctcagctga 3652
ctgaagaata catnntattt aaatattttt tagatgcttg aaactttaaa attaccttta 3712
agttttaatg gattaccatt ttgccaagac ctttgtgggg aaacaagctt aatgtttagt 3772
35 gatTTTgaaa tctctttcat gcaggagaga cagtgaaaat ctagccttgg gtgtttaagg 3832
ttgccttTgt tactttgtaa tagattttaa taagtttttc tgctactttg ctgctatggT 3892
ttctccaatg gctacatgat ttagtTcata tgaagtatca tcaacttaga atctattcag 3952
40 cttaaagatg tTgttttTga tgaactatct taccattTca ccataggtcT accacgtTtc 4012
tatagccaaa aatagctaaa tacctcaatc agttccagaa Tgtcattttt TggTactttg 4072
ctggccacac aagccgttat tcaccgttta actagttTgt ttctgcagtc tatattTaaC 4132
45 tttctttatg tctgtggatt tttccctTca aagttcaata aa 4174

50 <210> 12
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Cebador de PCR

<400> 12
ttgacgaaat agtgcacct gatc 24

60 <210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Cebador de PCR
<400> 13
5 cgaatcccg tcaaactaat g 21
<210> 14
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
10 <220>
<223> Sonda de PCR
<400> 14
15 cattggcctc aactggactt tactaa 26
<210> 15
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de PCR
25 <400> 15
ggcaaattca acggcacagt 20
<210> 16
<211> 20
30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de PCR
35 <400> 16
gggtctcgct cctggaagat 20
<210> 17
40 <211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
45 <223> Cebador de PCR
<400> 17
aaggccgaga atggaagct tgtcatc 27
50 <210> 18
<211> 34099
<212> ADN
<213> H. sapiens
55 <400> 18

60

65

5
 tgataaccag ctcagaacac acacatatta gttgttctcc ctttctctcc caccctcccc 60
 attccctgac tgctagatcc agaagtcate ttccagatga actacctata tccaaatcct 120
 10 aatctctagc tctggtttct taaacaggtc ctatgaaatg cttgaaataa aaggcaaaat 180
 ggtttgtgtc tagaatcaaa ggctgacaat ggcaagcaac aggcactaaa actatgaccc 240
 15 aggaaaaatg cttttctgga agacatcggc attacctcct agacacggaa tacactggct 300
 tcatcccagt agttttctca cacactttag atacgtgtct cattaggatc acatatgact 360
 cacctgattt catgccttgc cttttctttt tattctgcag attcttctaa ggagcctaaa 420
 20 ttcaccaagt gccgttcacc tgagcgagag actttttcat gccactggac agatgagggt 480
 catcatggta caaagaacct aggaccata cagctgttct ataccagaag gtgccaccat 540
 25 catgccttct tgattttcct ctccatggat gtacctacta aagtacactg agtcagatgt 600
 actgtgggaa tggaagtgat ttgttgtgat ttatgcaatc aatgaatatt cattcaactca 660
 tttattgaaa aaaatattaa tcaagcccat cctatgtgct gagtactatt ttaggccctg 720
 30 gagatatagc agtgattaca aaagacaaaa tccttggctc catggagatt tccttccaat 780
 gcagggagac aggcaataaa aattgaatta aatttcagct agtaatatag gttattaaga 840
 35 aaaataaagc cagaaagcag catatcagca gtgtgtggga gtttgtgtat gtgcatgaga 900
 atgtgtgaga gtgtgtcaaa gtgtgagtga gagcatgtat ggatacacgt gggcatgtgc 960
 atgtggatga gagtgtgtgt aaaaggcttg aatgatgctg aaatgcgtgg tcttaggagg 1020
 40 cctctctatt gtggtgtcct agaccagaga cataagtga acgggacagg ccacgtgagt 1080
 atctggggga aaggctatgc aggcagagga aattgcaagt acaaagtcct tgaggcagtc 1140
 ttggcatatt tgagggatga aaaaggccag cactgaaggc acaagattga aagtgaggag 1200
 45 agtgatatgg gaagggatca gagagttact tagggactga ccatgccaaa cctcataggc 1260
 aagggcaagg ctttgaattt tactttattt gtggtggaaa gctataggtg tttttgaaaa 1320
 50 gatatatgct ttaaaagatg tagctttggt tctaaccaga taatacactc cttctcttaa 1380
 atatattcag taaaagactg tagtactttt tcatttttac cagtgacct ctaaaataac 1440
 55 agaggaaggg tgaaacaaag acctctcaat ataggtacca tccaagttgt ttattttctc 1500
 cccttcacct ggcattattt tcattttgtt ttactctcac tgtgtatatt tttccctttt 1560
 ttacatttta ggcttaaaca cttcattatc tcctgttttc cacccaacct ccagagaagg 1620
 60 cctaagccaa gatgcagggt tagtgaggac cctttatcct tggctcaagg tgttcggttag 1680
 tcagaggatg acattgtcta tccaaccgaa gagctggaat agggaaggaa gatgcagcca 1740
 65 gcagttaagg gtatgagctc agggctaaca aacctgcact tcagtgtagt tctgcacttt 1800
 ctcaccaagg aatactaggg aaattagcca gtttgtgtac aactcagcct cctcatttgc 1860

5 agaaaggaga taatggactt gcctcatgac ttcttgtgag gatcatatga gataacccat 1920
 gaaaaaactact tggcagagta cttgacacat aataagtact cactaaatgg tagctgggat 1980
 tcttcttatac ggtagtagatag tgataatfff aaaataatta tgatatagaa atccagttcc 2040
 10 tggactataa aatgactata aattgtataa gaccatttat accagtaaat tgttataaatt 2100
 atfftaatta ttggtataag agcattffaa tgcagagctg ctgcttaatt tgcagataaa 2160
 aaaataacttg gagttagcaa ccaagcagac cttccccacc tttcagtata agagaggtct 2220
 15 cttggatgaa gtgaagttaa gatgaaatgt ttgggcacca agtatactat atffttcctt 2280
 aaggctgaca ccacagagag gttggggcca gtaaacagag ttgatttcta taaatacatt 2340
 cagacatgaa gttagtagt ttgatgacac tfftgaaatg tgtggaatca ttaagttatt 2400
 20 tgtacaggca caattagcca aactgtaaag aaaagtagca gaataacctc ttaagctggg 2460
 cccactffat gaaaataaatt tfftgctacc tcaatattta ccaaatttga tgagcaaaaa 2520
 25 gagaaatcca aaggaatgaa gccttgataa atatatatcc cttgcctca tcaatcaggg 2580
 tcacataact ctgtccacag gcattcttatg cacactccag tcatttcagc atctctggtt 2640
 caaatccagg atctacacta ccaaggatgc tctgtaaagt gtgactgggt aaagggaaac 2700
 30 gttcagacat atccagaaag atgtcttaga tfftgccctg gtagtgtttg gaatcccagg 2760
 agggtaagta cagcttcatg attaagtgc aaccctaaact tacaaaatta gatatttgtg 2820
 35 tfftttctat aaaatataac tfftttgaat atcttagcca aactactatg agcccacagc 2880
 ccagtttatac caagaaggat aaaactgagg gattaggagt atcaggactg gactggactg 2940
 attagtgtac agttatattt gatttctcat tgcctacttc acagagaaga caatacaaat 3000
 40 gcactttctg actcttatca ctgtttctta gaactcagtt gccaggcaac tctgaaact 3060
 atagaaacat gcttctcacc cctgacacat aaataaaaact ctgagatgat tfftatccaaa 3120
 45 gtcagagtca gtgggcagtg cagttgtttc agtttctgctg cctggcctca gtatctaaag 3180
 cacaacagaa cgtgaacatg tcaggctgtc aacaggacag ttcaggcaca gccctacagg 3240
 cagttgtgtg tfftgctggt ctctgctcct tgcctagggtg ctggcagaaa aggcagctc 3300
 50 cacatgttag agcagcagat tcaaaacagt gtctgccatc ctgtgatgac gatagtcca 3360
 aattcagcct ctgagcttgc aggggactca ggatgaatgc acattacagg catggtaaaa 3420
 55 agaggtctg ggaagcatgt tcagagctgt ctgctctcag ctcttgcac gtaaagtctg 3480
 tgtfftttaa ggaagtgggc atgtgaacac tcagctctta aggtcttatc cccacctct 3540
 tccataccca tccaacccca cttcaaaaat taccctggtc ttaagagaaa tffcatfftc 3600
 60 tatacaaggt tgtgtggaaa atcagtaggg agaaaggcca ttattactff cattffttct 3660
 taacaaaagt attaaatffa aagccaaaaa cgtgcgctff ctgtcatgaa aacagctgcc 3720
 65 cttaaaaaaca taaatgatgt tffatffttta ttactffttat ctagttggtt gtctfftagat 3780
 gaaaaacatt tcttctgctc tffatffttta tffttaatga tagtctctff ctatggtct 3840

cacccttcc atttcacaag atagtctggg agcaaaccta aagcacttaa cttttgggag 3900
 taagagcaga ggggagcttc catacattga ttttggtcac ctgtagagac attcaaccca 3960
 5 gagaaggcaa gtgacacagt atctgtttta tgagctaatt tgggttcttg tctacattta 4020
 atagtttaaa atataagtta taaatattta tttaaaatga aattcaacat tggttcatga 4080
 10 agaaagaggt tggaagtagt gttttgaact agctgtttct gatccatcat gcttaaaaata 4140
 aatgctctgt ttgtcctgtg gagttcatgg atttgggata atctaaacag ggttttttaa 4200
 acagtctca tggggaacaa ggtactgaca tgcactgttg agaaattctg tgaatcatga 4260
 15 aagagctaatt cttttagaaa tccagacctg ttaagcacta atctacatct ttggaatata 4320
 ttaatacttt gagttttcta acttttatac tgtcacttat gctaagtaca tttgatatac 4380
 20 cttctattat gtgaaagcct cttttctgg gcaattttct tacaactact ctctttaatg 4440
 cactcttact taatttgaaa gtaaatatca aattaagcat actatagttc aatgaaccac 4500
 ccacctatc ctaatttttt taacatttct cttctgactc tacatacaca catacttaca 4560
 25 cacacacaca caaacacacc ttatcttttc ttctgccttt tgcccattta ctttttgcac 4620
 cagagatgaa tctctcattc aagcatatgc aacttttttt ttttttgaga tggagtcttg 4680
 30 ctttggcacc caggctggag tgcagtggct cgatcttggc ttactgcaa ctttgcctcc 4740
 tgcgttcaag caattctcct gcctcagcct acctaccgaa tagctgggat tacagaagca 4800
 35 tgccatcatg cccagctaatt ttttgtattt ttagtacaga tggggtttta ccatgttagc 4860
 caggctggtc tcaatctcct aacctatgat ccgcctgcct cagcctccga aagtgtctggg 4920
 attacaggca tgaaccaccg taccagcca gcatatgcaa cttttaagag tctcaaccaa 4980
 40 agcagcaatt cactgtctca gacctggag tctctgccat ttaaatecca atttccttcc 5040
 aacagctgag gagcagctgt ctcaaggacc ctctgatact acacaagttt tctcctagtg 5100
 45 ccaagcagac cagcctgaga aacagctata agaaggaaat aggcgtcttc tcccagcttg 5160
 gcatcctttc cttccaggcc ctgccttccc tacaacctgc attgtcttca ttgtccactg 5220
 50 ctgccagca cccatcccac agagggatgg tccaaaacct ccacagtctg gctgtgagc 5280
 cacagcgcc tctgcctgca cagggccatt cctacctcat cttccacaac cacagattac 5340
 atggttttat gtccctttga cttatatatt gtcttctcaa ttaatagct agtgaataac 5400
 55 atggagatga tgaactacct cacccaagta gcaattctaa ttaagaaaa tttcctgtc 5460
 attccattgc cttttacttc cattaccaca ctcatgccca tacttctta cctcaatccc 5520
 60 tttgacctct ctgtttatc ccttcttgc ogtattgcca tctattaaac ttttaccat 5580
 cttcaagaa tgctaaaaac atacctccac cttgaagcct tccatgaaga gccagagcaa 5640
 tcattcctc ttctgaactt ttaaggacc tagagagcac tactaatgag cacttaccac 5700
 65 cattgcttg taatatggtt ttttactctt tcttctgag gcaggaggaa ttccttagac 5760

atctatgaat cccatagtgt ctgtcattat gtttagaca taaccaattc tcattaaatg 5820
 tcaatagaat gaatataaga ggccccaaaa actactcaga tgggaatttg agtcttattt 5880
 5 tagcctgaaa ttaggggacc acatcttact tatctttata tctgcacagc gttggtgctg 5940
 gatataatgc atcactctgc ctggagcaca catcaacttg tctcctcagt ttctttcacc 6000
 10 ataggctggt gaaacagcca ggtctaacc ttcaactgtc tctgggaatc tctagtttg 6060
 gggtgattct ctgtactgtt ttaatgaaca tttttaaagt gtcocctagt ctccagaacct 6120
 tcatctatac aactggcata ataaagtacc taccatagga atcgatttat gagcaggcat 6180
 15 agcatattca ttcaataaac ggaagtttta ccataggcag aagtacccaa cggcctcgta 6240
 gcagtcgca gacactgatg atactgtcca ctgatgtgat atgtctogga aatgatgta 6300
 ctaaaatacc tcttcacaaa atatttgtct tccaatttat tgaatcagac tatcaagcac 6360
 20 cttacttggc cttaaactac aacatgattt ttggaacaat taatctttt ttaacccttc 6420
 attttaggaa cactcaagaa tggactcaag aatggaaga atgccctgat tatgtttctg 6480
 25 ctggggaaaa cagctgttac ttaattcat cgtttacctc catctggata ccttattgta 6540
 tcaagctaac tagcaatggt ggtacagtgg atgaaaagtg tttctctgtt gatgaaatag 6600
 gtaaatacaca ggtttttgtt tcatttgaca tagttttaga ctaaataaat ggggaagcct 6660
 30 gcaaggcca agtataatca agtaggaaga ctttgtaaca gtgttctata gatacatgga 6720
 gatctgtttt acaggagatg ggatcagctg gtgaacaaga ggaaaagggc agggggaact 6780
 35 taagttgact ttaacataaa gtagcctggc agtaaatggt gtgaagaaga gaataggaac 6840
 cttgtggagt cttttcctt aggatattct tgaagctgog ttgtgtttt atgttccact 6900
 gcaaaggtg aacttaatat attcttagga tttcttactt cctaattatt tgataggatc 6960
 40 cttatattca aattcactga aatacgttg ctttgacct ctaccattgc tgtaatcaa 7020
 gcctacattt tctttatcac aaagcataat cattctggaa ttttacattt acaaacagc 7080
 45 cacagttact ttaaagacat gtttattaga tctcagaaca aatactggag acaatcagct 7140
 cagtgaacta agtgaaagat ccaaacagag gatcctttgc ccatcatatg gacacaaggt 7200
 ggaacaaaa caaataaac aaacaattgt aattagaata gtcatgtta taccttaata 7260
 50 gtataaatag caaatagaa agaatacaag aaggactttg agtagctgaa attagtgcct 7320
 caaatctat ccacaaaagc tcatttggtg cttataggaa tttctcgttg cttctccaa 7380
 55 atgtattgtt ctttttatgt ggtttctag gcataagctg actggaagac ataggagtat 7440
 gtggctagaa cttacagata gaaacaaata aatctaata ggctgactt aaggagaag 7500
 attaagagaa ctgtatcaag cagtaaagat aaccaattg ctttgcaaag acaatttagt 7560
 60 atgtgtcta acatcagtg gtatagctgt tgagttgaaa ctaaatggga tagcagaatg 7620
 ggatagtagc aagaacactg ggttaaaccc catgttctag cctgttctc tgccaatagc 7680
 65 cagtcctact catttacctg gctgacatgc ctgtcatgtg tcacgcaactg ttctggtggt 7740

ES 2 652 018 T3

5 ggtgggtata gaataagtac aatacagtc aagaggggaag tcaggcatgt tcacaaataa 7800
 ttgcagtgca gcgtgatagg tgtagcctg gaaatacgtg gaatgcagag ctgcaaaggt 7860
 ggtggccaaa ggogtgaatg actgacaggc ctgagggatg aggaagggct gcacagagat 7920
 10 ggtgacagtt tagttacctc tgaactggaa ttggactctc cctatTTTTa aaaaagtgat 7980
 gaccacagtt ggtcaaaagc atgagtgagt attgtcaggt accacagtg accatgccttt 8040
 cagtaactac taagttccaa cagtaactta gtagttactt agtaattaca acagtaactt 8100
 15 agtagtccca acatgttcag ggactcagga gcagttagga agccctccta gtcagctgga 8160
 gaaatcatca gtagttgttt gtgccccaaa aaggaatttg gactttaact gtcacgaggt 8220
 acctttgagg atgtttaaat agggaaatta cttgaggata ctaatagtta acagtcacaa 8280
 20 aagtcttacc atgtgtcagg tataaaaacc atcttttgca atcacacttt acagataatg 8340
 aaaccgaggc acagagcagt taaaggacta gttcaagtca aacagctagt agatagagct 8400
 25 gggatttgaa cctccagcct ccatgctctt actcttgagg ctttgacagta ccacttctct 8460
 ctttattaat gtcagagaa attaactctg ttgcaatgtg aaacgtagat tggagtggga 8520
 cggactagag gtagaagagg ttaaaagact gagatgatca aggtaaaaga ttatgacagg 8580
 30 tagctacaac tagcacaata gttgtggggc aaggtgctga gagtgaaaga gaacaaagaa 8640
 ctaatgtaac cctggtagat cttgagaaag ttgtcaatca ttataagcct cagcttctct 8700
 35 ataaaatag tatgtatggt actacctcac agggctattc tttggatttg aagtactata 8760
 ttagttagac atttgtcatt cattcaattc attcagcaaa tatttattat gctcttctct 8820
 caggccagtc aatgttctcc atgctgggga tagaaactgt ctccctggg gggatttaat 8880
 40 cccaacgagg atggaaagcg acaatgctat ggagaaatat aggaaaggag aataggagtg 8940
 ttggagaggt tgcagtgttg agttttcagg attggcatcc ctgaggcagt ggcatttgaa 9000
 45 taaagaagga ttggagagga taattatgtg tgtgtctcag ggaagggcat ttcagcaagg 9060
 gggcacgcca gaagaaagat ctcaaagtag gagcatgctt ttcctcactc aatgaacagc 9120
 50 aggcggcggg tggagtgggc acagagtgag cgaggagact ggtatgagac caaatcgcac 9180
 agacaagaca gtcaaatcta cccaaccatt gccaaagact ttggctttca cttggagtga 9240
 ggtaggcagc ctttgagggg ttttagatga tgagcagatg gatctaacgt aagtgttagg 9300
 55 ataactactg tgtcagttcg cttgaggatt gcatggagaa tagactggag ggggacaaag 9360
 accaaagggg tacagtgggg agacaaatga agcaagaaga atgaaaagg ataatggcca 9420
 60 ggaccaggtt attagtgtg caggcgggtg gacatggttg gattctgtta tatcttgaaa 9480
 gtacagctga cggaatgtg attagtgagg aaaagatgag ccaaggacaa gttcattggt 9540
 65 tttatctga gcaactagag gaattgagtc ctcgtaaca gagatggaaa agaggaaagg 9600
 agagcaggtt ttggagagga agagcaaggg tttgtttggg gatataataa gtttcagata 9660

ES 2 652 018 T3

ttttttaaat atctcacagg agttgtcaat atagcatgta gatttatgta tagagataaa 9720
 5 ggagagggtca ttattatgcc tgtaatggta tctcacagga ggtcattggt atgcctgtaa 9780
 tgggtgtacc aaatcttttc caaaaggacc ttgtctcata tectctattt ttcaaatgca 9840
 gcataagtaa tgagttatag aaaatcttcc attaaaaaca attttatagt ttggtcactt 9900
 10 taaacgggta agctttgatt atcaggattc ctgaatctcc aacaaatcca gaagggtgag 9960
 gaattattgc cattatatcg gcatatgtag tttggccatt ttgcatatcc ttccaattta 10020
 attttcaaaa tgtagtcatg attcatcaaa ttttgactct ccctgttttt aaaaagggtgg 10080
 15 tgtcgacccc acagagggca acagcatgct cctccaccat aaggcctggt ttcaactgtg 10140
 gtgcacacaa gagcttccct ctttggccaa cagatttgac agccagtaag agctcctcac 10200
 20 tgtgtatata tgtaaagtta tctccagtca acgctagggg tgcacactct gcaacactct 10260
 aggtggcctt ctgtatata ggcaaaaaa gaaagtaa atttactctgt atctgcaagt 10320
 gattttcaaa accctcagta atgagatcca actagcaaaa atttaccagg aactctctag 10380
 25 aatataaatt tagacatagt tcttagcttt ggaatccata tttttcttca tcagcctctg 10440
 agaaattgtg gtctttgagg tctactaag cagaatgcaa caaattttcg tggaaactgta 10500
 30 gagtatatca atagaacctg aggaaaaaaa tgtttcaagt tgttcatgtg acagtcaaaa 10560
 agacagaaaa cactgaattg tcaccatttg tgagactagc ataatgcttt ctctctctt 10620
 atgtcagaag aaaatatcac atgtggctag gaagatcaca aagctagggg gcattagcag 10680
 35 agtgtgcagg aagattgtat gagaagattg aagaagagta aaaaaggata atggctagga 10740
 ccaggtata gtggtgcagg cggtgagata tggttggatt ctgttatatc ttgaaagtac 10800
 40 agctgacgga atctgacgga atatggatta gtgaggcaaa gatgagtctt tcagggaaaca 10860
 acacagaaat gaggtaaaaa gggctctctgc ccccaggcca tacatagttg caagaaaaaa 10920
 ggtttctcta cccctagttc cgaagcagcc ccatgtctaa attctgtaag tctttctgac 10980
 45 tctctgtttt ttcagtttca agtgaaaata aattcctttg ccaaaatcct gatgcattta 11040
 tgatatcaga gcaaaaaagaa atatacaaca tggcagatct tgtaaatagt gatcagatgt 11100
 tttactccaa aaggaatfff tgtaagggtc tatttagaag ttaaaaaaaa gtcctccttg 11160
 50 agttaaaaaa aaaagttact ctcttataaa gtgaaagtta taataagaaa aatattggaa 11220
 gaaataagag catgaatgat caaaaatgta gaaagtaatt tggctctctg agaagaatgc 11280
 55 ctccattaa tattaaattg tgtctgtctg tgtactaatg ctctgttgaa ttgcacagtg 11340
 caaccagatc caccatttgc cctcaactgg actttactga acgtcagttt aactgggatt 11400
 catgcagata tccaagtgag atgggaagca ccacgcaatg cagatattca gaaaggatgg 11460
 60 atggttctgg agtatgaact tcaatacaaa gaagtaaatg aaactaaatg gaaaatggta 11520
 agatgttgc acacettaca ctttgacttt tctttctatt tcaacaaact ctctctcatt 11580
 65 tatcattaga ctttctttg acctaatacc acatgttcat gctgtatgct ccataatttc 11640

ES 2 652 018 T3

ttaattgaga aaacattatt taaccggtaa aatattgtct tgaaattctg taagacagga 11700
 gatgcttatg tatatatgga ggctgtgga aggaaaggaa aactatttct ccattcattc 11760
 5 ttgctgtcca gtttaacttt agagcaaaat tatagactgg ccacttagct gtctttgggg 11820
 atgtggataa aaatgggaaa gtttgtgatc cagtcaacag tgactatggc caaatatfff 11880
 10 cccatgattt cagttgctgc tactcaaagg actcccacta aaacaaattc atacgtgtct 11940
 atagggaaac agagggaggg aatttgtctc ttagaggttt cagaaggatg ttttgttaca 12000
 15 tacctcagag aagaatcaag ctgagattct tatgtaggca attagagagc atggtaccag 12060
 ttgacctctg aatccctctc ttcttaacca agcatatgga actcagcatt ttgataaatt 12120
 tcacatggca cataacaaga ggaaaaacag gagtatcatg ctgctcccaa tataactaat 12180
 20 tctaaatctg tctaaccaca gccacagcca cagccacagc caagccaagc agtttctggc 12240
 cactcatcag gtgatgcca gcagcctggc acagatcact cccagaattt tgagacacca 12300
 25 ggacattcag tgagccactg aaaaagatgc caatfffgtc attagaggaa agttaagttt 12360
 ggaggaaatt tgagtagtta caatactggg ctttgaggct ctatfffctg aatcatttta 12420
 attagatat ctgttctgta acttggtaaa aataaaatgc ctgattggat gctaagtcaa 12480
 30 acaagactgt ctaaatccaa gctacaatca aacattatff aacaacaggt actgaaataa 12540
 ctactatgca gaaggcactg tgctaaatgc ctgaggtggc ggttctcaaa gtgggagcca 12600
 35 cagacccttg agggctcctg agaccctffc agggagttca gtactatfff cacaatacac 12660
 taaaatatta ttttattaac tatgttgaaa ttttaactta tggcacaaaa gcaatgctgg 12720
 40 aaacactgct ggcaccttag catgaagcaa ggcagtagga tcaaatttta ctaatagtca 12780
 tgcaactcca atgaagaagg aagaaaaagc cagtttcacg tttgaagttc ttgatgaagc 12840
 tgtaaaaaatt gttaatttta ctaaacctcg acctttgagt acatagctta ttaatattct 12900
 45 gtgtgacata tgggaattac acattaagca tgtctgctgc gtactgaggt attgtatttg 12960
 tcttgaagaa aagcgttaa atgactgagt tgccagctga actagttgct tttattgctt 13020
 50 ggagcaccat ttttacttgg aagagccatt gataaactgg cagatggtta ttcattttg 13080
 aattggcaaa catttgtcaa aaaagaatga ggcaagcttg tgccttcaag aaaaacaact 13140
 55 gacagtatff tttgcaatgg aaaaaattg actfffcaaa gcaattcatt ttgcctfff 13200
 cgaaaatttg tgtctccaac cgtgagcttg atagtgtfff aatatttgaa gactfffctt 13260
 gaagagattg atggtgatat taatgaaagt gactfffata ttatatttg taataaaatg 13320
 60 tatgaacatt tagaaaaatc tacaactcag ttaaccaata ttttccaaat tactaataca 13380
 tgatgtaatc aatcatgca tggggaaatg atccattcaa agtactagat agaatoctga 13440
 65 atffftttaa tgatcaaaaa tffftttgta tatttattgt gtacaacata tffftttgaa 13500
 atatggatac attgtagaat ggttctatca cactaagtaa catatgcatt accacacata 13560

cctttttttg tgtggtgaga acacttaaaa tctactcaga gattttcaaa atacaataca 13620
 taagcattaa ctatagtcac cattttgcac aatagatttc ttaaactcat tectactaac 13680
 5 tgaaaatttt aattctttca tcaatatctc cttaactctg caccctgccc acaaccctg 13740
 ataaccacca ttcaactctc tgcttctgag ttcaactttt ttagattctg catataagtg 13800
 agattatgtg gtatttgttt ttctgtctct ggatcatttt tottaatata atatctcca 13860
 10 ggttcatoca cattgtcaca agtgacagga tatccttctt tttttaaggc tgatagcatt 13920
 ccattgtata tacctaccac attttcttta tccacttato cattaatgga acataggtog 13980
 15 attctatttc ttggctgtta taagtaatga acatgggagc ccagatattc tggctcaaca 14040
 tactgatttc attttcttg gatataact tagtagtgga ataataaat ggatcacatg 14100
 gtagtctat ttttaactt ttgaggaagc ttcattat tttccataga gggataacta 14160
 20 atttacactc ccaccaatag tgtgcaaggg ttccctttg tccacattct caccaacact 14220
 tgttatctct tcttttttg aaaatagcca tectaacatc tttgtgact ctatgccttc 14280
 25 tgtgagctga tagctcattg tggtttaaat ttacatttcc ctgatgatta aagatgtcaa 14340
 gcatttttca tataoctggt gccatttct atatcttctt tttaaaaatt tatattcagg 14400
 30 tctttgccc attttttaaat tgggttattt tcttgttatt gaattgtttt agttcttat 14460
 atatttcaga tagtaacttc ttatcagatg tatgcaaata ttgtctcca ttccatagag 14520
 tgtcttttta ctctgttgat tgttctctg gcagtgcaga agctttttag tttcatgtaa 14580
 35 tcccgtttat ctatttccac ttttgttgc tgttcccaat ggagtcatat ccaaaaaatc 14640
 attgccc aaa ccaatgtcat ggagctttt cctatatattt cttccagtag ttgtacagtt 14700
 40 tcaggtttta catttaagtc tttaatgat tttgagtta tttttgtata tgaggtaaaa 14760
 taagggtata atttcattct tctgcatatg gatgtccaat tttccaaca acatttaaag 14820
 acagagtctt ttcttactg tgtattctta gcaccttgt gataaatcaa tttactgtaa 14880
 45 atgtgtggat ttatttccga acactttatt cttttacatt ggtttatgtc atttttatgc 14940
 cagtaccatg ctgttttgat gactatagct ttgtattatg ttttgaggtt ggtagagtga 15000
 50 tgatttcatc cttgttcttc ttgttcaaga ttgctttggc tattcatagt ctattgcagt 15060
 tgcatacaaa ttttagaatt gctttttcta tttctgtgaa aaatgacatt ggaattttga 15120
 taaggattgc attgaatctg tagattgctt taggtagcag ggacattoga acaatattaa 15180
 55 ttcttcta at ccatgaacat gggctatctg ttcatttatt tgtgttctc tcatgtttta 15240
 cagttttcag tgttcagatc tttcacctt ttgtttaa at ttatttctag gtcttttatt 15300
 60 ttatttttat ttttatagat attgtgaaag ggatttctt atttcttct cagattgttc 15360
 cttattagtg tatagaaatg ttactgattt ttgtatgtg actttgtatc ctgcagcttt 15420
 actgaatttg tttatctggt ctagcaattt tttgttgaag tctttaggtt tttctatata 15480
 65 taaaatcatg tcatctgtaa gcaaggacaa tttactttt tcttctcaa ttttgatgc 15540

cttttatttc tctcttttgc ttaattgctc tgactaggat tttgaatcga gtagaataga 15600
 5 gtagaggagt tacattgaat aaaaatggca agagtaggca tctttgtctt gttcctcacc 15660
 ttagaagaaa agctttccac atttcactgt ttattatgat gtgagtttgt tatatatgga 15720
 ctttattgtg ttgaaataca ttccttctat atctaattgt taagggtttt tatcatgaaa 15780
 10 ggatattgaa ttttgacaag tgcttcttct gtatctgttg agatgggtcc atggttttcg 15840
 tctcggttct gttaaagtga tgtattatgt ttatgtattt gtgtgtgatg aaccatcctt 15900
 15 gcatccctgg aataaatcct acttgatcat ggagaatgtt ccttttagtg tgcttttgag 15960
 ttagtttctt agtattttgt ttaagatttt tacatctgta tttatcagag atattagccc 16020
 ataattttct tttctttagt tgccttttca tggtttgggt ataagggtaa tgctagcacc 16080
 20 aagaaatagt ttggtagtat ccccttttct tccacttttt ggaaaagttt gagaaggatt 16140
 ggtgttccgg tgaagcttcc agtgaaactg tcaggtcctg gacttctctt tgatgacaga 16200
 25 ctttttatta ctgattcaat ctccttactt attattgggt tattagattt tctatttctt 16260
 caagaaagtc ttagtagggt gttgtgtgta ggaatttatt catttctcat gcatataatt 16320
 tttcagaatg gtctcttatg aacatttcta tttctatggt attggttcta atgtctctc 16380
 30 cttcatttct gattttgttt ttaatttggg ctttctcttt ttttattatt tagtctagct 16440
 aaagattggg tgattttggt tatcttttca aaaaaacttg tttcattaat cttttctact 16500
 35 gttttaatgt gctaactgaa aagcacatta aaaggatcat tctccatgat caagtaggat 16560
 ttatcccagg gatgcaagga tggttcatca cacgcaaata cataaacata atacatcaca 16620
 ttactagaac caaaaacaaa attatggaac catctcaata ttttctattc tctatttcat 16680
 40 ttatttctgt tctgatcttt attatttctt tccttctatg aactttatgc ttagtttatt 16740
 ctttttctgg tttcttcagg taaaatgta ggttattcat ttgagatctt tgttttctga 16800
 45 tggaggcatt tattgccatg aacttccatt gctcttagaa cgacttttac tgcattcctt 16860
 aaggtttgc atgttgttcc catttttgc tcaagatatt tttgatttta ttttttactt 16920
 50 ttttaactatt tttttagggt cagagataca tgtgcacggt tgttatatag gtaaattgca 16980
 tgtcacaggg gttaccata cagattattt catcaccagg taataagcat agtaccaga 17040
 aggtagtttt ttgatcttca ccttcttcc accctctacc ctccagtagg cccagtacc 17100
 55 tgtggttcca gtcttctgtt ccatgtgttc tcaatgttta gctcctacta ataagtgaga 17160
 atatgtggta tttgttttcc tgttcatgca ttagtgtgct tagcataatg gctccagct 17220
 60 ccatccatgt gactgcagag gacatgatct tgttctttt tacgcctgag cagtattcca 17280
 tgggtgtacat ataccacatt tcttttatcc agtgtaccat tttctttatt ccatgtcttt 17340
 gctattgtga atagtctat gatgaacaca cgcatgcatg tgtctttatg gtaaaatggg 17400
 65 ttatattcct tcaggtatat acccaataac gggactgctg ggtcaaatga caattctctt 17460

ES 2 652 018 T3

ttaagttcct tgagaagttg ctaaactgct tgccacaatg gctgaactaa tttgaattat 17520
 taccagcagg atataagtgt tcccttttct ttgcaacctc accagcatct gttatttttt 17580
 5 gactttttga taatagcctt tctgactgct gtgatgtagt atctcattat ggttttgata 17640
 tgcctttctc tctaattatt agtaatgttg agcatttttt cttacacttg ttggctcatg 17700
 tttgtgttct tttgaaaagt gtctgtttat gccttttctc cattttttta tgggactggt 17760
 10 tgtttttggc ttgttgattt aaagtctctt atagattctg gatattagac atttgtcaga 17820
 tgtatagttt gcaaatattt tcagccattc tgtagattat ctgttttttc agttgtttct 17880
 15 tttgctgtgc agaagctctt tggtttaatt agatcccatt tgtcaatttt tgtttttggt 17940
 gcaattgttt ttggcatctt tgtcatgaaa cctttgctaa ggcctatgtc cagaatggta 18000
 tttcctaggt tttcttctag ggtttttata gtttgggggt ttgcatttaa acctttaatc 18060
 20 catcttgagt tgatagtcgt acatgttgaa aggaaggggt ccagtttcaa tcttctgcat 18120
 ataactagcc agttaccag caccatttat taacagtgt tttcctcatt tctgtttttt 18180
 gtcaactttg tcaaatatta gttggttgca ggtatgaggo tttattttgg ggttctctgt 18240
 25 tctgttccat tgatctatgt gtcttctttt ttaaccagta ccatactggt ttgattctgt 18300
 tagccttgta gtataatttg aagtcaggta atgtgatgoc cctgggttta ttcttttag 18360
 30 ttaggattgc tttgactatt tgggctggtt tttgcttcca tatgaatttt acaattggtt 18420
 tttctaaatc tgtgaaaaat tacattgata atttgatagg cattgcattg aatgtgtaga 18480
 ttggcttggg cagtatggtc atcttaacga tattgattct tetaatccat aagcatggaa 18540
 35 tgtttttcca tttgcgttat ctgtcatttt ctttcatcag tgttttatag ttctacttat 18600
 aaagatattt cacctccttt gttaaatgta ttctaggtt tctgtgtgtg tgtgoggcta 18660
 taataggcta tgttaacctg ataacaattt aactttcttg cataaaaaac tctacacttt 18720
 40 tactccacat accgcccccc caaacacatt ttaaattttt gatgtcacac ttacatcttt 18780
 ttatattgca tattttctaa caaattattg tacctagtat tatttttaat aattttatct 18840
 45 tttaaccttc attctaaaat aaaagtgatt tgcatattac catgaaaata ttagacaggt 18900
 aatgtgatgc cctggggtt attcatttta gttaggattg ctttgccaat tgggctggtt 18960
 50 tttgcttcca tatgaatttt acaattggtt tttetaatc tctgaaaaat tacattgata 19020
 atttgatagg tattgcactg aatgtgtaga ttggcttggg cagtatggtc atcttaacaa 19080
 tattgattct tetaatccat aagcatggaa tgtttttcca tttgcgttat ctgtcatttt 19140
 55 ctttcatcag tgttttatag ttctacttat aaagatattt cacctccttt gttaaatgta 19200
 ttctaggtt tctgtgtgtg tgtgtggcta taataggcta ttttaacctg ataacaattt 19260
 aagtttcttg cataaaaaac tctacacttt tactccacat actccacaca cacacacgtt 19320
 60 ttaaattttc gatgtcacac ttacatcttt ttatattgca tattttctaa caaattattg 19380
 tacctagtat tatttttaat aattttgtct tttaaccttc attctaaaaa gtgatttgca 19440

65

ES 2 652 018 T3

tattaccctg aaaatattag actactttaa attggactgt gtacttactt ttactagtga 19500
 gttttatact ttcatatggt tttatgttac tcattagcct ccttttcttt cagctaaaga 19560
 5 cctcccttta gcagttcttg taagataggt ctgttggtga ggaatggta atttaaatat 19620
 aacaaagtac aaaaagttca tcagtagagt ttcaggtttc atttttccac taacctgtaa 19680
 10 gaatttatca tttgagtttt agtctattgt taaacagaaa tgttcacaat tatgtgaaaa 19740
 gtttattaaa atattcctca ttttctcat tatttatctg tgtgaggcca ggttttattc 19800
 atttacgaaa atagcacatt ctaatagatt taattcagaa gcagttataa aaatacagtc 19860
 15 atcttctctt aagtctgaca ttaaataaat ttgcaaaaat gtaaaacagt atcactcttc 19920
 tcactctctt ttttgttggt tgggaaagta caataatfff tatgaaaata tattatttaa 19980
 20 caaaatcaat ttattatfff cagtttaaaa ataaggattt taaaatfff tcatfctaat 20040
 ttctaatact gtaaatagtg ataggtataa cccaactaaa ccaaactctt taagattctc 20100
 aaatfcttaa gagtgtaaag gagtctgaa ataaaaagt taacaacct agaaaaaac 20160
 25 aaagatataa atcagcatgt tagcattcat caattcagtt accatcattt catccctaaa 20220
 agccatggca tatagttacg tctcactgag ccaccacttt gaaactcca cctgtgcca 20280
 30 ggtacttggt agcatgtaac tttgttaatc aactgttcag ggctatatcc caacatggct 20340
 ttgttgcact tttcgtggca cctctgctaa atctcgttag gtagaccaa ggggtcagtt 20400
 aactfcttct ttatacctt tattcatgat atttataagt ttggtaattt acaaaggctc 20460
 35 tggacaaaaga ccaggggctt atatataata atttatfctat ctcttgaaga aacaaacaat 20520
 ataattgggt atgaagcaca ggcgtcataa gcagaaaaca ggtttatagg taaaggggga 20580
 40 agacctagtg tgtgtcgtt gcacagga ttcattgtac catttgcaa tatgaatttg 20640
 cttagcagtg tcttfffctt tctccctccc acaggatctt gctctgtccc caggctagag 20700
 45 tacagtggcc caatctcggc tcaactgcaac ctccacctcc agagttcaag tgattctcgt 20760
 gctcagact cctgagtagc taggattaca ggcgcaagcc accacacca gctaatacag 20820
 ctaatfcttg tattfcttagt agagacaggg tttcatcatg ttggccagac tggctctgaa 20880
 50 ctctgacct caggtcatct gccaacctcg gctcccaaaa gtgctgggat tataggcatg 20940
 agccactgtg cctggctgcc cttfcttagta aatacatttt gcacgacct gtggttggtt 21000
 55 acagctattt atctagcaaa ccaataactt acagctfctt aaagcttaa tgaatagcat 21060
 ggaattattc atgatatctg tgccatatct tgaggacca ctgtatacct gatattgcac 21120
 60 tggactfctg aaatgaaaa taatgagtga tcttggggaa tttacaatgt aacatagaaa 21180
 ggtgtgtatc actaaattg cacaatgaaa cataattaat aatagaagaa gtatattatc 21240
 tggcagaata gagtgggaa aagtaccagc aaagacttag aataccagct ctctcaata 21300
 65 cttgcaacta gacttggtg agaaacagtt ccccgcacag gcagatgaca gggttaggta 21360

ES 2 652 018 T3

5 tgataggagc cacgtaagta ggagccactc gaaatctgag tttgggtgtgg ctggtgtgga 21420
 gggttgaggg aatatgaaga gaggaccaca acttgaatca ctgagggccc ttttttgatc 21480
 10 ctattagtga aatctttaa gaaattgtat tggtgacaat aacagagaaa taagggcttt 21540
 gaggatgaaa acataggctt taaaaaaaaa cttaagaaaa aaataataaa gtaagttcag 21600
 15 tattcagtgt cctgccttaa agaaagcatt ttaggcattgc aaatatccca tatattcaga 21660
 ggcttctata aaaaatacaa acaaaccttg tcatatacac atgaggcaaa aaaagatact 21720
 20 ttgtgagtag aaactattga ggtaaaagaa aaacttgttt tagaagctga aggccagct 21780
 gctgacttaa taaaacaaat tatgagaatt ttgtttatgc gaaaatccat gctgttgaaa 21840
 25 acgcgagtgt ttaaagtttt ctataaacag gaacaagggtg ttctaccaa aaaaagtatg 21900
 aaaagcacat tgaatacctg ctttgagtat ttgacttga ggaaactacc atcactagtt 21960
 30 gagtatacct ctttgatagc aatatgtgtt aaaagtctaa cagtctcact ctaccctcc 22020
 ccgagaaggt aaaggaatat cctgacctta agggttgta gacctagatg tttcttacca 22080
 35 aagaactccg gtgacttttc tttgcagatt ttaaatagca aactatttta tgggtggcttt 22140
 aagccttcca gagcaagcag attaggtatg tagttccttt taataaaagt atttggaggt 22200
 40 tcaataaagg caattatgat ttttctagga ccttttccaa ttctgtgatt atgtgaatga 22260
 ctaccoggaa tttccatcaa aactgatata acaacttgct atggctacaa tttattttgg 22320
 45 tgtgaaaaca tgtttgcttt tctgttctta tgtctcctt catacaaaag tataatatcc 22380
 cagatatgta ggcatatagt tctgccattc agagtaattc taatatactt taatcttatt 22440
 50 aactatctgg aagactaatg cacagttata gctgcatttc ttaagcaag tctatcatat 22500
 ctttgggttt ataccaaact aaatttgtga actattatcc atttacaaaa tgattattta 22560
 55 catcaatctt cctttaaata acaaatgctc acaatgcatt ttaaaatatt acctacttta 22620
 taaaaatcca ttctgaataa aaatgggaga atacctgtag tgttcattgc attgagttgt 22680
 60 tgactctttg gccaatatgc gtttatatth tgtcttgaaa gatggacct atattgacaa 22740
 catcagttcc agtgtactca ttgaaagtgg ataaggaata tgaagtgcgt gtgagatcca 22800
 65 aacaacgaaa ctctggaaat tatggcgagt tcagtgaggt gctctatgta acacttctc 22860
 agatgagcca atttacetgt gaagaaggta aaagaaataa aagattaaaa tagtagctaa 22920
 70 cctggctttt gtcaatataa cagttgattc acccctgcac tggtagtgtg ttgtccaaat 22980
 caaaatatat taacatcaga tatcaggatg agagacctg agctcactat ctgtaacaga 23040
 75 tattgttcat tgcaaaagca gaaggaagat ttagtttcca aatthttcat tcaggagaag 23100
 tcoggggggc aggtggaagt ttagagacag gaatttgggtg gcaatctcca gatggtagaa 23160
 80 ttcagatgat tcttttcttt atatathttt atathttctga aatthttctat agtaagtttg 23220
 ttttgaatth ataactcagga aaaaaagctg tactgatgggt tagggaagaa agtatgtatc 23280
 85 tatatggatg gatagatagt tggcatctaa gaggaaacct aatattgagt cagcataggt 23340

ES 2 652 018 T3

agtcaacagc agatgcatac ggtttttagaa agcggagggtg tggetttttac ctagaggaat 23400
 gcctaataag tagtgtggca gtcatactta aaggagacgt ggaacatttg aaaaccctat 23460
 5 gtagggagaat cacaacaatg attaaagttt ttaaaaatgg gacctatgaa tttagaataa 23520
 aagaattaaa acttttagat acagaaataa agaaaactga ttaataatga gcagaaagta 23580
 10 tagagtatta ttattctcaa atgggaaatg gctctattcc atcttcattg aaaacagaag 23640
 tttacagggc tatatgtttg ttaatgaaac aaccacaagc tacatagaaa ataaatttat 23700
 atttctgtat ttactataca ggtagaatct catgatacta aatagcatta ggatgaaaat 23760
 15 ttctatagca ccattttctc tatactctag ttaactgaat tcttgtttcc aaactatttg 23820
 atattatgca attctggcct taaaagtaca atagctatac acccttaagc ttagtgtagt 23880
 20 ggcatttaat tcacttaaca tatatatata tatttttttt tttttttttt tttttttttt 23940
 tttttgagac ggagtctcgc tctgtcgcgc aggctggagt gcagtggcgg gatctcggct 24000
 cactgcaagc tccgcctccc gggttcacgc cattctcctg cctcagcctc ccaagtagct 24060
 25 gggactacag gcgcccgcc aacgcccgg ctaatttttt gtatttttag tagagacggg 24120
 gtttcaccgt tttagccagg atgggtctga tctcctgacc tcgtgatccg cccgcctcgg 24180
 30 cctcccaaag tgctgggatt acaggcaaca tatatttttt aaactgcctt ttccttctgt 24240
 tactaacaaa aaagaagctc taactttatg ttattttcct gaatatgtca ttgatatgaa 24300
 35 attatagaca ctacaagaca aaaaatgatt ttttctcccc caccaattct ttaaaatgct 24360
 tataatatct ccctagggga ttttaataac tttttaata agaaaagact atttcagcat 24420
 aaagacctac attttaaatg gcaatgttaa ggtaaatttc atctgtcatt tttataaaaa 24480
 40 agtgggttagc ctctgcctct gtggtaagaa tactgggtac caactgcaaa gtagctggca 24540
 ggtactcaat ctttaaggaat gaaatagaag ttttacaac aggttcccc aagtctcata 24600
 45 caaagtatac taaaacctga agatgggagc ctcagtagtg atctttctgt caattttatg 24660
 tatataatat acatgagata tatttattat attttaataa ttttaattat tgatataaat 24720
 acgtattttt atagctgtaa aatataatgtt atttgtgtct aagaagtttc tgtcatgatt 24780
 50 tatcaataaa aactctgcct tcatcttttt gataaatctt caatctggaa actaagaaaa 24840
 tcaccacact taaaaaaaaa tagaaaagaa accgagtggg cattatttag gtagtgtggt 24900
 55 aataagcaac acttttttac tgaagctgaa acctttatga tactccctgg acacatagta 24960
 tgcttaaaagc agattgtttg ttttcataaa acacacattg attttgaact atatgctggt 25020
 tctttatttt gaagtttttt tttaatgtga ggagatttga aaagtggaca gagatgttca 25080
 60 taaaacagaa aaaaactaag tcgttgcatt ctgtttcagt ggttatcaag agaaatcact 25140
 gactttatta gatgaataca aattatgaat tttttgtgaa aagggaagg gaaatgtaa 25200
 65 ctgtgcttca actattogta attctgaaaa cgaaatattc ttgtgtgttt cagatttcta 25260

ES 2 652 018 T3

ctttccatgg ctcttaatta ttatctttgg aatatttggg ctaacagtga tgctatttgt 25320
 attcttattt tetaaacagc aaaggtaggt gtggagtagt attctttggt attttgtacc 25380
 5 agttgttttag atttccatat gtgtttctat ttgttatttg atattttctt tgtcaaatta 25440
 tgagtggaaa ttttagttaa cctagtacac ttttatctcc agttatatat ttaccattca 25500
 10 tataaaaactc aatttgttgt atttatctta gacaatttag aggttttagat tctatctgga 25560
 gacttgtaca ggacattaag aggcttaggc tggtgactat gcataccttg tgatatgtac 25620
 ctctttatcc aagagctagc tctttccctc aagtccctca caagttgacc cattcattcc 25680
 15 aggacttcaa agtatcactg agcctttggc tgagtctgat acagtcctta tatacagaca 25740
 atttttttt ttcttgaga cgggtgctta ctctgttgcc caggctggag tgcaatggcg 25800
 20 caatcttggc tcactgcaac cgcgcctccc caggttcaag caattctcct gcctcagcct 25860
 ccagagtagc tgggattaca ggcattgccc accaagccca gctaattttg tattttttaga 25920
 25 tacagtttca ccatgttggc cagactggc tcgaactcct gacctcaggt gatctgccc 25980
 cctcagcctc ccaaagcgcg gggattacag gcgtgagcta ccgcgcctgg ccccatttaa 26040
 ggtattttta aagtcccaat ggttaatctt gttgcttctc ctagaattaa ggtgactaac 26100
 30 actcccaggt tgccatagaac tctcctgggt ttttagcaatg caagtcoggt gtgccaggaa 26160
 atccctcagt tccaggtaac caagacaggt gatccctta cctagaattg aaaatacgtt 26220
 ctccagctga agccaagagg catctataaa tcaaaatgag atctatgtta atatatttta 26280
 35 aaagatttta ctttgttttg taaggtagta tagcacttgt aaacttcaa acagaatttt 26340
 gttaggaaga agaattattg ggacgctaga tttctatagt gtcaagcatg ctaaaagtct 26400
 40 aactgaatgc agaaaggggt attttcagta gagcttcatg tccaatttta taatataaac 26460
 caattggaaa gtaaaattca ttctgaattc cattttgcac ctaactttct ggcaacattc 26520
 ctgttttcca aaaaagcagc tatcataaat cacaacacaa ttttctattg tttcaggaaa 26580
 45 ataaataaat atatttttag aattttaatt tgtgtattta agtaatgcca acaacaaaaa 26640
 agccaaatta ttctgttgat taatttcagt ttattaatct atatatttg tgggaaaatt 26700
 50 tatacataac ttcagtagat aaactcacga ggtatgtaaa gtaattagct cttagtatta 26760
 gctgtgaatt tctagccatt gtgaaggcca agtcaatttg ttatgttgtt tagttatatt 26820
 agttaacaat attaggaaga aaaaattatc ctctcaaaaa ataggatttc caagaaaaca 26880
 55 tattacttct aatacagtgc tttttataaa taatgaaatg cttaactata atgttttagtc 26940
 aaaatcacca aattctacaa ttgatttgaa atctttattg ttctcccaa tttcctgcac 27000
 60 taaattgaat tttctgtagg aaagaattaa ctttattttt atttgccat taaaacgcct 27060
 tatcattgtc taaatttgca tgttctactg aaagtgggaa atagtagcaa atatttgtca 27120
 gcaagtatgg acagaacatg tagttccaac aattaaattg atactgcaa gaacgagatt 27180
 65 tttcctagaa ctgtagggct gtaaagtggc gtcaggtcct acatgcctt gaaattttct 27240

ES 2 652 018 T3

5 gagtccacaa ttcattatcc aaccacttc acctgcttt aatccagtta attgagtcaa 27300
 ctctagcaaa atttataatt ttatttgtat ctgatacaaa accacaaaca tagtttcaag 27360
 tcaggctatt attatactgg ttectaccac acaaccctcc cagccttga gctgttacca 27420
 attgaggaaa gaaataactg aatcagccta aatagaatt tccaaaccag tagcgaaatt 27480
 10 cagcctacag attcatattt tgttatttta ttttaattag ttttgatttc agagtgaaga 27540
 ttttctaca aagtgtttgt aaaatagaga attttcacac aaaaatccag atttggggat 27600
 tatcttttaa aaaatgaaag atgtagtgaa actaaacaag gcagcatatg ctgcagcaga 27660
 15 caaccagcta tctatattgg gattggctca cattctttaa tttgccacca tctcattcc 27720
 tectaatagac tttgcaactg gcttgcttta ttectctgca tgacctgctt gggcctctta 27780
 20 gatttatgct ctgccactgt ggcataaggt cactacaacc actagaaaac cactagcgca 27840
 tgctgaatg catcatccta tttaaaagg aaaagcacac gtcacaaagt caaacatcag 27900
 ccatttgaa accttgctt cctgtaatta gaattatggt ccatcttttt atgtttttgg 27960
 25 gaattgaaa taccaatttc gagatgcaga atcaaaaaa aaaaacaaa cagcgaaaca 28020
 gcagcatgac acaagaacc tgggttttga tttggagtca ggttctctgg gtttgagccc 28080
 30 caactgtgcc aactatgaat gcatgatttg aacatgttgc ttaattttcc aagtttttgc 28140
 acagatatat catctgcctc cctgggagtc ataaggatta agtgaaatgt ttagtgcagg 28200
 35 ggtcacaaac ttatttcata gagttagagt acatttttag gcttttcaag ccatacagtc 28260
 tctatcacag ctactcaact ctgccactgt agcacgaaag tggccataaa caaaatggaa 28320
 atgaatgaag atgcttgtgt tctcataaaa ttttatctac acaaacatgt gacaggccag 28380
 40 atttgccca cagacctta tttagtgaac catagttag tgcaaagtat atcccacagt 28440
 gtctgattta tcagaagcac taaaaaatga tagtagttat tattaataat ttgtattact 28500
 45 tatttctata tctgtaattc atcagtaaca atatgcttta acatttgccc cactgagtag 28560
 tagaggctac ttaatgcaat ttataaaatg gatttttgc tattacttgg attaggtaaa 28620
 atagcaagtg gaaatactga gaaaatgtac tcttatgga atggactgga ctgaccattc 28680
 50 aactgagtg gaatagtaac tgatatcaa aaatctggtt accacctctt catgacagtg 28740
 tcatctctga atagtcagga gttttttaa aaattaaatg aattgtttgg aataatctct 28800
 55 gagccttttt ccagtctat aatttgattt taaaaataa actccaggcc agatacaatg 28860
 gcttatagca tataaatcca gcactttggg aggatggggc gggagtattg cctgaggcc 28920
 aggagtcca gacagctogg gcaatgacta gagcaagact ccattacaaa aaatgaaaca 28980
 60 acaaaaatta gcacacctg tagtctagc tacttaggag gctgaggcaa gaatatcgt 29040
 tggcccagga gtttgaggct gcagtgaatt atgattgcac cactggactc cagtgtgggc 29100
 65 aatgaagtaa gacctgtct caaaaagttt taaaaaaat taaaacacc ataaattcca 29160

ES 2 652 018 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

```

attacactat taattgtaca aaatagatac atgatttatt catttttatg accaaaaaat 29220
aatttaaaga tttggaacaa aaaatgtaa tgcacocctag aattgtatat ataaacccat 29280
actgattagt tagagatagt taaaatttaa tctgtcccat ctgaaatgaa ccctgtagta 29340
aaaccctggt taataagatc atccttagata atttcataat taatatgaac tatatggcta 29400
acctacccaa gtctaccctt tttcaagggt gtaagtaatc ttggctccat gtggattgac 29460
tctttttct tcttttctg tacaaattac tgatgagatg tacactagaa ttgccttata 29520
gctgaaatgg aaatcagctt tagatgaaat taaatttctt tctttcaaat actaaatctg 29580
gctgaaaata aaaagcatta agaaaaaac aattgtggga aaaccacatt ttcttttaat 29640
agacttcaga tgaggctttt tgggtttttt agttgttctt ttttttctt ctacagtttt 29700
tctttctcat ttactgtcta atattttctt ctgtttctca cactccaatt atataaagta 29760
ccagaatatt tggaaaaagt aatagtattg ccaatattt atttctatct tttgctataa 29820
ttgagaatat gtgactttta agatgtcaaa accaaaattt tatatgtttt caaggattaa 29880
aatgctgatt ctgccccag ttccagttcc aaagattaaa ggaatcgatc cagatctcct 29940
caaggtaact aataatttta tctaaattgt agctagtact aattaacacc tgaagactcc 30000
tgtcatatgt tgaaggtttt ctgtaagcta tatatatcac attcaatttt cttgtatctc 30060
ttctcctaga gaaaattttt ttaaatttc tatttcttaa aaataagaaa acgtcatatg 30120
tatttaaaaa gttacacact aatttatggt tttttatat gttttgttac tgttgttctt 30180
attgtaacca taattaatct ctgaacatta tttgctaatt catttaatta ttatgagttt 30240
cttttcatag atcttcattt tctttctatt ttctaggaag gaaaattaga ggaggtgac 30300
acaatcttag ccattcatga tagctataaa ccgaattcc acagtgatga ctcttgggtt 30360
gaatttattg agctagatat tgatgagcca gatgaaaaga ctgaggaatc agacacagac 30420
agacttctaa gcagtgacca tgagaaatca catagtaacc taggggtgaa ggatggcgac 30480
tctggacgta ccagctgttg tgaacctgac attctggaga ctgatttcaa tgccaatgac 30540
atacatgagg gtacctcaga ggttgctcag ccacagaggt taaaagggga agcagatctc 30600
ttatgccttg accagaagaa tcaaaataac tcaccttacc atgatgcttg cctgctact 30660
cagcagccca gtgttatcca agcagagaaa acaaaaccac aaccacttcc tactgaagga 30720
gctgagtcaa ctaccaagc tgccatatt cagetaagca atccaagttc actgtcaaac 30780
atcgactttt atgcccagggt gagcgacatt acaccagcag gtagtgtggt ctttccccg 30840
ggccaaaaga ataaggcagg gatgtcccaa tgtgacatgc acccggaat ggtctcactc 30900
tgccaagaaa acttcttat ggacaatgcc tacttctgtg aggcagatgc caaaaagtgc 30960
atcctgtgg ctctcact caaggtttaa tcacacatac agccaagctt aaaccaagag 31020
gacatttaca tcaccacaga aagccttacc actgctgctg ggaggcctgg gacaggagaa 31080
catgttcag gttctgagat gcctgtccca gactatacct ccattcatat agtacagtcc 31140
  
```

ES 2 652 018 T3

ccacagggcc tcatactcaa tgcgactgcc ttgcccttgc ctgacaaaaga gtttctctca 31200
 5 tcattgtggct atgtgagcac agaccaactg aacaaaatca tgccttagcc tttctttggg 31260
 ttcccaagag ctacgtatct aatagcaaag aattgactgg ggcaataacg ttttaagccaa 31320
 aacaatgttt aaaccttttt tgggggagtg acaggatggg gtatggattc taaaatgcct 31380
 10 tttcccaaaa tgttgaaata tgatgttaa aaaataagaa gaatgctta tcagatagat 31440
 attcctattg tgcaatgtaa atatttttaa gaattgtgtc agactgttta gttagcagtga 31500
 15 ttgtcttaat attgtgggtg ttaatttttg atactaagca ttgaatggct atgtttttta 31560
 tgtatagtaa atcacgcttt ttgaaaaagc gaaaaaatca ggtggctttt ggggttcagg 31620
 aaaattgaat gcaaaccata gcacaggcta attttttgtt gtttcttaa taagaaactt 31680
 20 ttttatttaa aaaactaaaa actagagggtg agaaatttaa actataagca agaaggcaaa 31740
 aatagtttg atatgtaaaa catttatttt gacataaagt tgataaagat atttttaata 31800
 25 atttagactt caagcatggc tattttatat taccctacac actgtgtact gcagttggta 31860
 tgacccctct aaggagtgtg gcaactacag tctaaagctg gtttaatgtt ttggccaatg 31920
 cacctaaaga aaaacaaact cgttttttac aaagcccttt tatacctccc cagactcctt 31980
 30 caacaattct aaaatgattg tagtaatctg cattattgga atataattgt tttatctgaa 32040
 tttttaaaca agtatttgtt aatttagaaa actttaagc gtttgacag atcaacttac 32100
 35 caggcaccaa aagaagtaa agcaaaaaag aaaaccttc ttcaccaa attggttgat 32160
 gccaaaaaaa aatacatgct aagagaagta gaaatcatag ctgggtcaca ctgaccaaga 32220
 tacttaagtg ctgcaattgc acgaggagtg agttttttag tgcgtgcaga tgggtgagaga 32280
 40 taagatctat agcctctgca gcggaatctg ttcacacca acttggtttt gctacataat 32340
 tatccaggaa gggataaagg tacaagaagc attttgtaag ttgaagcaa tcgaatgaaa 32400
 45 ttaactgggt aatgaaacaa agagttcaag aaataagttt ttgtttcaca gcctataacc 32460
 agacacatac tcatttttca tgataatgaa cagaacatag acagaagaaa caaggttttc 32520
 agtccccaca gataactgaa aattatttaa acogctaaaa gaaactttct ttctcactaa 32580
 50 atcttttata ggatttattt aaaatagcaa aagaagaagt ttcattcattt tttacttct 32640
 ctctgagtgg actggcctca aagcaagcat tcagaagaaa aagaagcaac ctgagtaatt 32700
 55 tagaaatcat tttgcaatcc cttaatatcc taaacatcat tcatttttgt tgttggtgtt 32760
 gttgagacag agtctcgctc tgtcgccagg ctagagtgca gtggcgcgat cttgactcac 32820
 tgcaatctcc acctcccaca ggttcaggcg attccogtgc ctcagcctcc tgagtagctg 32880
 60 ggactacagg cagcaccac catgccaggc taattttttt gtatttttagc agagacgggg 32940
 tttcaccatg ttggccagga tggctctgat ctctgacct cgtgatccac ccgactcggc 33000
 65 ctcccaaagt gctgggatta caggtgtaag ccaccatgcc cagccctaaa catcattctt 33060

ES 2 652 018 T3

gagagcattg ggatatctcc tgaaaagggt tatgaaaaag aagaatctca tctcagtga 33120
 gaatacttct ctttttttaa aaaagcttaa aactttgaag ttagctttaa cttaaatagt 33180
 5 atttcccatt tatcgcagac ctttttagg aagcaagctt aatggctgat aattttaaat 33240
 tctctctctt gcaggaagga ctatgaaaag ctagaattga gtgtttaaag ttcaacatgt 33300
 10 tatttghtaat agatgtttga tagattttct gctactttgc tgctatgggt ttctccaaga 33360
 gctacataat ttagtttcat ataaagtatc atcagtgtag aacctaattc aattcaaagc 33420
 15 tgtgtgtttg gaagactatc ttactatttc acaacagcct gacaacattt ctatagccaa 33480
 aaatagctaa atacctcaat cagtctcaga atgtcatttt ggtactttgg tggccacata 33540
 agccattatt cactagtatg actagttgtg totggcagtt tatatttaac tctctttatg 33600
 20 tctgtggatt ttttcttca aagtttaata aatttatttt cttggattcc tgatagtgtg 33660
 cttctgttat caaacaccaa cataaaaatg atctaaacca ctctgtatac tgtgaattat 33720
 25 cattgtaagg agagcttagc accactggat caaatacatc agcattgggt atggagattt 33780
 ttatgtgctg agatatagag agggaaacat atcccccttc ccttattttt tgagaagaca 33840
 30 aaagcccaac tcagaaatat cccactggct tggccctccc cttaggctgt gactccccat 33900
 aggcaaaggt tcatagagct gtgtatttga tgcatcatgg aaaataaatg acatgggtgt 33960
 tggatgaggg agagtgatat gtgagcatta tctttacatt tccagcttga gcatgttgtc 34020
 35 tggaaaggaag gaaagcagct cttctctctgc cattcaccca ttggcctaag tcagtttatt 34080
 ggactagctg cttgttate 34099

<210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

50 <400> 19
 tcaggcatt cttccattc 20

<210> 20
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

60 <400> 20
 cataatcagg gcattcttc 20

<210> 21
 65 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 21
 cctttaatct ttggaactgg 20

 10 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 22
 tcatcaatat cttagctcaat 20

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

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 23
 30 cttagaagtc tgtctgtgc 20

 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 40 <400> 24
 cctgctggtg taatgctgct 20

 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 50 <400> 25
 atgtaaagt cctcttggt 20

 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 60 <400> 26
 tggatgata aatgctctct 20

 <210> 27
 65 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 27
 ttctgtggtg atgtaaagt 20

 10 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 28
 aggctttctg tggatgta 20
 20
 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 29
 30 tggaaggct ttctgtggtg 20

 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 40 <400> 30
 agttgtctg tgctcacata 20

 <210> 31
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 50 <400> 31
 tgttcagttg gtctgtgctc 20

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

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 60 <400> 32
 gcatgatttt gttcagttgg 20

 <210> 33
 65 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 33
 tataaaaggg ctttgtaaaa 20

 10 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 34
 catagcagca aagtagcaga 20
 20
 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 35
 30 gctatmttg gctatagaaa 20

 <210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 40 <400> 36
 gattgagga tttagctatt 20
 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 50 <400> 37
 gatccatacc tgtaggacct 20

 <210> 38
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 60
 <400> 38
 ccagagatcc atacctgtag 20

 <210> 39
 65 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 39
 tgctaaggat agctgctgtg 20

 10 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 40
 ttgtcttag gcctggatta 20
 20
 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 41
 30 ttagaagaat ttgtcttag 20

 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 42
 40 ggaatttag gtccttaga 20

 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 43
 50 gctgatggg tcctagggtc 20

 <210> 44
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 60
 <400> 44
 taacagctgt tttcccagc 20

 <210> 45
 65 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 45
 ttcatccac tgtaccacca 20

 10 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 46
 ttgactatt tcatcaacag 20
 20
 <210> 47
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 47
 30 ggtggatct ggtgcacta 20

 <210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 40 <400> 48
 attgctggt gctcccatc 20

 <210> 49
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 50
 <400> 49
 taggtccat catttccat 20

 <210> 50
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 50
 caatgagtac actggaactg 20
 65 <210> 51

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

5 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 51
 aactcgccat aattccaga 20

10 <210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 52
 20 agcccaaata ttcaaagat 20
 <210> 53
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 53
 30 tcagcatttt aatccttgc 20

<210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

40 <400> 54
 atttccttc cttgaggaga 20

<210> 55
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

50 <400> 55
 agattgtgt cacctcctct 20

<210> 56
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 60 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 56
 aaccaagag tcatcactgt 20

65 <210> 57

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

5 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 57
 ctggctcatc aatatctagc 20

10 <210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 58
 tgtgtctgat tcctcagtct 20

20 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 59
 tatgtcattg gcattgaat 20

30 <210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 60
 aaggcataag agatctgctt 20

40 <210> 61
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 61
 actcagctcc ttcagtagga 20

50 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 62
 ggacatccct gccttattct 20

60 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 62
 ggacatccct gccttattct 20

65

<210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 63
 ggcattgtcc ataaggaagt 20
 10
 <210> 64
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 64
 20 acttttggc atctgcctca 20

 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 30 <400> 65
 gatgcacttt ttggcatctg 20

 <210> 66
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 40
 <400> 66
 cagtcgcatt gagtatgagg 20

 <210> 67
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 67
 ctctttgtca ggcaaggga 20

 55 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 68
 gtgctcacat agccacatga 20

 65 <210> 69

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

5 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 69
 aagaaaggct aaggcatgat 20

10 <210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 70
 aaatacgtag ctctgggaa 20

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

25 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 71
 caatcactgc tactaaacag 20

30 <210> 72
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 72
 aaacatagcc attcaatgct 20

40 <210> 73
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 73
 gtgctatggt ttgcattcaa 20

50 <210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 74
 gttttacata tccaaactat 20

60 <210> 75

65

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

5 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 75
 catcaaccaa gatttggtga 20

10 <210> 76
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 76
 gaggtatag atcttatctc 20

20 <210> 77
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 77
 tagtgagaaa gaaagtttct 20

30 <210> 78
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 78
 aatgctctca agaagatgt 20

40 <210> 79
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 79
 aactcaatt ctgactttc 20

50 <210> 80
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 80
 catctattac aaataacatg 20

60 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 80
 catctattac aaataacatg 20

65

<210> 81
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 81
 10 ctcttgaga aaacatagc 20

 <210> 82
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 82
 20 tctacactga tgatactta 20

 <210> 83
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 30
 <400> 83
 cacagcttg aattgaatta 20

 <210> 84
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 40
 <400> 84
 agtcttcaa acacacagct 20

 <210> 85
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 50
 <400> 85
 aggctgtgt gaaatagtaa 20
 55
 <210> 86
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 86
 65 atagaaatgt tgcaggctg 20

<210> 87
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 10 <400> 87
 ccaaaatgac attctgagac 20

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

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 20
 <400> 88
 ataatggctt atgtggccac 20

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

 <220>
 30 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 89
 agttatgta ccctgattga 20

 35 <210> 90
 <211> 20
 <212> ADN

 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 90
 45 ttgagtgttc ctaaaatgaa 20

 <210> 91
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 55 <400> 91
 atggaggctg gaggtcaaa 20

 <210> 92
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 65

<400> 92
taggggccat cttcaagac 20

5 <210> 93
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 93
tctccagata gaatctaac 20

15 <210> 94
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 94
tccaaatatt ctggacttt 20

25 <210> 95
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 95
tattagttac cttgaggaga 20

35 <210> 96
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 96
atttccttc ctagaaaata 20

45 <210> 97
<211> 1170
<212> ADN
50 <213> M. musculus

<220>
<400> 97

55

60

65

ES 2 652 018 T3

gagcaaggac tgtggaagct gctgctgctg tctgaagcga gctcctgggtt ggggtgtgatg 60
 gcctgagggga ctccggagggg tgggttgatga agcacgcgac ccccgagcgg ctctgccttt 120
 5 gcgcagctctg tgcaggctgc agctgcaagc tgggaagcaga ggagctggag tcagagtcac 180
 cgacgccaga gcctccatga actgggggtct caggtatgga tctttgtcag gtcttcttaa 240
 10 ccttggcact ggcagtcacc agcagcacat tttctggaag tgaggctaca ccagctactc 300
 ttggcaaagc ttccccagtt ctgcaaagaa tcaatccaag cctggggaca agttcttctg 360
 15 gaaagcctcg attcaccaag tgtcgttccc ctgaaactgga gacattttca tgctactgga 420
 cagaaggaga taatcctgat ttaaagacc caggatctat tcagctgtac tatgctaaaa 480
 gggaaagcca acgacaagct gcaagaattg ctcatgaatg gaccagggaa tggaaagaat 540
 20 gccctgatta tgtctctgct ggaaaaaaca gctgttactt caactcatca tatacctcca 600
 tttggatacc ctactgcctc aagctaacta caaatgggta tttgctggac caaaaatggt 660
 25 tcactgttga cgaaatagtg caacctgatc caccattgg cctcaactgg actttactaa 720
 acattagttt gaccgggatt cgtggagaca tccaagtgag ttggcaacca ccacccaatg 780
 30 cagatgttct gaagggatgg ataattctgg agtatgaaat tcagtacaaa gaagtaaagt 840
 aatcaaaatg gaaagtgatg ggccctatat ggttaacata ctgtccagtg tactcattga 900
 35 gaatggataa agaacatgaa gtgcgggtga gatccagaca acggagcttt gaaaagtaca 960
 gcgagttcag cgaagtctc cgtgtaatat ttctcagac gaacatattg gaagcatgtg 1020
 aagaaggaac caagtccaat tctcagcacc cacatcaaga gattgacaac cacctgtatc 1080
 40 accagcttca gaggatccgc catccttagc cttgtgggca cctgcattca tatgcacata 1140
 catgcatag cataattcaa aataataaaa 1170

45 <210> 98
 <211> 3976
 <212> ADN
 <213> M. musculus

50 <220>
 <221> incierto
 <222> 2438
 <223> desconocido

55 <221> incierto
 <222> 2468
 <223> desconocido

60 <221> incierto
 <222> 2561
 <223> desconocido

65 <221> incierto
 <222> 2591

ES 2 652 018 T3

<223> desconocido

<221> incierto
<222> 3128
5 <223> desconocido

<221> incierto
<222> 3154
10 <223> desconocido

<221> incierto
<222> 3305
<223> desconocido

15 <221> incierto
<222> 3468
<223> desconocido

20 <221> incierto
<222> 3470
<223> desconocido

<223>
<400> 98
25

atagaactgc agagtcttga gagctgcgcg gggctctcagg tatggatctt tgtcaggctc 60

30 tcttaacctt ggcactggca gtcaccagca gcacatttctc tggaagtgag gctacaccag 120

ctactcttgg caaagcttcc ccagttctgc aaagaatcaa tccaagcctg gggacaagtt 180

cttctggaaa gcctcgattc accaagtgtc gttccctga actggagaca ttttcatgct 240

35 actggacaga aggagataat cctgatttaa agaccccagg atctattcag ctgtactatg 300

ctaaaagggg aagccaacga caagctgcaa gaattgctca tgaatggacc caggaatgga 360

40 aagaatgccc tgattatgtc tctgctggaa aaaacagctg ttacttcaac tcatcatata 420

cctccatttg gataccctac tgcacatcagc taactacaaa tgggtgatttg ctggacccaaa 480

45 aatgtttcac tgttgacgaa atagtgcaac ctgatccacc cattggcctc aactggactt 540

tactaaacat tagtttgacc gggattcgtg gagacatcca agtgagttgg caaccaccac 600

50

55

60

65

ES 2 652 018 T3

ccaatgcaga tgttctgaag ggatggataa ttctggagta tgaattcag tacaagaag 660
 5 taaatgaatc aaaatggaaa gtgatgggcc ctatatggtt aacatactgt ccagtgtact 720
 cattgagaat ggataaagaa catgaagtgc gggtgagatc cagacaacgg agctttgaaa 780
 agtacagcga gttcagcga gtcctccgtg taatatttcc tcagacgaac atattggaag 840
 10 catgtgaaga agatatccag tttccatggt tcttaattat tatctttgga atattggag 900
 tagcagtgat gctatttgta gttatatttt caaagcagca aaggattaag atgctgattt 960
 taccocccagt occagttcca aagattaaag ggattgatcc agatcttctc aagggagggga 1020
 15 agttggagga ggtgaacacc atcttaggca ttcattgataa ctacaaaccc gacttctaca 1080
 atgatgattc ctgggtcgag ttcattgagc tagatattga tgaagcagat gtggatgaga 1140
 20 agactgaagg gtctgacaca gacagacttc taagcaatga tcatgagaaa tcagctggta 1200
 tccttgagc aaaggatgat gattctgggc gtaccagctg ttacgacct gacattttgg 1260
 atactgattt ccataccagt gacatgtgtg atggtacct gaagtttgc cagtcacaga 1320
 25 agttaaatat ggaagctgat ctcttggtcc ttgatcagaa gaatctgaag aacttgcctt 1380
 atgatgcttc ccttggtctct ctgcatccct ccattacca gacagtagaa gaaaacaagc 1440
 30 cacagccact tttgagcagc gaaactgagg caaccaccca actcgctct acaccgatga 1500
 gtaatcccac atcaactggca aacattgact tttatgceca agtaagcgac attacaccag 1560
 caggtggtga tgtcctttcc ccaggccaaa agattaaggc agggatagcc caaggcaata 1620
 35 cccagcggga ggtggccacg ccctgccaaag aaaattacag catgaacagt gcctactttt 1680
 gtgagtcaga tgccaaaaaa tgcategctg tggcccgctg catggaagcc acgtcttgta 1740
 40 taaaaccaag ctttaaccaa gaggacattt acatcaccac agaaagcctt accactactg 1800
 cccagatgtc tgagacagca gatattgctc cagatgctga gatgtctgtc ccagactaca 1860
 ccacggttca caccgtgcag tctccaaggg gccttatact caacgcaact gctttgcctt 1920
 45 tgcttgacaa aaagaatttt ccctcctcgt gtggttatgt gagcacagac caactgaaca 1980
 aatcatgca gtagcctttc ctatctttaa atggcaaggg aaaggctggg cacaacgct 2040
 50 taaacaaaa ctatgtttta aatctgtgtt gggagagcat gagagtggat atggattcta 2100
 aaatactttt tctggaaatg tcaaaatata aataagtga aatcaagaa ttcgtaatca 2160
 gataaatgct ccattgtga attataaata ttttaatgaa ttgtctttaa gactgtatag 2220
 55 tggcagtgat tgtctgtact gtgggtctta attttgtgat actaagcatt aaatagctac 2280
 gttttttatg tatgtagatc atgcttttg aaaaagcaaa acaatcaggt ggcttttgca 2340
 60 gttcaggaaa ttgaatgcag attatagcac aggotgattt ttttttctt ttttaataa 2400
 ctgggaacta aaactctagg tgagaaggta aaactagnnt ggatatgcaa aacatttatt 2460
 ttgacatnaa attgataaag atatttttaa taatttacac ttaagcatg agkmccttat 2520
 65 aatagctac acacatattg tagttcagaa caatccatct naggatgtag cagctacagt 2580

ES 2 652 018 T3

gtaaagaggg nttcatgttt tggatcaatga acgtaaagaa aaccaaacia gttagatttt 2640
 5 tacaagagccc tttataact tccaaaactt cttaactcta aaaatgtcta ataactgca 2700
 ttattagaaa aaaacatttt aaatttghta acgaatattt ttttaatttt gaaaacttta 2760
 ttttttttta atgttgaatc aacgtatcat acaccaaca gtaaacagaa attataataa 2820
 10 tggagaagt gctttcttcg acaaatttcc attcaagcca cacagctaca tgtaagagaa 2880
 gtagaagtga tgtggtgtga ttggctagga tgcagaagag cttcaggaat acaagaagtg 2940
 15 agagcccaag gattgggagg agggggctct cacatctcca cagtgcagtc tgtcaaacc 3000
 agcttggttt ttatagtatt ctaagaatta ttgtgtaca ggaaaagtct cacatgtatg 3060
 aaatccagta tccagatggg gtaaagttag cagataatag gataggaaat taaagacct 3120
 20 gatctagnac tagtggactt tttcacaga cagnacacia atttttaatt cagggagaag 3180
 ggacagaata aatgacttcc cactcacia gcacaactca gaagtaatta aacaggtaac 3240
 25 agaaaccttg ccatcaaacc tttgataaga tgtattttaa gtagtaagca gtatttcaat 3300
 gcttnttact taccctcca ggacaaccga tctcaataa gggagataag gtagataaaa 3360
 atcaactttt gattctgtaa taacataaac atagttcttt gggtagcac cccccaaaa 3420
 30 aaaaatttat gggagaaaga ggactctcag ctgactgaag aatacatntn atttaaatat 3480
 tttttagatg cctgaaactt taaaattacc ttttaagttt aatggattac cattttgcca 3540
 35 agaccttgt ggggaaacia gcttaatggt tagtgatttt gaaatctctt tcatgcagga 3600
 gagacagtga aaatctagcc ttgggtgttt aaggttcgcc ttgttacttt gtaatagatt 3660
 40 ttaataagtt tttctgctac tttgctgcta tggttctcc aatggctaca tgatttagtt 3720
 catatgaagt atcatcaact tagaatctat tcagcttaa gatgtgtgtt ttgatgaact 3780
 atcttaccat ttcacatag gctgaccacg tttctatagc caaaaatagc taataacct 3840
 45 aatcagttcc agaatgtcat tttttggtac tttgctggcc acacaagccg ttattcaccg 3900
 ttttaactagt tgtgtctgc agtctatatt taactttctt tatgtctgtg gatttttccc 3960
 50 ttcaaagttc aataaa 3976

<210> 99
 <211> 4014
 55 <212> ADN
 <213> M. musculus

<220>
 <221> incierto
 60 <222> 2476
 <223> desconocido

<221> incierto
 65 <222> 2506

ES 2 652 018 T3

<223> desconocido
 <221> incierto
 <222> 2599
 5 <223> desconocido
 <221> incierto
 <222> 2629
 10 <223> desconocido
 <221> incierto
 <222> 3166
 <223> desconocido
 15 <221> incierto
 <222> 3192
 <223> desconocido
 20 <221> incierto
 <222> 3343
 <223> desconocido
 <221> incierto
 <222> 3506
 25 <223> desconocido
 <221> incierto
 <222> 3508
 <223> desconocido
 30 <223>
 <400>99

35 acgtctggag agagagaggg agagagctgg ctgcaagcag tggttgtaac atgggactat 60
 ccgcttgtgg gtctcaggta tggatctttg tcaggtcttc ttaaccttgg cactggcagt 120
 40 caccagcagc acattttctg gaagtgagge tacaccagct actcttggca aagcttcccc 180
 agttctgcaa agaatcaatc caagcctggg gacaagttct tctggaaagc ctcgattcac 240
 caagtgtcgt tcccctgaac tggagacatt ttcattgtac tggacagaag gagataatcc 300
 45 tgatttaaag accccaggat ctattcagct gtactatgct aaaagggaaa gccaacgaca 360
 agctgcaaga attgctcatg aatggacca ggaatggaaa gaatgccctg attatgtctc 420
 tgctggaaaa aacagctgtt acttcaactc atcatatacc tccatttga taccctactg 480
 50 catcaagcta actacaaatg gtgatttgcg ggaccacaaa tgtttcactg ttgacgaaat 540
 agtgcaacct gatccacca ttggcctcaa ctggacttta ctaaacatta gtttgaccgg 600
 55 gattcgtgga gacatccaag tgagttggca accaccacc aatgcagatg ttctgaaggg 660
 atggataatt ctggagtatg aaattcagta caaagaagta aatgaatcaa aatggaaagt 720
 gatgggccct atatggttaa catactgtcc agtgtactca ttgagaatgg ataaagaaca 780
 60 tgaagtgcgg gtgagatcca gacaacggag ctttgaaaag tacagcgagt tcagcgaagt 840
 cctccgtgta atatttcctc agacgaacat attggaagca tgtgaagaag atatccagtt 900
 65 tccatggctc ttaattatta tctttggaat atttgagta gcagtgatgc tattttagt 960

ES 2 652 018 T3

tatatittca aagcagcaaa ggattaagat gctgatttta cccccagtcc cagttccaaa 1020
 gattaaaggg attgatccag atctttctcaa gggaggggaag ttggaggagg tgaacaccat 1080
 5 cttaggcatt catgataact acaaaccoga cttctacaat gatgattcct gggtegagtt 1140
 cattgagcta gatattgatg aagcagatgt ggatgagaag actgaagggt ctgacacaga 1200
 10 cagacttcta agcaatgatc atgagaaatc agctggatc cttggagcaa aggatgatga 1260
 ttctgggggt accagctgtt acgaccctga cttttggat actgatttcc ataccagtga 1320
 catgtgtgat ggtaccttga agtttgcctca gtcacagaag ttaaataatgg aagctgatct 1380
 15 cttgtgcctt gatcagaaga atctgaagaa cttgccttat gatgcttccc ttggtctct 1440
 gcatccctcc attaccaga cagtagaaga aaacaagcca cagccacttt tgagcagcga 1500
 aactgaggca accaccaac tcgcctctac accgatgagt aatcccacat cactggcaaa 1560
 20 cattgacttt tatgccaag taagcgacat tacaccagca ggtggtgatg tectttcccc 1620
 aggccaaaag attaaggcag ggatagocca aggcaatacc cagcgggagg tggccacgcc 1680
 25 ctgccaagaa aattacagca tgaacagtgc ctacttttgt gagtcagatg ccaaaaaatg 1740
 catcgctgtg gcccgctgca tggaaagccac gtcttgtata aaaccaagct ttaaccaaga 1800
 30 ggacatttac atcaccacag aaagccttac cactactgcc cagatgtctg agacagcaga 1860
 tattgtcca gatgctgaga tgtctgtccc agactacacc acggttcaca ccgtgcagtc 1920
 tccaaggggc cttatactca acgcaactgc tttgcctttg cctgacaaaa agaattttcc 1980
 35 ctectcggtg ggttatgtga gcacagacca actgaacaaa atcatgcagt agcetttcct 2040
 atctttaaat ggcaagggaa aggctgggca caaacgctta aacaaaaact atgttttaaa 2100
 40 tctgtgttgg gagagcatga gagtggatat ggattctaaa atactttttc tggaaatgtc 2160
 aaaatatcaa taagtggaaa atcaagaatt cgtaatcaga taaatgctcc cattgtgaat 2220
 tataaatatt ttaatgaatt gtctttaaga ctgtatagtg gcagtgattg tctgtactgt 2280
 45 gggctctaat tttgtgatac taagcattaa atagctacgt tttttatgta tgtagatcat 2340
 gcttttggaa aaagcaaac aatcaggtgg cttttgcagt tcaggaaatt gaatgcagat 2400
 50 tatagcacag gctgattttt tttttctttt ttaaataact gggaactaaa actctaggtg 2460
 agaaggtaaa actagnttgg atatgcaaaa catttatttt gacatnaaat tgataaagat 2520
 atttttaata atttacactt taagcatgag kmctttataa tatgctacac acatattgta 2580
 55 gttcagaaca atccatctna ggatgtagca gctacagtgt aaagagggnt tcatgttttg 2640
 gtcaatgaac gtaaagaaaa ccaacaagt tagattttta caaagccctt ttataacttc 2700
 60 caaaacttct taactctaaa aatgtctaat aacctgcatt attagaaaaa aacattttta 2760
 atttgtaaac gaatattttt ttaattttga aaactttatt ttttttaaat gttgaatcaa 2820
 cgtatcatac accaaacagt aaacagaaat tataataatg gaagaagtgc tttcttcgac 2880
 65 aaatttccat tcaagccaca cagctacatg taagagaagt agaagtgatg tgggtgtgatt 2940

ES 2 652 018 T3

5 ggctaggatg cagaagagct tcaggaatac aagaagtgag agcccaagga ttgggaggag 3000
 5 ggggctctca catctccaca gtgcagtctg tcaaaccag cttggttttt atagtattct 3060
 aagaattatt gtgtacaagg aaaagtctca catgtatgaa atccagtatc cagatggggg 3120
 10 aaagttagca gataatagga taggaaatta aagacctaga tctagnacta gtggactttt 3180
 ttcacagaca gnacacaaat ttttaattca gggagaaggg acagaataaa tgacttccca 3240
 ctcacaaaagc acaactcaga agtaattaa caggtaacag aaaccttgcc atcaaacctt 3300
 15 tgataagatg tattttaagt agtaagcagt atttcaatgc ttnttactta cctcccagg 3360
 acaaccgatc tcaaataagg gagataaggt agataaaaat cactttttga ttctgtaata 3420
 acataaacat agttctttgg gttagcacc ccccaaaaaa aaatttatgg gagaaagagg 3480
 20 actctcagct gactgaagaa tacatntnat ttaaattttt tttagatgcc tgaaacttta 3540
 aaattacctt taagttttaa tggattacca ttttgccaag acctttgtgg ggaaacaagc 3600
 25 ttaatgttta gtgattttga aatctctttc atgcaggaga gacagtgaaa atctagcctt 3660
 ggggtgtttaa ggttcgcctt gttactttgt aatagatttt aataagtttt tctgctactt 3720
 tgctgctatg gtttctccaa tggtacatg atttagttca tatgaagtat catcaactta 3780
 30 gaatctattc agcttaaaga tgtgtgtttt gatgaactat cttaccattt caccataggc 3840
 tgaccacggt tctatagcca aaaatagcta aatacctcaa tcagttccag aatgtcattt 3900
 35 tttggtaactt tgctggccac acaagccggt attcaccggt taactagttg tgttctgcag 3960
 tctatattta actttcttta tgtctgtgga tttttccctt caaagttcaa taaa 4014

40 <210> 100
 <211> 57489
 <212> ADN
 <213> M. musculus

<220>
 <221> característica _misc
 45 <222> 19, 49, 59, 71, 78, 172, 1734, 1851, 2528, 3199, 3274, 4582, 5432
 <223> n = A,T,C o G

50 <221> característica _misc
 <222> 5505 - 5604
 <223> n = A,T,C o G

55 <221> característica _misc
 <222> 9593 - 9647
 <223> n = A,T,C o G

60 <221> característica _misc
 <222> 9648 - 9692
 <223> n = A,T,C o G
 <221> característica _misc
 <222> 14425 - 14444
 <223> n = A,T,C o G
 65 <400> 100

ES 2 652 018 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

```

gactcctgct aggggttgant gatgctggt tgttctgct aggtctaanc cacccaccnc 60
tgcattgctat nccaactnta cctaactgta ctgctgatat atccatgaaa tgtttgagag 120
tggattgagc tgatgctatt gactggttg aactgaactg ctgatttcct gncaaagcag 180
atgagatttg ctccaaagag tcaattctaa ataagtccac tcccccttt tccaatagct 240
ttctttttct actacctatg gtggcggtgg gctagaaggg aggatgaaga cattaagaac 300
catcattaaa agtagacttt gaaaaaatta aatctacaaa tgacaaatca cagtataact 360
acattcttct ttctaggaac atcctgtttt ctagaactac ttattaagtt tagactttct 420
ccaatgagtg gtottaacaa ttatttcaaa caacattttt tgatttctgg gtcogcattt 480
atacttcata tcctaactca ttggtcagtg tggccatttt gtagttccta tcattttcat 540
gatgttgttt aaagtagtat gtatatatc ataaccatat tataggtaaa cagagggaga 600
ccatgttgtc tgtaaatatt atttcaattt cttttctacc ttggatgtcc tttatttctt 660
ttctttggct tagtactcct tgtactatgt ttaataaaaa tggtaaacct agaaattctc 720
atthtgcctt aaatctttaa gagaaagctt ttgacatttc ctacagttagt ggtgtcttag 780
cctttctatt gctgtgcatg acaacaaatt tgggtgtgta agaccaccca aaaaagcagc 840
cagaagtaac gttgtctaat gtggtatgct ggggacacag gtctccctc agcattgect 900
ctgctgtact ctccctgcac aggaaagttg cggatgaagc atgctcactg ttagctttca 960
ccaaccagc accaagacct ggggtaaagc accatcatta ctacctgtc ctaccttga 1020
tgagccagtc ttaccctaag cttttttgtc taaggttgaa atagttggg gaggcagttg 1080
ctttgccatg tagactgata atgcaaaatc tcaagggcct ctaaaacatg aaaagtctta 1140
tataggctct ggaattcttg ggttcaaacc tgagcatgct caatagcgtg tggctctgtg 1200
ctgatgccag gatatttctg gaatcttgtc tatgagcact agttgtggtt catatctaat 1260
attagaaaac tgttcatttg tcatggaaaa tgacaataaa ttaatgaagt atgattctct 1320
cagccacaaa gttccttacc atattatag gaaagcaggt ttgaatagct cagttacaag 1380
gttataattg ataactcagt tctaacctgt acaaatttca tgggtttctc tatgctatag 1440
tggaaagttct atctgtaagg tgctcagtag agactttagg cagccagatg ctgtttcact 1500
gtaatgggtc tgatatcaac caaagaaaaa gccctgatct aatttttatt cactgcttct 1560
cttggaaagga atcttactgt tttctgtttt ctccaaattg aagcattcct tttctaggg 1620
ccagagaaga ttcataagac tcctgaagct agtagaactt ccatgtctc cagataagat 1680
agtaaatata ctcataagac caagattgaa aaatagtaac agttgcacct cttncatgaa 1740
tctccctgc atcttagatg gagactcaa agacatagct ttcttgagtc ctactcatg 1800
ttgggtatg cttttctgta ttcagctgcc cctgttcacc tatgtcccga naagtaatca 1860
caataaataa attagtttac catactagac ctggatacaa tcatgtcatt ggcattgccc 1920
  
```

ES 2 652 018 T3

tcatggctca tctgagacaa atacatgttt gttcacatat cctaagtggg atcaaaaatg 1980
 gaatcctgtg tccggcccag ggctcaggcc tctgagcgag gtggatgtgg gaagtttggc 2040
 5 ggatgtgggt gcacaccccc atggcaccac tgggcatgca cagggctgtg agaagccgca 2100
 ggacccccctc caggggtggg aaaggttcag tctgaagtct ccacggacct gccagagttg 2160
 10 ggctcagact ctcaggcatg ccaactggagt ctgtggaaga gtgcagagggc cagggacatc 2220
 aggtttctctg tcatggacac ctcagatgct gctggatgtc tcagaagagc tgagaacaga 2280
 gtagggaccc gggctgaagg gaaaagggca tggagagggc tcaagatggg tccacagggg 2340
 15 tgagagtcc tgtcttgctt aggcagctag ctgggttttag cagaggccct ggttggagtg 2400
 cagggaggcc tctgtgtggg agattagatg caaagttctt tagtagatga cctgctccgt 2460
 20 tgctctagca cggcggtacc ctaaggtctt taaaattaga tattgtagtt tcttctctgt 2520
 ttctttanct ctcattgatg tggtttggtt tataatgcca gatctttaa ggatctcact 2580
 accccacccc ccatcttgcc ttatttgaga atcttctgtc cattaagac ataagagcct 2640
 25 atctgtctgt atacttgggt gtagacaagt tctgaccatg taataaatat tcttcatgt 2700
 ttctctcact tcagcctttt cagtgttggg catgatgtcc tgattttctc acatagaca 2760
 30 tccttatgag gatttttcaa actaagtcag tttcatcctg gttaatcttg gtgtttcaag 2820
 tcaacatacc ttacaatggt ttccagtcac cagagcacta gaatctcata gggcatttga 2880
 tttatgaata ggactattag ttcttctata attctgctca cttgtggtaa tgcaatcgag 2940
 35 aaatgaagat gtacaattgg cagagtgaaa aaatttaaat attcagtaca cttttttgga 3000
 tatagtgaaa cagtaacaca gtctctttta atattatfff tttatacaag tagattaatg 3060
 40 cagctctcag cactcaacga agacatttca ttatgcagca gagattctta cagaaaacca 3120
 cagctggtea aactgcagag aataggtgac actggcctgt gtctaaacac aaatgctaca 3180
 45 cagaagtctc cagaaagcnc ttcagaagag caaccaataa acaaacaaac aaacaaaca 3240
 acaaggaaag aactagagaa ccaggaggac ttgntaagaa acaatgtttt gtgggctga 3300
 cagagatgat ggatgatgta ctcagacatt ccataagatc tacaacctg tgggtggaac 3360
 50 aacattatga actaaccagt accccggagc tcttgactct agctgcatat gtatcaaaag 3420
 atgacctagt cggccatcac tggaaagaga ggcccattgg acatgcaaac tgtatatgcc 3480
 55 ccaatacagg ggaacgccag ggccaaaaaa aaatgagaat gggtaggttag ggaagtggg 3540
 gggaagggta tgggggactt ttgggatagc attggaaatg taattgagga aaatagtga 3600
 taaaatattt taaaaataa aaataaaaaa aatggaaaaa aaaaaaagc ctagttagct 3660
 60 catcacactt cccaaggcta cttcttctctg tactgcagg aggtgcaactg ctctctttga 3720
 acttacagcc tgttcttgag gacttctaga tactgccttc tttgggggaa cccgatgggt 3780
 65 ggagaggagg gaagtctccc gcaactacca atattttctt ctaggaggag ccccgccgcc 3840

ES 2 652 018 T3

caattgagag cgacacgcac caactcgcaa ctctctcgcca gaaagettca tcccagecct 3900
 gcggaactgag tagcgggggc ggcgttcage ctccccgcag cggccccgga gctagctgcc 3960
 5 ctcggtctccc gctgcccttc ccctaggcag cctggatecc cgaggcggcg gcgggtccct 4020
 cgcagagccg aacgccagcc gacttttccc accctcccc tetettctc tcccctcccc 4080
 tcccctctc ccttcccagt ttacccccgc ccccttctc ctccccaaagc ctgacaacc 4140
 10 acgagctgcc aagcaggcgc agccatggga agaggaggcg gtctaggag cggcggcact 4200
 ggcagaggcg gctgctacag cggcgggtgtt ggcgacggct gttactgaac cccggcagcc 4260
 15 gcggggatcc cgggctgggt ccacgcggcc tgaggcctcg gctccagcag cccccaaagc 4320
 gacacgaacc cgcgttctgt ctcccgaggc gaaactccga ggtactggag gggagttctt 4380
 attcccctca cattcgtgcc aggagacctg ggagtagacc cgggcctgcc aactgcttgt 4440
 20 gaaaaattgg ggtcactttt atgtatttgc cccgataatt ttattttatt ttattttatt 4500
 ttattttatt ttgatgagtt taggggtgggt tgtattccct tctcaaaagt tgttttctgc 4560
 25 tgatgggttg gtgtaaccog ancctgcgtg tccctggagaa gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 4620
 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgc gcgcgcgcgc ctgtgtgtgt gtgtgtgtgt 4680
 aagttgttct tggctctgag tgaagctgaa agttgatgtg ggcgacaagg aatggggggc 4740
 30 agcaagcgaa ctgtcccagc ctggagcctg ctccaaccag gttgtgagat gcaaggagag 4800
 gtttcttct aagactgttt tcttggctt aaaagttctg cgagtgtgtt tgtcaccatc 4860
 35 agcctgctaa cctggagcaa ggactgtgga agctgctgct gctgtctgaa gcgagctcct 4920
 ggttgggtgt gatggcctga gggactccgg aggggtgggt gtgaagcacg cgaacccccgc 4980
 40 agcctctctgc ctttgcgcag tctgtgcagg ctgcagctgc aagctggaag cagaggagct 5040
 ggagtcagag tcaccgcgc cagagcctcc atgaactggg gtgagtggaa attgtggcaa 5100
 gccaaaactgt cccggcgcctg gacacactcg tggttatgaa atcaaccagg ctcaaagttc 5160
 45 tgatagaact gcagagtctt gagagctgcg cgggtgagtc gggtcacgtc tggagagaga 5220
 gagggagaga gctggctgca agcagtggtt gtaacatggg actatccgct tgtgggtgcg 5280
 50 tggggaaatc tatttctggg caaggacttt atatatagca cgggggagta ctgtctgctg 5340
 ggaccagggt gcaggtttc gtggtgagct ctgatgtgtg tgcttgaaga ggtgtgcagt 5400
 atgtatgtgt gctgtatgtt tgcacgcgtg tngtgggagc ccattgggag gtgtgttggc 5460
 55 ttctgaatc aggggtgtga gtgggagaaa gaaaccatat agatnnnnnn nnnnnnnnnn 5520
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 5580
 60 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnngaata gggttttatt ttagtttctt ttgtcccacc 5640
 tcccgtaatc caatgtggtg ttcaaaactcc cgtcctgacc ctccgtaatt cccattggac 5700
 tctcatatgt ccagggetat cttttggact gaggtttgaa ccatccgata tatcagacac 5760
 65 aagcataatt cttgggttgc atagagattg tttttttta aagtatacta cttggagatc 5820

ES 2 652 018 T3

agggaattga aaatggtgtc ctctgtctgc aaggaacatg tagaacattg acacttttat 5880
 agctcttcag ggattccatt ggctgctacc agagccacac ctgtagagcc atgaaacaac 5940
 5 acttcttgct cagogttcac tatgattagg gataacagga agagttttat cagtattgtc 6000
 aagtttgcaa atgttagaaa agaagaagag aagagaagag aagagaagag aagagaagag 6060
 aagagaagag aagaaaagaa aagaaaagaa aagaaaagaa aagaaaagaa aagaaaagaa 6120
 10 aagaaaagaa aagaagagaa gagaagagaa aagaaatcag tccatggagg ccattgaaga 6180
 attggtggag tgttgataag gtgacttgta aatagggcag tattatggaa atactgggac 6240
 15 taagcatcaa agtggttggc aatagttgtc aaatgcaaca atccttcccc aaagagttga 6300
 gtactgagtt tctttaccac ccatcctgcc ttgtctctag agaagtgtgg acatagtac 6360
 cataggttat tttcccaaag aagtgtattt ccttcagata aaggcatgtg cttacagagc 6420
 20 ccattgatca agtccctcat tcattagacc gaaagactga aggtgcagcc actcttgggc 6480
 ttctaaatca ctagaaaaat ggagactggg ggctcttggg gaacatatgc ttgggtgttt 6540
 25 cagagcacac agtcattccc agggttccct taatgtttga aaggatattc tcacctctca 6600
 gcttccctct tgttacacct ccttgggatc agtacagtgt ttgtaaaaca taaattaagc 6660
 tcctttggtc cttgggaaag aggtgtaaga aatgtagta tagtattata gaagattttt 6720
 30 attttatttt atattttatt ttttgtctta ttcaaagccc tgtgctgagc aatttttttc 6780
 tatctccaga tgaaactaaa agaaaataca ctaggccctg ttattagagc tgagcttgtg 6840
 35 ggtcttttgc tgtgaggtga cccagtggct ggaagccaag gacctgaaag tctgcaactgc 6900
 tcattctgtt tcctgaggaa agagctcatg ggatggagag agaattccaa cacgctgtgc 6960
 atcctcatga cacatggggc acttctgaag tctgaggcaa tgctagactt actaagattt 7020
 40 cttccacaac gttcttgtcc acacactcac gacttcacgg ggctttgaat gttatatcaa 7080
 gaccgtggtc tgtggctgct tgccttgacc ttgtcccttt tctgtcttgc aggtctcagg 7140
 45 tatggatctt tgtcaggtct tcttaacctt ggcactggca gtcaccagca gcacattttc 7200
 tggaaagtgag ggtgagttct acattccttt tctccttgtg tggataaag aaacaaagca 7260
 gtctgtgtt aaatctgaac aaaatcgtct aagtttagg ttaacagcaa acaggaaacc 7320
 50 tgtcttagct ttaaattcat aaccaggag agagccattc tggggatgtg taagtggggc 7380
 aagagtcgta ggctttggca actgacattt tcctattgga aattgatgtt acgtaatgca 7440
 55 cagggggaca tttatgatga agacaagccg ggtctccggg agagatatta aatcacacc 7500
 aaagcatcat tagoctacta atcgtctcagc tcatctgtaa ctaagcatag cagaatctgt 7560
 ttcaaagcc tggaatgcag tccccttaat catattccct gagatgtaa tctcaggctt 7620
 60 ccaatgaatt tgtgcccctg ttctctgaat aatcattcat tggctgagtt ccagaggaaa 7680
 aagacacca aactaggtga ccaacgttac ccagaaatgt gagctacctt agctgtctga 7740
 65

ES 2 652 018 T3

ctatgttccc ttatgttttt cttttatact ctcccggttg tctcaatatt ttcagattca 7800
 catgtcatag cagaaacaac aaagaataat gcaaatgggt gtgggggtgt ctgtctagaa 7860
 5 aaaaaaaagt gtccttacia agggctggcg gacgttttga agactgtctt gagcacgagg 7920
 cagttttctt tcttggtttc attagaggat agaatagaaa caatatgttt ttgccatgct 7980
 10 gtgcctctgg attctgttgc tgctttaagt gtagcctact cccttactca acaccaact 8040
 catgttgga aacacaattt aacaggcgac ttaacacctt aagatgtccc gctgacctg 8100
 tgaccaaaaa taaatgccc gtagttagct gctgactgtg ttaggagcaa cttggaaagg 8160
 15 ggaacgaata gaatgacta tttgatttct taaagcaatc ccaaaaatat ttatagaaaa 8220
 gaaatcataa ttgtttgtaa ttttttggg tttttctggt gttataatgt caatattata 8280
 caagtcagac gtggaggagg agagagtcac gggctccact tcagccgctt ttcccatggc 8340
 20 tgctttttag agcctggttc tgagccagag aattacagct cagctcctct gccattccag 8400
 agtcatgggt gtttaatcgc tcctttcttc actaagggtga ctttcagtcc aaggggcaag 8460
 25 gcttgaggag tttaaaagcc agtgaagtga aaagcacagc agaacaatca ttaaagaagt 8520
 tgagaaatgc atcccaggct aacagattag agctcaaag gttttcttta tttttctttt 8580
 30 ttttaattaga ttttttctt tatttacatt tcaaagtta tcccccttct ttgtttcccc 8640
 tctgaaaatc ctctatcccc tcaccccatc aacaaccac ccactcctgc ttcttgccac 8700
 aggcattccc ctatactggg gcatagaaat ttcacaggac caaggcctc tcctcccatt 8760
 35 gatggccgat taggcatcc tctacatatg cagctagagc catgagtctc accatgtggt 8820
 ttctttggtt ggttggtcaa tcctggggag ctctcagggt actggttatt tcatattggt 8880
 40 gttctctcta tgggtctggt aacccttca gctccttggg tactttctct agatccttca 8940
 ttggagacct tgtgctctaa tggataatga tgagcatcca cttctgttca aatggttttc 9000
 aaacctagag aatttccaag ttctgttcaa cagcttaaac atttgcccag ccttcaactt 9060
 45 catgagaaga atgggtgaaa aaaagtatat ataatgttat aagccgtgtg tgtgcttgtg 9120
 tgtatgtgtg catgcaagtg catgtataca catgattacc cttttctct ctgtggcaag 9180
 50 agaagccttg atctacttct atagcagaaa tctgaatat aataatctga gctcaactac 9240
 agctctcttg gtgttcatta attcactaga ctcaatacag catatttget tctttgtgcc 9300
 ctatggatga ctgtctgcca agtccttctc ctaccccaat gtggttaacca ctgttgtctc 9360
 55 tacaatttga ccttttattt gtaaaattac acattgatgc aacctgttt attgttcttt 9420
 cctgatctga cctctttctc ttagactgat ggccactttt gctttagaga cactcacact 9480
 60 gtggcaatgg caggagcttc aagctgaagt ctgggctatt ccatgtctat gctgttatgt 9540
 tgacagctgc atgaatacag acatagagtc ccttacacag tgggtgttca acnnnnnnnn 9600
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 9660
 65 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnggacgacg gttccttgat ctgggtactt 9720

tctctaacte ctccatgggg gcccgagtec atccaatage tgacgtgagc atctacgtct 9780
 gtgttgccag gccccagtat agcctcacia gagacagcta tatcagggtc ctttcagcaa 9840
 5 aatctgcttt gtatgcaagg tgtcagcatt ggaggctgat tatgggatgg atcccaggta 9900
 tggcagtctc taaatggtec atcctttcgt ctctctccca aacttgtctc tgtaactcct 9960
 10 ttcattgggtg tttgttccca attctaagaa agggcaaagt gtccacactt ggtcttcctt 10020
 cttcttgagt ttcattgtgt ttgcaaatgt atcttgtatc ttgggtattc taagtttctg 10080
 ggctaataatc cacttatcag tgagtacata tcatgtgagt tctttgtgat tgggttacct 10140
 15 aactcaggat gatgcoctcc aggtccattc atttgtctag gaatttcata aattcattct 10200
 ttttaatagc tgagttagtac tccattgtgt aatgtacca cattttctgt atccattcct 10260
 20 ctgttgaggg acatctgggt tctttccaga ttctggctat tataaataag gctgctatga 10320
 acatagtga acatgtgtcc ttctaccag ttggaacatc ttctggatat atgcccagga 10380
 gaggtattgt gggatcctcc tccggtagta caatgtccaa ttttctgagg aaccgccagg 10440
 25 ctgatttcca gagtgggtgt acaagctcgc aatcccatca acaatggagg agtgtttctc 10500
 tttctccata tctctgccag catctgttgt cagagaagtc aggtataatt ctgatagggt 10560
 30 tacctttata tgttacttgg catttttttc cttgcagctt ttaatattct ttcttgttat 10620
 gtgcatttag tgtttgatta ttatgtgaca ggaggatttt ctttctggtc caatctattg 10680
 gtgttctgtg ggcttctgta catttatggc catctctttc tttaggtttag gaaagttttc 10740
 35 ttctatgatt ttgttgaaga tgtctttggc ttttgagctg ggaagcttca cctcttcta 10800
 ttctttttat tcttaagttg gtcttttcat agtgtgcaaa attcttgtat gatttgagtt 10860
 40 aggaactttc tacaatggca ttttcttga tcatgtatc atttcttcta tggatcctc 10920
 tatgtctgaa attctctctt ccatctctgt attctattgg tgttgcacgc atctgtagtt 10980
 45 cttgttctct ttcttaggtt tccatctct aggtaccct cctttgtgtt ttctgtattg 11040
 cttctacttc tgtttttagg tctggatcct tttattcatt accttcacct gtttgattgt 11100
 attttctgt atttctttt ttttaattt tatttttatt agatattttc tttatataca 11160
 50 tttgaaatgc tatectgaaa ttttctatt tccccccacc cccgctccc taccoaacca 11220
 ctttcccgtc tttctttaag ggatgtgttg tttctcttt aaagccttct acctgtttga 11280
 55 ttgtgttttc ttacatttct ttaagggact tatttatate ctttttaag gtctctatca 11340
 tcttcatgag atgggattta aggtcacagt cttgctcttc aggagtatta gactatccac 11400
 tgcttgcctg actaggagag ctgggttcta atggtgccat attgcattgg cttttactga 11460
 60 ttatgttctt gcacttgcct tttgccatct ggttgtctct ggtgttggtt ggctgggtg 11520
 tccatgttg aagcaggcct cccagatgaa ggtggagctg tgtgtctcag gtatgagcag 11580
 65 gcctcctggg aggcagtctg agttatgagt gtcagattgg agctgacttc ctggaaggca 11640

ES 2 652 018 T3

5 ggtggagctg tgaggtgggg cacagagtgc tgatctgcat ctgcttcagg tgtaggggtg 11700
 gaccagaagg aagatggagc tctgacaggg tggggcacag cctacagctg ctagctgaaa 11760
 ttcccatcag gtagggcagg gggattaggg tgagtgagge agggaggggt ctcacctgtg 11820
 10 tatggttggt tatgtaggca gagctgtgaa gtgtgtgctg agtaactgatg tgcccatatt 11880
 ttottttctt tttcttccct gtgttttatg tgagacagag taccagtggt atggccttcc 11940
 actaagacaa tattatcagt tgtctgagag aatatgggga aaacaaacat aatgtgtctg 12000
 gccacactct tgaaaacaga atacttgggt gccctttgggt caccaaaatg ttaagtgaga 12060
 15 atacaattgg ctaataccga ggtgagaggg aacatcctat aatacaattc aattcccatg 12120
 caaactacct acagatactt tcacatcact catcttgata gctcagcccc acaaaactgc 12180
 ttectacttc agatgacaaa tgtatgtaat atactgtact tctgaaagat ttctttgcta 12240
 taatttataa atagactgta ctaaagtttt gaaatgtctt tttttttca agctggttcc 12300
 catgactcat ttattagagt tgatgaattt gctacaccag ctcacagAAC tcagacatta 12360
 25 aattaatgac tttggctttt tactgagggc atcacaaggg agacagataa tgaggtatta 12420
 tattaataag cctctgctac tgtaacaaat atctgaaaca atcagcttat gaagagagaa 12480
 ggtttatttt gactcacagg tttggagaac tctggagttt ccagagcatg agtggttgggt 12540
 tccactgctt ttgagcctat gaaatggagg aactgtgagc agcagcatgt ggagaaacca 12600
 cttttccttg ggacgaagaa attgctaagg gtccaggttt tgttttaaaa tcaactgtccc 12660
 35 ccacccccct acccccaagt gatgggaaga cctcctaact cacctttatg tttcaaatc 12720
 ctaccacctc tgagttagtg caggctgagg atcatagctt tagcacatgg gcccttagag 12780
 gaaattccat attgaaacca taacatatga agaacatgct gtagccactg tgccctctaa 12840
 gcactctcag gttatcaacc aattgaaagc ttctgaactc atactatcaa ttttttgtga 12900
 atgttgatatt ctctgactac atttattaaa ccactgacca ttggtgatga gcttagccat 12960
 45 tagaccctcc ttctcccta gaggcttga ataactga aaaaaattcc agttctacaa 13020
 ccataaatct gtttttccc atgccagctt ccatoctgag ggaggaaatc cccagccact 13080
 actcaactca ttagtgatg aaaagactca togetctgag tattacaaat attttaaaaa 13140
 tgtatatggt aaaatacagt ggggaagacta aatatagatt tagcagtgtc acacatagct 13200
 tcccttgctt tcatttaaat ctcagtattt gttgtttctg tgtagtaaca agagctggtc 13260
 55 tatccagtc tcttacacac tttccaccaa gaccagacaa caagtcagac tctttgtagc 13320
 tagggccttt gcaaaggaac ccagctggaa ggagccttac tgagcacttt ccaactattgc 13380
 ctaccttcca gacagcctgc tcccagctgt attacaatga ttgactcact tgctgcctat 13440
 tcaaaaaact ccagggcctc acttgttctg ctttgccctt ccccttatc tttcccatg 13500
 cccaggaatg ttctcactta tagtatttcc aaaaataatt ttttaattaa atgtgggatt 13560
 65 tgtatttttc taaagaaacc tgtgttctcc ttctatgca caagggaaac ttgagtttga 13620

actcaaagga tagatgggtgg aattgttctc attgttctgt attgtgtctg ggcattgcac 13680
 5 ctgaggtaat gacaacccaa aggcctccat ttgctctgac tttacaagct ctttttaatg 13740
 catagatata gctttaattt taatgggggg gggttggcat ggaagcctat tatacaaaaa 13800
 10 tgacactata acagggtcac agaagatcgt tttctacag ggatgactaa tgattttctt 13860
 ctctttcttt ttcagctaca ccagctactc ttggcaaagc ttcccagtt ctgcaaagaa 13920
 tcaatccaag cctggggaca agtaagaatt tctgtcattc tactaacttg cactgatggg 13980
 15 ttccatatgt tactataatt caaactactc tctttctctt ttctctcttt gggatactgg 14040
 taacaggaaa agtgacagcg tttgaatttt ataagcaaaa agtatttttc aggatttatg 14100
 20 tttcaatttc tgtatagagg tcatggttta tttttctggt ttgtttatgc ttgcaggtta 14160
 agagaaggct ttattatgcc ttgttttaca aacttgtttt taacattatt gttgttgata 14220
 tttggtagta tttatataat gcttgcaattg gcaaaaaatg gaatttattt cccgaacca 14280
 25 atttaccat atacctaca attctgcctt catataagca gcctattttt tacatgtcat 14340
 cgaacaccgc cccccccccc cccgtcttg ctaatcttc cctatctaca taccaaactc 14400
 30 aaccttcagc tcacagaaaa aggtnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn 14460
 nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn 14520
 nnnnacatca gggccacaag caggaaactg tccaatctca caatcaaagt aaatgccaca 14580
 35 gttgtcaaat gtggacatac ttgctatatt cacacagggg acttggacta tataatttac 14640
 acatgcagta ttaaaataaa taattcagat tcagcacaaa gtttactttc tttgctataa 14700
 40 attttaggca agtatgggag tgtatgaatc tttaaaaaaa aaaacaaaat ggagctaaga 14760
 aagtgcagat aacataactt atttacaagt ctccaaattt tcttgaaaat atcacatgag 14820
 aagtaagcaa atagaattca ccagcttcta gagcatttac caactccag tgaatatcaa 14880
 45 tacctgcata aaagttacct cacactgaac tttgtgtaac caacatcact ttctaattcc 14940
 aagctcctac agaacatccc atagagctct taatacccaa tggcttttct agcccaatgt 15000
 50 ttcaaagtcc ttccatagtc ttccctaaaa catggtcagg ttgtcacaga aatatgccac 15060
 tatgctggta actatttgtc ttggtcaggt ttctattcct gcacaaacgt catgaccaag 15120
 aatcaagtag gggagaaagg ggtttattca gtctacactt ccacattgct attcattacc 15180
 55 aaaggaagtc aggactgaa ctcaagcagg tcaggaagca ggagctgatg cagaaacct 15240
 ggaaagatgt tatttactgg ctccctacc ctggcttgct cagcctgctt tcttttagaa 15300
 60 cccaagacta ccagaccaga gatggtacca cccacaatga gctatgcctt cccctcttga 15360
 tcaactaattg agaaaatgcc ttacagctgg atctcatgga ggcatttct caagggaggt 15420
 tactttctct atgataactc cagtttgtgt aacgttaaca cacaaaatca gccagtacag 15480
 65 tcaacctctg gctacacaa atacacacag atatacacac cctcatgtac acacacacac 15540

ES 2 652 018 T3

acacacacac atccaagaag aatgcaa at gactaccaat ggtcttccaa gatcttttga 15600
 gtacaagcag tgtaaatgct aaaatttctt cagaacgtgg aacatcttca gttccaacac 15660
 5 tcatttgtac aagtgggaat taatctgggg tgcaaagggt gaactcttgt gaattgcaac 15720
 attcttttct gggatgctat agtagatgct aaacaatgcc actgtaggc ttaagcattc 15780
 ctgcttagga cttttctcct ctctgcctat tctcagattt ctagtcttag gcatgttttt 15840
 10 catctttcaa atgaactact tgcctcata tcttttccac tagctctggg tcttaacaa 15900
 gccctacaga ataatgcagg aaataaagtc acaacttttt ggcttcaaaa ttgatgactg 15960
 15 acagtagaaa ggaatagctg ctgagaagggt aagcccggaa aagtgccttt ccagatgtta 16020
 gtatcacctc ccagagagac tggctttatc ttcatagttt acatacttca gcagttatgt 16080
 tccgtgggaa tggcacatgt ccttctcac tccatgtatg cttttcttc ttgttctgca 16140
 20 ggttctctg gaaagcctcg attcaccaag tgtcgttccc ctgaactgga gacattttca 16200
 tgctactgga cagaaggaga taactctgat ttaaagacc caggatctat tcagctgtac 16260
 25 tatgctaaaa ggtgaaggct tcacgcctt ctgactttgt cctccactga tttctcagtc 16320
 ggatggtgtg gagagattcc cattgagtga aagcacgtgg gcgtgcctgt gggcatacgt 16380
 30 gagtgtgtgc agaggcttga gtaatatttg aactgaggag gtctcagga ctttctaat 16440
 gtagtgtgtt aaaatgggga aaagaagtga aaaaaactgt gtgagtatat gatggagagg 16500
 ctttggaggc aaagaaaatc acagatgcaa tgtccgtgtc agcatgtttg agaatcacia 16560
 35 gagcctgtat aggtgacatg agactgaaac ttgggaaagt gacatgtgaa ggagttagag 16620
 ggctaccag atactgtaac aatgagcttg tagtcccggg aagaccactg aatcttactt 16680
 40 tgtgctttaa aaaaactgtg ttttaagagc ctccaact tggcttctc ataagaatta 16740
 attaattaca ctaagtgagg gaacttctc ttttgtttt atccatgtcg tctggaatga 16800
 cacttgatga ggaagacaaa catctgaaa cgtggctcctc accagtcctt aagtttcatt 16860
 45 ccctggccaa gtccctcctt cctctcctc cgtcttact atgcagtatc agcataattt 16920
 atgggatagt ctgtgatatt ttaatacatc tatatgatgt gtgattctca aaccaggaca 16980
 50 attggtgat ctatcacttg aagcatttat cattgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 17040
 gtgtgtgtgt ttgccagggc caccaaaaat cttctctact agatattttt aaatacatga 17100
 55 ttaatcgttg tcaactataa ttaccctact gtgctataca acaaacatca ccatttttaa 17160
 tgttagagtt aaatactttc ttgtcttct ttcctccatg aacctccagg gaaagccaac 17220
 gacaagctgc aaggttagtg aagaccctt gtcttagact ttcatacaag ggctgagaa 17280
 60 tgacatgttc cactcogtag atgataggga agggaaggga aggaagatgt gggagggcag 17340
 ttagtccgag ctagcctcct gcagtatgtc ctggcttcag tcttctctca ccaaggaaca 17400
 gccagcaaat tagttaaac aagtctctc cattctagta gtataatagg cttagttcac 17460
 65 agcttcttag gtggaagaat tctgataca gttcattctg cataattaat caatcatcaa 17520

tcaattaate aataagcaag attttcttag tatataataa taatttataa caataatgat 17580
atagaaccca gattcctaaa ctataaaaag taattcotta ttgcttatgc ttattaatag 17640
5 actataagaa ctttctaag cctacctgag tgtttaattt acagacaaca aaaacttta 17700
gtgaacaaca aagactgact ctacccatct tctagttatg aaaggcacca cagacatacc 17760
10 cctgcctaag gcacacagag atgaggtagt ttggaaccaa acgcactact tatttaactt 17820
gaggttgata ctataaagag gtatgggcca gtaaagtaga ggcaggcaga cagacagaca 17880
gacagacaga tactcagatg tgagctaaag tgtttgggaa cacttttgaa aatgtatgaa 17940
15 ttgattctgt tatttctaata atgaaaagag agagaaactc actagatgtc atctttacac 18000
cttgcttcgg tagctcagac agcttagcac catcaaaaca aatgagaagt ttttcataca 18060
20 ggcaccactg accaaactga tctaagtagc agtgggataa catcttgaat cagttctaata 18120
ccaggaaaat gatttttcta cctcctgtc agtcacccaa cctagctgtg agccaaagaa 18180
tgaatccaga gacactgagc cctcacagcc atccttgttt ctcactttct tcagtcagag 18240
25 ccacagtatc tgtctgcagg tctcctctc acatcccaat ctcccagca tccctagtct 18300
gcactcaccg tgggaactaa caagaaatct gctgcaagta tgaccggggg aaaagaatat 18360
30 ctccgacata tgcaaaagaa catcctggtt tagctctagt ggaacctaga atctcaggag 18420
aaaaatatec ccatctccct aaataccatg aacacaaaca aactcatgat gaagtgcca 18480
35 accaaaacc caaatcagga ttttgtgtt tctctacaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 18540
accaaccata aatactttga atattctagc caaacccaca aaagtctca gccctgtttg 18600
tctgagaatt gaatgtaaaa tcaagggtta gtctatcaga atggatctgt actgatgcat 18660
40 gggctctcag cacccaacta cacagagaca aaggcacagg gggaaacttc aactcttgtt 18720
atgtgtctg agagttgtt cctaggcaac tctaaaact atagaatcat tctcccatc 18780
45 cctcaccac aacctacag catacttta ttcaactt atagtctgtg gaggcagaaa 18840
gaaccagcag atgtgtagt gtgtctgggc tgcttttga atccaaagca cacatgaatc 18900
50 taagcacgtt gggctgtcag cgggacagaa aggcacaagc ctgcatgtgt tctgcttga 18960
cccaattcct agccaggtaa gctggcagag gagatggcct agcttaagaa agcagctgat 19020
tcaaagcagt ctctgaagcc ctgtgattga gatcctgcca aatcctgcct ctgcacttga 19080
55 aggcaactgg gttgaaatgc aaagcagagc tgtgccagaa agagactctg ctgagtgcgg 19140
ccgagctttg ggaaggcttc ctggagcaag ctgaaacctg gtaacatcag cctttccttt 19200
cactcctttt accatttatt ttaactgaaa aaaatattat catcagactt catcctaaag 19260
60 gatttgagat tcagttcact gggatgtagg gtgacgacta atctgtctcc tttttgtag 19320
aggaggttgg ttagctatat ccttcctga agtttatgcc aggcagaggt gagatataag 19380
65 tatggcctgt gggttcaagg gactctaaat gacacagtag ccttggtaga aggagacagt 19440

ES 2 652 018 T3

catagtagtt aacagttgac atcacttagt tggaattatt taatgtttgt gggcctgaaa 19500
 5 tctggtttta ttttatttat ttatttattt atttttttgg ttctcactat tctttttttt 19560
 ttttaattttt ttcccacttt ttattaggta ttagctcat ttacatttct aatgctatac 19620
 caaagtcccc catacccacc cactccccct ttttgccct ggtgttcccc tgtactgggg 19680
 10 catgacttct ctgttcctta tttttactcc atgaaaacct ttagagagaa atactgcttt 19740
 cactcttcta tttttaatga aatctcttat ggtccttact ccogtcacaa ggtagtctgt 19800
 ggcaatcaaa gaacttcatt tgagggcaag aagaagaaaa gtagctgcct tagagcacct 19860
 15 tacgtcttgt acggaatgca gggcagacaa gtggcttcat gtttcatgag gttattcggg 19920
 tttggcctga gatttactag cttaaaagat ccatttttagc cagatatggt ggcattgtgc 19980
 20 tagtcctagc acttgggagg cagaagtaag tggatctctg agttcagcgc cagcctgggc 20040
 taaaaagcag tttcagaaca cctaggacta cacagctgtt ctgaaatcat gtctcaannn 20100
 25 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 20160
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnntga tggccggctc aactatgaat 20220
 atcctcccat ccctcaccac aacactacag catactttaa ttcaacactt atagtctgtg 20280
 30 aggcagaaaag aaccagcaga tgtggtagtg tgtctgggct gctttggaat ccaaagcaca 20340
 catgaatcta agcacgtggg ctgtcagcgg gacagaaaag cacaagcctg catgtgttct 20400
 gcttggaacc aattcctagc caggtaagct ggcagaggag atggcctagc ttaagaaagc 20460
 35 agctgattca aagcagtctc tgaagccctg tgattgagat cctgccaat cctgcctctg 20520
 cacttgaagg caactgggtt gaatgcaaag cagagctgtg ccagaaagag actctgtctga 20580
 40 gtgcggccga gcttgggaag gcttcctgga gcaagctgaa acctggtaac atcagccttt 20640
 cctttcactc cttttaccat ttattttaac tgaaaaaat attatcatca gacttcatcc 20700
 taaaggattt gagattcagt tcaactgggat gtagggtagc gactaatctg tctccttttt 20760
 45 gttagaggag gttggttagc tatatccttc cctgaagttt atgccaggca gaggtgagat 20820
 ataagtatgg cctgtgggtt caagggactc taaatgacac agtagccttg gtagaaggag 20880
 50 acagtcatag tagttaacag ttgacatcac ttagttggaa ttatttaatg tttgtgggcc 20940
 tgaaatctgg ttttatttta tttatttatt tatttatttt tttggttctc actattcttt 21000
 55 ttttttttaa ttttttccc actttttatt aggtatttag ctcatttaca tttctaatgc 21060
 tataccaaaa gtccccata cccaccact ccccctttt ggccctggtg tccccctgta 21120
 ctggggcatg acttctctgt tccttatttt tactccaatg aaaaccttta gagagaaata 21180
 60 ctgctttcac tcttctattt ttaatgaaat ctcttatggt ccttactccc gtcacaagggt 21240
 agtctgtggc aatcaaaaag aacttcattt gagggcaaaag aagaagaaaa gtagctgcct 21300
 65 tagagcacct tacgtcttgt acggaatgca gggcagacaa gtggcttcat gtttcatgag 21360
 gttattcggg tttggcctga gatttactag cttaaaagat ccatttttagc cagatatggt 21420

ES 2 652 018 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

ggcattgtgc tagtcttagc acttgggagg cagaagtaag tggatctctg agttcaaggc 21480
 cagcctgggc tacaaagcaa gtttcagaac acctaggact acacagctgt tctgaaatca 21540
 tgtctcaaaa accatgatgg ggatgggggg tcttgagatt gggagttgtg ttttcaacta 21600
 gctattcctg acacacttca cattcagatt aactcttata agagctatgt cctgtggaac 21660
 tgatggattt agaaatccta accagggttt cacatacaag ccccaggaac aggactactt 21720
 gcattgtcaa atgtcagaaa acctcacaga aactgaagca caacggagct aggtggctcc 21780
 ttatagtaga cgcagacctg ctgaccacta gctgccctgg atatttgcac catcctaaga 21840
 cttacttttt aaaactgaca cagttagtca cataaagtgc acttgatgtc ttogctggta 21900
 taggtttttg ttgttgttgt tgttgtttta ttttgttttt atctttttta ttagatattt 21960
 tctttattta cattttaaat gctatcccga aagttcccta taaccctgc gccctaccc 22020
 acccactccc acttcttggc cctggcattc cctgtactg gggcatataa agtttgcaag 22080
 accaaagggc ctctcttccc aatgatggac tactaggcca tcttctgcta catatgcagc 22140
 tagagacacg agttctgggg atactgatta gttcatattg ttgttccacc tatagggttg 22200
 cagacccctt cagctccttg ggtactttct ctagctctc cattgggggc cctgtgttcc 22260
 atccaatagt taactgtgag catccacttc tgtatttgc aggcactggc ctagcctcac 22320
 acgagacagc tatatcaggg ttctttcagc aaaatcttgc tggcatgtgc aatagaatgc 22380
 ccagtgtctt ggacaatttg ggtagaactt tttagttcac actcagtttg aatgtcagaa 22440
 tcattcaatg actcacctgt ctctgactgt tcgctgtcac agcatggtgc acaagcctgc 22500
 acaagcatac tttatcttaa ccttagcttt tctctactta ctccctctgt gatagcggag 22560
 gcttcttcc acccaagggc tcgcagcttt taagaatctc agccggaatg taagcaacag 22620
 ttccctgect ctaattctga attctctctt gtgttaatct caagtgtatt caaacagctg 22680
 atgagcagct gtctcaatgg cctgattct atgtgagtcc ctagtaccaa ataactagcc 22740
 tgagaaacag ctgttaagga actgtaaagc cagctgactt cagggtctc catgocctcc 22800
 tttcaggccc tgocctcccc ccagcctggg ttttcattgc ccaactgcgc cagcacatcc 22860
 tgccagtgga aaactctcat ccgcatctag cttgccagca ccagcactg tgocctgocca 22920
 gagtcactcc tgtcaactctg tgtgtctgtc tgtctgagtg tgtacatgtt catatgtgtg 22980
 cacaaatgtg tgtgtttgta tatgttcata taagatgtac atgcttgtgc acagatgtgt 23040
 gtttatatgt atgtcatgta gaaggccgag gctgggtgtca tctttcattg tttcccacct 23100
 cttgatgttt aagatagagt ctctcactga acctggagcc ttgcccatt ggctagacta 23160
 gctggccaag caagctgga ggatactct gtctacctcc ctagcactga ggttccatgc 23220
 gcttctcatg cagtgttcc atgggttctt ggcataat tcaggtcatc atgtttgcac 23280
 agcatgccac tgactgaagc atcttgcagg cccctacttt aaccttcttt cctaaccaca 23340

ES 2 652 018 T3

gttaccatga ctttgcattc tcttcacctg taaacctctc tctcaactga aacaggctag 23400
 taaataaagc aaagagagga agaattatcc cacctgtggt tatcaatcat cacatcacta 23460
 5 tggcaaacac atgagagaaa caacttaaag gaggaggggt tactgtaccc cccacatcat 23520
 agagggctca gtccgcggtg gcctgaatat gctgctatcg gcccgaggag ggcagaaaat 23580
 10 agtggaggca ataacatgta caactctggc tactcagttg atactgtcaa ggaaaaagag 23640
 agctagtcac ggggaggggc ttggaaggag ataacactat ccaaattcac accctcagtg 23700
 tctgtcttcc tccagccagc ccacctctcg ttttctacca ctoccaatag tgccatcaa 23760
 15 ttgtgattcc atcaatgatt aatccagtgga ttgggtcact gagaaattat tgggtccacc 23820
 agctgagaac gtacagcatg tacactcaat aacagaagt ttgtatttta ggcagaagta 23880
 ccatataggc tectgacaat cttcagattc taataacact ggccatagat gggaggtttc 23940
 20 taagaactgg tcttgctgaa gtgttacatt tttatcttat aagatacttg tgtcttagct 24000
 tagtgaatct ggctgccaga taccttactt tgactaaagc atagtctcgg gaacgattaa 24060
 25 tctttttttt tttttttttt taccctocat ttcagaattg ctcatgaatg gaccagggaa 24120
 tggaaagaat gccctgatta tgtctctgct ggaaaaaaca gctgttactt caactcatca 24180
 30 tatacctcca tttggatacc ctactgcac aagctaacta caaatgggga tttgctggac 24240
 caaaaatggt tcaactgtga cgaaataggt aagccgtggg ttgctttcat ttgacaaagc 24300
 tttagactaa atattaagga agccccaatt tccaagtata atcaagtaga aagactttgt 24360
 35 ggttttaggt atatggagtc tgtctcacag gagtctaaaa gaatagagtc taaaaataca 24420
 ggtaacttga ttccagctta aagaagcctg acaatggaac tagagaaatg cccagtgcat 24480
 40 aagagcattg actgctctcc ggaggaccca ggattgtttc ccaccccta catagtagct 24540
 aacaacaatc ttgaatctag ggtatctgat accttcttgt ggctccaaac acaaacacat 24600
 agtacacaga catgcatgca gacaaaacac ccatgcaaat aaaatacaca aatttttaag 24660
 45 ttgaaaaagt agatacctgg tagtagatgc tatgaagaaa ttcatacagg gctaagagat 24720
 ggctctaaag ttaagagcac ttgctgcttt tccaggggac ctgtcatcca tgtggaggct 24780
 50 cacaaccacc tgtgtaactc tagtttcatg aaccttcaa cctctgtgat atcaggtata 24840
 cacatgggac acacacataa aagcaggcca tacaatagaa tctaagcta gattctcatg 24900
 atcacaaaac aaaacaacca tggccacaaa acaaaattta ccaaacagtc ataacaggt 24960
 55 caaagtgtg tttatatgac ctcaaacaaa cattgatgaa tatttgctcg ggaaaacatg 25020
 tcagagagcc atgtggatga tttttttgct tccatcctg tgaacataaa gaggaactga 25080
 aacaagtaac cataactagg atgtccgtgt ttacagtatg attatacaaa cagcaaaggg 25140
 60 aaagaaagca acaaaggggt ttcagtagct gaccaggggt cttaagatc tatccacaag 25200
 atcccatttt tectcacgtg aactgtccct tctggcagac aagtgttatt tcttgggcag 25260
 65 caacagcctg gaagacagtg gggaaatgtg ctgactgctg cagacagata gcaagcaaac 25320

ES 2 652 018 T3

catggaagtg tgctttccag agagaggggc gagaaaactc atgggttcta gaggctactt 25380
 atttattggc ctctcccaa ctgcagagct gaagctagac aaggaagtgg tggattagtt 25440
 5 gtaaggacac tggtttaaga gccatgcttt gtccctgcoct ctatctgact ctcaactgagc 25500
 tcttgcatac ctgogactat actgtatgat acagtcgagt agtggaaattt ggcagttcaa 25560
 10 aaaaaatctc agtacagtgt accataacac agtatgggtg gtccctggact tgaggtggtt 25620
 ggatacataa aaaaacaaag tagtgaccaa atgcatgaat gacctgctat gcctgtagga 25680
 ttaagaggag ccagatgaac caaactgtaa cagttcagtt aactcataaa atgtgaatga 25740
 15 tatttaccaa gagtcacaga ccttcagaa actactcagt tctaatttg gtaaaagaaa 25800
 aaaaaaaaaag aaaagaaag aaaggaaag aaaggaaag aaaggaaaag aaaagaaaag 25860
 20 aaaagaaaag aaaagaaaag gaaaggaaag gagaggaaag gaaagaaaag aaaaaagaaa 25920
 gaaaagagaa aagaaaannnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 25980
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnatt 26040
 25 gtcaggatat caccagttca gctcacatgg atcaatagcg gtagttcaat ccaactcacia 26100
 accccattca gaaaccagct atggcagttc tatgcagaag aaacccccag gctctgccac 26160
 30 tcggccaag tcttagctgc agaagcagga agaagccacc agaacaccac cagaagtact 26220
 ttggtgcatt tttctctatg aagtcatgac aaacaatgac cagcaaagaa tggcaaggag 26280
 aaccaatgcc atatagtgc gaccactgic tgggtggacc tttccaaata gaatatgttc 26340
 35 tctcaagcat aactctaac aaaacatcac atgccccttt tctaggtgc ttccagaaaa 26400
 acatcctatg tccgttctta gcaacacatc ctccacatg tctcattcag taaaaacaca 26460
 40 ctctcataac atagtttcca gaaaaacatc atatgacaca actgagtctc caaagaaacc 26520
 agaaatttcc acttcaaaga catgtagtgt gtaggagtca ggagcagact gctatatattt 26580
 45 tgatagaggg tctgagcctc ctctataaa tgctatgtat cacatctatt taaagtagaa 26640
 atggaaattt ctataaataa acatgagtga tgaatttcag aaaattttcc atcaaaaaaca 26700
 tttttaaagc cccaggtata ttgagataac tgtaatccca gcaactgtga ggctgaattg 26760
 50 ggatcatcaa ctttaaggcta cataatgaaa tcctttctca aaaatgtata tatactatac 26820
 atgtgtatat agataggcag atgtggactg gagaggtggg ccagctattg agagtatttt 26880
 55 ctactgtata actccacttt agaggatttc caataccctc ttctggcctc tgaaggcatt 26940
 cattcaggtg gtatatatgt gtacatacag ataaacactc atacacatta aataaaaaaac 27000
 ttaaaagtat gaggaaagag atgttcatgg ggtagaaaa ggaatcataa aggaacagga 27060
 60 gagtatctta tgggaggagg acaaaaagga gacagtggaa caggaaagca gaagtagaga 27120
 ttatggtcat ggaggaaggg aactagcaaa tggaagactc taggaagtga agtaacctaa 27180
 65 tgaaggtgca agatgaataa aaacaatgta tattaatata tacatgtgaa aatatcataa 27240

ES 2 652 018 T3

tgaatgcccc actttctatg ctcaactttaa aaagctaatt gaaatgcaca tacacattca 27300
 aaactagtc cttaaaaagt taagctttct atgggtgttt tgttcccatt tctaagaaag 27360
 5 ggtaaagtgt ccacactttg gtggtcttcg ttcttcttga atttcatgcg tttggcaagt 27420
 tgtatcttat atcttgggta tectaagttt ctgggctatt gtccacttat cagtgagtac 27480
 atattgtgcg agttcctttg tgattgggtt acttcattca ggatgatacc ctccaggtcc 27540
 10 atccatttgc cttaggaattt cataaattca ttttttaata gctgagtagt attccattgt 27600
 gtaaagtac cacatthttct gtatccattc ctctgtgag gggcatctgg gttctttcca 27660
 15 gcttctggct attataaaca aggctgctat gaacatagtg gagcatgtgt tcttcttacc 27720
 ggttgggaca tcttctggat atatggccag gagaggtatt tcgggatcct ctggtagtac 27780
 tatgtccaat tttctgagga accgccagac tgatttccag agtggttgta caagcttgca 27840
 20 atcccaccaa caatggagga gtgttccctt ttctccacat cctcgccaac atctgctgtc 27900
 acctgagttt ttgatcttag ccattctgac tggagtgaag tggaatctca gggttgtttt 27960
 25 gatttgcatt tccctgatga ttaaggatgt tgaacatttt tttcaggtgc ttctctgccc 28020
 ttgggtatcc ctccaggtgag aattctttgt ccagctctga gccccatttt ttaatgggggt 28080
 tatttgattt tctggagtcc accttcttga gttctttata tatattggat attagtcccc 28140
 30 tatccgattg ggataggtaa agatcctttc ccaatctgtt ggtggctctt tgtcttattg 28200
 accggtgtctt ttgccttgca gaagctttag agtttcatga ggtcccattg tcaattctcg 28260
 35 atcttacagc acaagccatg ctgttctgtt caggaatttt tccccctgtg cccatatctt 28320
 caaggtcttt cctactttc tectctataa gtttcaggtc tcggttttat gtggagtctc 28380
 40 ttaatccact tagattgacc ttagtacaag gagatagaaa tggatcaatt cgcattcttc 28440
 tacatgataa ccgccagttg tgccagcacc attgttgaaa atgctgtctt ttttccactg 28500
 gatggtttta gtcoccttgt caaagatcaa gtgaccattt ggagctgtga cgaaggatg 28560
 45 gaccatctag tgactgccc atgcagggat ccaccccata atcagcatcc aaacgctgac 28620
 accattgcat acaactagcaa gatttctctg aaaggaccca gttatagctc tctcttctga 28680
 50 gactatgccg gggcctagca aacacagaag tggatgatca cagtcagcta ttggatgggt 28740
 cacaaggccc ctaatggagg agctagagaa attacccaag gagctatagg gaactgcaac 28800
 cctatagggt gaacaacaat atgaactaac cagtaccggg gagctcttgt ctttagctgc 28860
 55 atatgtatca aaagatggcc tagtcggcca tcaactgcaa gagaggtcca ttggacttgc 28920
 aaactttata tgccccaggt acaggggaac gccagggcca aaaaggggga gtgggtgggt 28980
 60 aggggattgg ggaggtgggt atgggggacc tttgggatag cattgaaaat gtaaagagg 29040
 aaaataccta attaaaaaaaa aaagttaagc ttatggttat tctcaattc ctaacaaatc 29100
 caggacaaag taatactgct attgtatagg actatgaagc tcgaatatcc ttcacattta 29160
 65 atttctaaaa tgtattcatg aatagatgta gttaaatatt ttaaatgagg aaaatcttcc 29220

ES 2 652 018 T3

ttatctctta aatgggggta gggggagggtg tatgtaacag tggccgaaac ataccccttc 29280
 attataggtc tgtgtctact ctgagtcfaat gcctctctgg tgaattctag ggatccaaac 29340
 5 tttctaagta gctatgtgca tatgttaaga aataaattaa gttttaattc tgtaccttca 29400
 agtagtttca aaaggcttgg taataagccc tatctagtaa cactttgctt gagacatggc 29460
 10 aaaatttaga tataaattgt agctttggga tctataattg actttatcat ctttcttgaa 29520
 accctagtct ttatggccct cataagaata cagagatata tctaagaata tgatagagga 29580
 ttactagcag aaactgagca aaatgcaatt tcgaattgct cacttgacag ctgagcagag 29640
 15 agagtaagca ctaaattctc tgcttctgt aacaggccat atttaaaaag tgaagtcttt 29700
 ctaactctct acttctttgg tttttgattt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtctgtgt 29760
 20 gtctgtcaaa atcctaaagt acaaatgcta tcagagctaa aaataaatac gtagcacaac 29820
 aactcttcca atgaatttca gatttgagac taaaagggaa ttagaggaga ttttataagt 29880
 25 atttttttaa atgaaacatc attcttacct ttaaaaatgt tgctctgtta taaagtagag 29940
 ttcaatcgat gtggattgtc ggaagaatta ggagtgtggt cagagtgtgg tcaaaatgaa 30000
 tgaaatgatt tggctctga aggaagcaga ctatcactat caagagtgtt tctctggagt 30060
 30 ctaatcaatt ctocattgaa ttcacagtgc aacctgatcc acccattggc ctcaactgga 30120
 ctttactaaa cattagtttg accgggattc gtggagacat ccaagtgagt tggcaaccac 30180
 35 caccoaatgc agatgttctg aagggatgga taattctgga gtatgaaatt cagtacaaag 30240
 aagtaaatga atcaaaatgg aaagtggtaa gagtcactcc attctataca ttgacttttc 30300
 ttctttctaa ttcaatactc actttcttat ttgtaataac actttctttt caoctaggac 30360
 40 tatatttcca aattatgtgc cctataactt gttattagag gaagactgat ataatctcaa 30420
 taccttaaaa gtatctaaga caacaaatgc tgatgtgaat cttccatgta gatatatgga 30480
 45 agagtattgg gaggagaaaa ccatttcctt agttatcttt ggtgttcagt ttaacctagg 30540
 aacaaggtca cagacttacc actttgctat ctttagagat gtggttgaac ttaactagga 30600
 50 tcatgatcaa ggtcaagagt aggctatggc caaatgttat cccatgactt taatgactgc 30660
 tactcataag acctatatta gtatttgttc ttggttctct ccagaagaga ggcaaaaaga 30720
 aggaatttaa tctatagagg tttcataaag atgttctttt acatacctca gagaaaatca 30780
 55 agctgagagg ccacttcata agggagaaga gagcaaattg gcccgcaaac ctctcacttc 30840
 cctgccaagc acttggaac tcggcactga gataaattct acatggcaca caacaagaag 30900
 60 ggaaacagga ttacctgac attccaata taactaatc taaatcagtc taaccacagc 30960
 cacagccctg gccaaagtcaa gcagcttctc gataggcatg acgttgacc cagcaccctg 31020
 gcagggtcta ctccccaaat tttgagacat gaggcctgt ctattcagtg tagcaccaaa 31080
 65 aatgaagcca attttgtcat tagcagagaa tacaacttgg ggtgcctcga acagctactt 31140

ES 2 652 018 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

cttctgttca aagttctggt ttctaaatca ttctaattta gatatctggt ttatgacttg 31200
 gtacccaaaag gggcctggct ggatgttaat tcaaacaagg ctttctaaac cgagtcataa 31260
 tcaaacactt attcgcccac caaatatagg aacaactact ttgcacaagg taccaagggc 31320
 acctgaggta gcagttttga aatgagaaa catgtacctc tgaggactct tgagaccatc 31380
 tcaagggagc atatgaggtc aacactaatt tcacactaat aacatgtttg ttccctagtt 31440
 caaaaacagt ggtaagaaaa ctactgctc gtggcatgaa tcaagtccgc aatcccattg 31500
 ttacagtta cattgtgaag ctacattaa aggctggggc tgtttctag gagcctctgc 31560
 ttaaatctca gccttggagt gtattgctgt cccagctcct gtggcacatg gagagtacac 31620
 actgtactca tctacattcc aaggtaatga aggatcaaaa cacttaaatg cttcagcaac 31680
 cagaccagca gctcttttgt atgaagcaca aatthtatac gaaggacaaa acacatacta 31740
 gtagataatc acttatattt gaattgacaa agatttctca aggaaacatt tgttcttcca 31800
 gtgaacatct gacaaggttt gcaccagggg tgtaacctc caggcagaat agagttttta 31860
 acaatgtata tctacaacca taatttgcct tccaacgtag taagacttac cccaaaagga 31920
 tccatttga tattagcaaa aatggtggtt ttatgttaga taataaaatc tgtgaagact 31980
 tctgatgctt acatctcagt aaactagatt aatattttt tcaaatagcc tgagagtaat 32040
 taaactaatc acataatcat atattatgta aaattatcat taattatcat gttaatgatg 32100
 ttttgaata tttatatgtg gtaagatggt tcagcagagc tatgaatgga tatatttttc 32160
 acagatgtht ttgaactgac agtttcaaat ctgctctctt gtatattcca aaatatccct 32220
 tttttttct acccatttgt tcatcaaagg gcccagttg atccatattt tggctacagt 32280
 tatcatgatc aggcaaatgt atctttaaaca tattaatctt atttcttgg gatataaatt 32340
 attaataaaa aaatcactgg atcatatggt aactttagtt ttcattattg agtagcctct 32400
 atactctttt cagttgttac tgtgccaatt tttatttcaa taaacaagtt agaaaagcca 32460
 tcaacaatct caccctgcta tgaattctc aagatactgg tcaggaaaca agcccactga 32520
 ttgtagtatg aatactacag gaattactac ctactttcta gttagtttta aagccttcca 32580
 cacaagatgg aaccataacc tgacatcatt aactgggcca aaacaacatg gctggctagg 32640
 ttataagccc tataggagaa atcaatagat agacatagta gtttaattgcc tcccccaagt 32700
 tattaacact ctactcataa attaatacac ctctgacctc tcattggaga agcttctctt 32760
 ttcaacagag agtagttaat acagagaacc tcattcagtc agtatgcaga gcaactcaaca 32820
 ctgaatggaa tatccatato ctaccactc cccccaagat taaaaggtha ttgaggaaga 32880
 aatattagaa gtgtctaaag gcctcaatgg ctatagagaa actatttact ggccacagac 32940
 atgcagttac acacacagtt gctggaagtg catgagtaga aggtttacac aagatcatgg 33000
 cagccaaatc ccagcatgtht tetgggagag ccttaggagc ctctccctg cctgagaagc 33060
 tcttgacatt gtcagagcta ctgggaagct gggagagact ggatttcttc agggatgtga 33120

ES 2 652 018 T3

5 gacctgagag gcattccatg ctccagcagg tggccccaca cctatgcaca taaaagcagt 33180
 aaacactgag tatttttaaaa gagagagaga gagagaaaga gagcagagcc agaacttgtg 33240
 10 tgcctactct aagttgggga agaaaagtac tggataatta aggaaaagaa tgggaggtgg 33300
 gaggtggatt tgatcaaaca tagacattta tgaatactaa atataatfff tctcatttta 33360
 15 tattagttgg ccattaaaag ccaagtttac aattaaataa aatattttta aaatatcttt 33420
 tctgtcaatc cttttcagta tgtttctagt ttcacctgtt tctgctctga cacttgccac 33480
 cccctccctt gcttcagtct cctttgagat ctgttttgac ttttactagt tccctagaggt 33540
 20 atagtgattg gtccctgtct ggtgcagtta aaggttcctt cagaaaactg aaagatagta 33600
 gagaaagaca gagatgggag gggtcatagg ttgacttccg gggttcccta tggattatgt 33660
 acaatgtag tgaaatcttt cactaatacc gatgacagtg gctgagaaac caagtcttgc 33720
 25 tccaagcgtg aaacccaagt ttaaaaatga ctcaataaaa aacaagaaag tgtaaaatc 33780
 agagtccctag tctaaagaaa acattttaaa catacaaac ctggatata tccagaggctc 33840
 ctgtcaggag gcacaccctt atcatatgag catggcgggg aaaaaatact tgtgcataga 33900
 aaccaagtgg agtgaaaaac aatttgtttc agatggtgag gtccagctcc taataaaaca 33960
 30 aataatgggg tttatcgatg tgaaaatcta tgctgctgaa aaggtgaaga ttccactttg 34020
 ttcttattaa caggaactag gagtccact cataacatat aaaaaacata ttgagacca 34080
 cgagcatgag tgtttgacac agagcagtg ttttcaatgt tccctaatgct gcacagctcc 34140
 35 tcatgtgtgg tgacccccaa agatagaatt actttgttgc tattccatga gtgtaatgtt 34200
 gctactgctt tgacttgtaa tgtaaatac actgacttac tggaaaggac tgtgataatg 34260
 40 cagaccttgg gtctgcctct ctaatagcaa tatcttatag agctaatect cctacgctca 34320
 ettcccttgt ctggagaaag ggactatcct aagtttcaaa tctgtgaaac acagatgttc 34380
 45 agtgtcagg gtctccagtg attttctgtc atgtgcattt tccctggggag atgtgaccat 34440
 ctagtccctc tagacagagt accaacaaca gatcaaccaa actgtcccac ccacttctag 34500
 gttacagaac cagtgaggtg atccactgtc gaaaggagaa cacatgaggt ttacttacag 34560
 50 gtgggctgag agtgactcac tgcagccca caagcaggag gatgagcaa ggnnnnnnnn 34620
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 34680
 55 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnatccgtgt ctgcgattga tcacactcca 34740
 gccaccaag caggcaggat gactcaciaa ggttaccttc ctggtgctgc ctacagagtt 34800
 cacaggaaga tcagctgac agacagctc ctctcctcag caacagttct gtaacttgacc 34860
 60 ttgtggaagg cccttgtgag tttattcagg tttctgaaac ctccagcctt ctgagctata 34920
 ctgacttctt aagtctgaag attcttccag aaaagtgttt ctgttctgag gacatagcta 34980
 65 cctcacaatt ttctatggac attcttgagc aacagactac tctgaggcaa gtttaagact 35040

tcoggagtaa ataaagtgtg tagctgcttt caataaaagt ctttggcagt tcaagacaac 35100
 tatgggtattt tgaggactgt ttcaaattct gtgattatca ataatgact tctgcccaga 35160
 5 tttcccaggg aatacatatg ctacagataa atgatttgct tgtggccata atttgttttg 35220
 gtgtggaaat atgaggtttc ctgtcctaet atatcactcc atacaaaact ataatacccc 35280
 10 agataaatag cataccaata tacctcttac agatctgcca tgcoctaattc tattaogact 35340
 tactcttagt tgactattta agaccaaatg caaacatatg gctgcatttt tgatactaaa 35400
 ataaatttga ggattattat ttttaacaaa ttatttacat aatttgtctc agtccatctt 35460
 15 atttaatagc caattccttc taggtagggt caaatattac tcactttcta gaaaccaggt 35520
 tcaaagagaa aaggaaaaac acttgtagaa tctgtgcatt gagttgttaa tgcoctgagge 35580
 20 aatctgtttt ttattttggt ttgaaagatg ggcctatat ggtaacata ctgtccagtg 35640
 tactcattga gaatggataa agaacatgaa gtgcgggtga gatccagaca acggagcttt 35700
 gaaaagtaca gcgagttcag cgaagtctc cgtgtaatat ttctcagac gaacatattg 35760
 25 gaagcatgtg aagaaggtag tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 35820
 tgtgtgogtg cgtgogtgog cgcgcgcgca tctaaatgac agctagcatg acttttggca 35880
 30 atatatgcta acatatgcoct ccacttgta gtatattgtc taggtcaata tactgtagtt 35940
 tcacatatca ggggcaagac attgaagtca ctatctggag aagatgtatg caatgaaaag 36000
 gaaacaaaaa gaggggctgg agatatggct cagtggtaa gagcacttcc tgttcttcta 36060
 35 caggaaccaa gtccaattct cagcaccac atcaagagat tgacaaccac ctgtatcacc 36120
 agcttcagag gatccgccat ccctagcctt gtgggcacct gcattcatat gcacatacat 36180
 gcatacgcac aattcaaaaat aataaaataa aattttaaaa attaacaaca gaatttgttt 36240
 40 ccaaattatt tgatttagga aaggtatcag ggcaggtgga aactcagaga gggatatacga 36300
 tggttgtccc tgaacaacag aatttctggg gagttgggtt tttttttct ttgtatgtct 36360
 45 ctacattccc aatttttttc ttcaatgtgg gtgttttgaa ttttatcca gaagaaacaa 36420
 atttatctga ggtttgaaga aggaaatgtg atactcatgg gattggagga gtacaggtgt 36480
 50 ggtgtttact tagagaatgc ctagctggaa gtataggaag tcatgtgttg gtcacattct 36540
 ggggacacgg gacacacttg gaactcctac acaggagaac aacagagatg atgcagggtt 36600
 tctccgtgtc tgtattaaaa agtagttaga ctctgcctct gtgtaagaa tattgggaaa 36660
 55 cgacctcaag ggaactgggg ggacatttag tctaaggaa aaagatagaa gtgtcataga 36720
 caaattctcc cacagctcat aaagtacaga agtatctgaa cagcctcagc acaggtgaca 36780
 60 caaacacaca gtattaaact ataaaaacgt gctctacatg cctaggtata gcacgggtgac 36840
 tctagcctca taactttgat atatcctcaa tgtggaaact gacagatata attatgtctt 36900
 aaagtattag atggacatcc tttacttagg ttttaacaaac aacagttttt ttgttttttt 36960
 65 ttttttttcc tgggtgctaaa gcctgggtga tattccacag acatttggac atatgagaag 37020

cttagagggt tcagggtttt gcaatgtggt tgaacttgc gcttttcatt ttgagttttt 37080
 ctttttataa taattttact ttttaaatata taatataatt acattgtctc ccttcagtt 37140
 5 ttcttcttc aacccccacc atgtaccgtc acgaccatag gatggccatc acctcacttt 37200
 ctcttaaatt tttggcgtct tattctttaa ctgtttatat atatatataa aacatatatt 37260
 10 tatatatatt aatatgtta tatatgtata tttacacata taaaatataat gtatacacat 37320
 gtgcttaaca tgtatataca tataggtaga tgtatacata tatacacgta tatatatata 37380
 tgtatatata tatatatatg tgtgtgtgtg tttacatata tgtattttaa aacagtttaa 37440
 15 gaaaaagaga ccaaaaattt gagggaaagt gaggaagtga tcatcatcat atatatgtat 37500
 atatgtgtga catatatatg cttaaacta tatctacata tatagataga tagatataga 37560
 20 ttaagcagt ggacaagcat gctgtatgct taggaaagaa aatccgaag ccatcctact 37620
 gtgtttccat ggttatgaag ttgaaacttt gccatatgaa ttcagattaa tggatatttt 37680
 caagtgggga aggacagtc cttgtaaact ttgcttgggt tattcatagt tctgtcagtg 37740
 25 aaatattctt tctgtttta gatatccagt ttccatggtt ctttaattatt atctttggaa 37800
 tatttgaggt agcagtgatg ctattttagt ttatattttc aaagcagcaa aggtaggtgt 37860
 30 gaagcactct cttaaatatg tttttacaag ttctcatttc catgtgtact ctogtgtgtt 37920
 attgaaatg ttctcttgta cagcacaagt ggctatctta attaactcag aaaagtttaa 37980
 35 tttctgggtt tacctttacc acatctgtac tcagtctgtt gtctgtcgtg tttacctttt 38040
 tttaaaaaat ggatgattta aatcaggaag tttaggcaca tctgtcata ctaaggcatc 38100
 atttcacgga catttttgtc agtcttgttt ggttctatcc tagcctctct gagtctgtgg 38160
 40 attttaacat gattatcctt tactttatat taatatccac tcataagtga gttcatacta 38220
 cgtttgtctt tctgggtgtg ggttacctca ctcaggatga tgtttttcta gttccatcca 38280
 45 tttgectgaa attttcatga tgtcattggt tttagcagct gagcaatata ctccattgta 38340
 tgaatgtacc acattttctt tattaattct tctgtggaag gagccttcaa agtctaaaaa 38400
 aaaaaaatta tattgtattc tcttggagtc tagagtctac agctattcag cactgccat 38460
 50 ttgaaacttc ttgtaccacc taacctctct gaaaatctac atctgtgtgc tcaacaggat 38520
 cttctaaatc actttgaata acaaaatgcc atttttctc ttggaaaaaa acttagattg 38580
 55 cagaaaatgt tttatgcagc atgctgcggg gggcgggggg cgtgggacat tgctatcatt 38640
 tggcctttgt ttgcacttaa catagtttca acaccatttg tgatcatgag ctttctagga 38700
 ataccacttt caagattcca gaattcagtt ggtctttgca ctataagccc tgtgtgtcct 38760
 60 gggagttcc tcagttctgg gccaccaata gttggttggc ctatctaaac ttgaaatcaa 38820
 gctgttcaac tgaagtcaag aggcacttag tgactcaaaa tggaatgtag gaacaaatat 38880
 65 atggtatagg cctttagttg ttgtagtaat ccagcattca cacatctcaa aattagccat 38940

ES 2 652 018 T3

5 ttaataaaaa atgtgcagaa gaaattcagg taatgccatc aaccttcaac tgaataaaact 39000
 tcattttcat cagggtttca ccatcaatat cataaataaa tgagggggaa aaaactcgct 39060
 gcataatfff attttgaact tagcttttta gccacattct tgtttttgca gaacatatac 39120
 tacagttgaa acaacaggggt tttcagttgt ttgaggaaag taaatttatc tttagagttt 39180
 10 taagtaagac atgagcttga ataaggocaa ccagagtcaa attaattgat tttagttcat 39240
 tagtctatag agctagtgaa attgcaaatt ttatatggaa ctgtagtaaa taaaattgct 39300
 ttgtacataa aactattcac cctaataccg ttcatttcat gtcacaaagg ccggaccgag 39360
 15 tgatgatctc nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 39420
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn agtaatgagc 39480
 cggaccata gcagcataga gtggatagca tagtcagaca gctggcttgg agcatcactc 39540
 20 tgggectgaa ggcagccac caagggtctg tataatggag agcacagata atatcatctc 39600
 cctttcctgg tgtgtaagga ttgatgaaag ttaatgcaa gagccgatca tctgatctat 39660
 25 aaataatcat gtggtgaggt tttagggacc atatctgtat cacaactgtt ccaatgacgt 39720
 atagaagcat tcagagataa tgtgttgggt ttaaggataa acaactggta gctagtaaca 39780
 30 gaaagatggt ttatgtaaat ttattcaaga aatgttatgg aacaacttcc atgtgctaag 39840
 taatataatt ccaacaagag acaaatctgt agaataaaca ttgaaattaa ctacagtcaa 39900
 aaacaattat ttcagggctg aaagcagtag ttcagcaagt gagagtgtat agcgcctctg 39960
 35 tagaggagtc aagttcaatt cccagcacct atatgggggtg gctcacatct gctgtaacce 40020
 tagctctctc gccctccta ggtacctact cattcatggg atataatcac agaaggacac 40080
 40 ataaaataaa aataaaatga taaatcttga gggcggttac atggaagagg ctttatttag 40140
 agagggcaac tgggagtggc tatagaaaag aaaggagata attcaatttc agttaaaaat 40200
 attagtaata gattttttaa agaaaaaata atttcaatat ttgaaagaga aaatgtcaat 40260
 45 acatcttggg attatgcata caattctacc cttattagag atgattcagg ttagtctgtc 40320
 ctattttaag taatacaggc actatcatgt tggctagaag ttatcatcaa tgctttttgg 40380
 ttactatgga ctgtgtagtg cttagcccag tgtagtgtt agcccaacce atttttttca 40440
 50 agtttgaaaa taattttggt tccattttat tgattgtctt gttttctatt tgggtttaca 40500
 tgctttaaaa gtatcttatt tgtatcttat ttataagtta catgaaagct ggcttttagac 40560
 55 agaattagac tctcactgc caagtactaa aattgaccac tcatcaatag cactaaaaaa 40620
 aaaaaagag ttaaaccatg acttagctaa atgatcttaa acgaaggcct ttgggtgatg 40680
 tttttctcct gaaacttttg ccacctactt cctgcttaga actctccctc tcttttgaat 40740
 60 attctgttta tacaagatat aagaatgocct agaataagtg atagtactgg caatatttca 40800
 ttctaccttt ttgagataat ttttaagatg taaaataaag atgtagaaat aacactttat 40860
 65 ttgtttccaa ggattaagat gctgatttta cccccagtcc cagttccaaa gattaaaggg 40920

ES 2 652 018 T3

attgatccag atcttctcaa ggtaactaag tctacattgt ggatcattca attaagtagt 40980
 acctaaagaa tactatctat cttctgttgg gaggggtggg ggtggttggg tggttgggtg 41040
 5 ggtttgttgt tgactttggg ttttttgggt tttggagtgt tttgattttt ttgtgtttgg 41100
 ttagttgggt tggtttagtt tgaaatcaca atgcatccta tctaaagtta tataatgggt 41160
 10 ttttgagttg cttttcatag atctccactt tctctctgcc tcttaggaag ggaagttgga 41220
 ggaggtgaac accatcttag gcattcatga taactacaaa cccgacttct acaatgatga 41280
 ttctctgggtc gagttcattg agctagatat tgatgaagca gatgtggatg agaagactga 41340
 15 agggctctgac acagacagac ttctaagcaa tgatcatgag aaatcagctg gtatccttgg 41400
 agcaaaggat gatgattctg ggcgtaccag ctgttacgac cctgacattt tggatactga 41460
 20 tttccatacc agtgacatgt gtgatggtac cttgaagttt gctcagtcac agaagttaaa 41520
 tatggaagct gatctcttgt gccttgatca gaagaatctg aagaacttgc cttatgatgc 41580
 ttcccttggc tctctgcac cctccattac ccagacagta gaagaaaaca agccacagcc 41640
 25 acttttgagc agcgaaactg aggcaaccca ccaactgcc tctacaccga tgagtaatcc 41700
 cacatcactg gcaaacattg acttttatgc ccaagtaagc gacattacac cagcaggtgg 41760
 30 tgtagtctt tccccaggcc aaaagattaa ggcagggata gcccaggca ataccagcg 41820
 ggaggtggcc acgccctgcc aagaaaatta cagcatgaac agtgcctact tttgtgagtc 41880
 35 agatgccaaa aaatgcatcg ctgtggcccc tgcgatggaa gccacgtctt gtataaaacc 41940
 aagctttaac caagaggaca tttacatcac cacagaaagc cttaccacta ctgcccagat 42000
 gtctgagaca gcagatattg ctccagatgc tgagatgtct gtcccagact acaccacggg 42060
 40 tcacaccgtg cagtctccaa ggggccttat actcaacgca actgctttgc ctttgcctga 42120
 caaaaagaat tttccctcct cgtgtggtta tgtgagcaca gaccaactga acaaaatcat 42180
 45 gcagtagcct ttctatctt taatggcaag ggaaaggctg ggcacaaacg cttaaaccaa 42240
 aactatgttt taaatctgtg ttgggagagc atgagagtgg atatggattc taaaatactt 42300
 50 tttctgaaa tgtcaaaata tcataaagtg gaaaatcaag aattcgtaat cagataaatg 42360
 ctcccattgt gaattataaa tattttaatg aattgtcttt aagactgtat agtggcagtg 42420
 attgtctgta ctgtgggtct taattttgtg atactaagca ttaaatagct acgtttttta 42480
 55 tgtatgtaga tcatgctttt tgaaaaagca aacaatcagg tggtttttgc agttcaggaa 42540
 attgaatgca gattatagca caggetgatt tttttttct tttttaaata actgggaact 42600
 60 aaaactctag gtgagaaggt aaaactagtt tggatatgca aaacatttat tttgacatga 42660
 aattgataaa gatattttta ataatttaca ctttaagcat gagtacttta taatatgcta 42720
 cacacatatt gtagttcaga acaatccatc taaggatgta gcagctacag tgtaaagagg 42780
 65 gtttcatgtt ttggccaatg aacgtaaaga aaaccaaaca agtttagatt ttacaaagcc 42840

ES 2 652 018 T3

cttttataac ttccaaaact tcttaactct aaaaatgtct aataacctgc attattagaa 42900
 aaaaacattt taaatttga aacgaatatt tttttaattt tgaaaacttt attttttttt 42960
 5 aatggtgaat caacgtatca tacaccaaac agtaaacaga aattataata atggaagaag 43020
 tgctttcttc gacaaaattc cattcaagcc acacagctac atgtaagaga agtagaagtg 43080
 10 atgtggtgtg attggctagg atgcagaaga gcttcaggaa tacaagaagt gagagcccaa 43140
 ggattgggag gagggggctc tcacatctcc acagtgcagt ctgtcaaacc cagcttggtt 43200
 tttatagtat tctaagaatt attgtgtaca aggaaaagtc tcacatgtat gaaatccagt 43260
 15 atccagatgg ggtaaagtta gcagataata ggataggaaa ttaaagacct agatcttttt 43320
 tcacagacag acacaaaattt ttaattcagg gagaagggac agaataaatg acttcccact 43380
 cacaagcac aactcagaag taattaaaca ggtaacagaa accttgccat caaacctttg 43440
 20 ataagatgta ttttaagtag taagcagtat ttcaatgctt cttacttacc ctcccaggac 43500
 aaccgatctc aaataaggggataaggtag ataaaaatca ctttttgatt ctgtaataac 43560
 25 ataaacatag ttctttgggt tagcaccccc cccaaaaaaa atttatggga gaaagaggac 43620
 tctcagctga ctgaagaata catctcattt aaatattttt tagatgcctg aaactttaaa 43680
 30 attaccttta agttttaatg gtatttacca ttttgccaag acctttgtgg ggaacaagc 43740
 ttaatgttta gtgatttga aatctcttc atgcaggaga gacagtgaaa atctagcctt 43800
 ggggtgttaa ggttcgcctt gttactttgt aatagatttt aataagtttt tctgctactt 43860
 35 tgctgctatg gtttctccaa tggctacatg atttagttca tatgaagtat catcaactta 43920
 gaatctatc agcttaaaga tgtgtgtttt gatgaactat cttaccattt caccatagggc 43980
 40 tgaccaogtt tctatagcca aaaatagcta aataacctca tcagttccag aatgtcattt 44040
 tttggtactt tgctggccac acaagccgtt attcaccgtt taactagttg tgttctgcag 44100
 tctatattta actttcttta tgtctgtgga tttttccctt caaagttcaa taaatttatt 44160
 45 ttcttggtt tctgatctta tgtttctaag agccttgaag cacaattacc tagacatgta 44220
 ctgagactaa ctgtaaagga cgtagatgag ttcattttaa tgcacagtg aatagtggat 44280
 50 cgtggatcac aaagcggcag aggagcaggg tgtggttaag atagtctttt tcttttatgg 44340
 actctgcctt ctcttttagga taacactcat gtggacagag acttacagat gctttgaaca 44400
 catcctaaaa gttaaagtgt gtgtccaagt tgatggggaa ttgtgggaaa tggaaagagg 44460
 55 agogttgtct ctaaactaca tttctagctt gagtgtgtta tctgccattg ggaagagtgg 44520
 ttctccctgg gcttatgtat tgacagagtt cttcattctg atgactcgtc atcataagag 44580
 60 actgacaatg agtctctata ctagttgctt ttctaataat tgcoctgaata agcaacttag 44640
 ggacaagagg tttgtcatag ttcccagttt agaggggtgg aaaggcaggg cacctggagt 44700
 ggctggctt gtaacagtgg gaacttgcaa catgacttgt ccacatcttg gaggataagg 44760
 65 aaacagaaag ctccagctag aactaaaggc aaatatgact ttcagttccc acccccagct 44820

ES 2 652 018 T3

acttggettg tcagatatat ccctaaaccc aaaggttcca caactcctaa tacagagcca 44880
 tcagcttgac accaggtcct caaacacggg agcctctgaa agacattttt ctattcaagc 44940
 5 catatgtaag tttcttctc ctgggaggaa ggttggttag gcaggttggtg tggctcagct 45000
 cgagatggag aggcttagat tcttacttca ggtttcaagt ggtgaattac atgctctcag 45060
 10 gcatgcatta aggcttagga ggtagaaggc tgacattgga attaccagc cactggacag 45120
 ctgtttactg tttcagccag tttcccaagc tgccaagact gtagagaata cttggtgact 45180
 acattctatt taaaaaaaa caaaaaaaca cacaaaaagc tgagcagtgg ttgtgcacgc 45240
 15 cttcaatccc agcacttggg aaacagaggc aggtggattt ctgagttcaa ggccagccta 45300
 gtctacagag tgagttacag gacagccagg gctacagaga aaccctgtct acttcaagca 45360
 20 cctgatatcg attgcctaca ggtgctagac aagacccaat cttctgaaga ggacctgtct 45420
 atttcagaag attgatgact cgtgattatg tgtatctgtc tgttcttaa tattgtgata 45480
 attcgtctc ccaagatgtg tactaacaga aaatatttac atgtttttat agaaaaaaaa 45540
 25 gtttgacagt aaatttatto tagtaagaaa tcacatccaa gctgggtggt gtagtggcac 45600
 acaccttaa tcccagcaca caggaggaag aggcaggag atctctgtga gttcaaggtc 45660
 30 agcctgttct acaaggtgag tttcaggaca gccagaccta catctcaaca gaaaaaagaa 45720
 aacgggaaag aaatcacaag cataaaagct agagatggtt tcaagctaaa ctcttgttta 45780
 35 aaattcaagt tcttacataa tatgtcccca gttgccttg ccaattttat atttatgagc 45840
 tgggtataaa gggcaccatt tacaataag aatttgagct ttgctaacat cactttcttt 45900
 40 ggaaaactaa taggtatatt gtgtttacct tgttatatgg gtaaaacccc ttatggttaa 45960
 aaggattcct ccaggttaag ttcagtttga atggactgaa acgataaaat ctagagatac 46020
 gctagacttt agacttgagt acgactcttt ttttttttt ttttttttt gtaaaaaaga 46080
 45 tatttatttc tcattttggt agcatttact gaggacaatc atgacacagt tctactttac 46140
 aaaactatca ggaagtaaca atttgacgtt catgtgaact ataattacct acttttcttc 46200
 50 ttctacaaca tgtacctcag agacaggatg acaggccaag aagaacatga tataccacct 46260
 gacattaata gcaagcacat gctttcaaaa gaatttcaca ataacactta ttcaaaaata 46320
 tcatttttga ttctttgact attttataac acctcagaaa ggattgtcta ttttacagca 46380
 55 aagggtgac aagaatttat tgggtaaatg aattcaaaat tttaatcaca agtaagtagt 46440
 ctagagttag catgtacaaa gcttcatttc tgcccatgag tcccaaagtg attcccatga 46500
 60 ttccaaagt gtccctctgg cagagtcatg attgttcttt ttttaatat tttattacat 46560
 attttctca attacatttc caatgctata accaaaagtc ccccatacc tccccccac 46620
 ttcctaccc acccattccc attttttgg cctggcattc cctgtactg gggcatatac 46680
 65 agtttgcatg tccaatgggc ctctctttcc agtgatggcc gactaggcca tcttttgata 46740

ES 2 652 018 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

catatgcagc tagagacacg agttctgggg gtactgatta gttcatattg ttgttccacc 46800
 tataggggtg cagacccctt cagctccttg ggtactttct ctagctecte cattggggagc 46860
 cctgtgatcc atccaatagc tgactgtgag catccactta tgtgtttget aggccccagc 46920
 atagtctcac aagagacagc tacatctgag tcctttcaat aaaatcttgc tagtgtatgc 46980
 aatgggtgtca gtgtttgaa gctgattatg ggggtgatcc ctggatatgg cagtctctag 47040
 atggteccatc ctttctctc agctccaatc tttgtctctg taactccttc catgggtgtt 47100
 tgttcccaat tctaagaagg ggcaaagtgt ccacacttca gtcttcattc ttcttgagtt 47160
 tcatgtgttt agcaaattgt atcttatatc ttgggtatcc taggttttgg gctaatatcc 47220
 acttatcagt gagtaogtat tgtgtgagtt cctttgtgaa tgtgttacct cactcaggat 47280
 gatgcccctcc aggtccatcc atttggctag gaatttcata aattcattct ttttaatagc 47340
 tgagtagtac tccgttgtgt agatgtacca cattttctgt attcattcct ctggtgaggg 47400
 gcatctgggt tctttccagc ttctggctat tataaataag gctgctatga acatagtga 47460
 gcatgtgtcc ttcttaccag ttggggcttc ttctggatat atgccagga gaggtattgc 47520
 tggatcctcc ggtagtacta tgtccaattt tctgaggaac cgccagactg atttccagag 47580
 tggttgtaca agcctgcaat cccaccaaca atggaggagt gttcctcttt ctccacatcc 47640
 tggccagcat ctgctgtcac ctgaattttt gatcttagcc attctcactg gtgtgaggtg 47700
 gaatctcagg gttgttttga tttgcatttc cctaatgatt aaggatgttg aacatttttt 47760
 caggtgettc tctgccattc ggtattctc aggtgagaat tctttgttca gttctgagcc 47820
 ccatttttta aggggttat ttgattttct gaggtccacc ttcttgagtt ctttatatat 47880
 gttggatatt agtcccctat ctgatttagg ataggtaaag atcctttccc agtctgttgg 47940
 tggctctttt gtcttataga cagtgtcttt tgccttgagc aaactttgga gtttcattag 48000
 gtcccatttg tcaattctog atcttacagc acaagccatt gctgttctgt tcaggaattt 48060
 ttcccctgtg cccatatctt caaggctttt ccccactttc tctctataa gtttcagtgt 48120
 ctctggtttt atgtgaagtt ccttgatcca cttagatttg acctagtagc aaggagataa 48180
 gtatggatcg attcgcattc ttctacatga taacaaccag ttgtgccagc accaattggt 48240
 gaaaatgctg tctttcttcc actggatggg ttggctccc ttgtcgaaga tcaagtgacc 48300
 ataggtgtgt gggttcattt ctgggtcttc aattctatc cattggteca cttgtctgtc 48360
 tctataccag taccatgcag tttttatcac aattgctctg tagtaaagct ttaggtcagg 48420
 catggtgatt ccaccagagg ttcttttctc cttgagaaga gtttttgcta tctoggttt 48480
 tttgttattc cagatgaatt tgcaaatgct tccttctaata tggttgaaga attgagttgg 48540
 aattttaatg gggattgcat tgaatctgta gattgctttt ggcaagatag ccatttttac 48600
 aatggtggtc ctgccaatcc atgagcatgg gagatcttcc catcttctga gatcttcttt 48660
 aatttcttcc ttcagggact tgaagttttt atcatacaga tctttcactt ccttoggtag 48720

ES 2 652 018 T3

agtcacgccc agatatttta tattatttgt ggctattgag aagggtgttg tttccctaata 48780
 ttctttctca gcctgtttat tctttgtgta gagaaaggcc attgacttgt ttgagttaat 48840
 5 tttatatcca gctacttcac cgaagctggt tatcaggttt aggagttctc tgttggaatt 48900
 ttttagggta cttatatata ctatcatatc atctgcaaaa agtgatattt tgacttcctc 48960
 ttttccaatt tgtatccctt tgatctcctt ttgttgctga attgctctgg ctaataacttc 49020
 10 aagtactatg ttgaaaagggt agggagaaaag agggcagcct tgtctagtc ctagattttag 49080
 tgggattgct tccagcttct ctccatttac tttgatgttg gctactgggt tgctgtagat 49140
 15 tgcttttata atgtttagggt attggccttg aattcctgat ctttccagaa cttttatcat 49200
 gaatgggtgt tggatcttgt caaatgcttt ttctgcatct aacgagatga toatgtgggt 49260
 tttgtctttg agtttgttta tataatggat tacattgatg gattttctga tattaacca 49320
 20 tcctgcatc cctggaataa aacctacttg gtcaggatgg atgattgctt taatgtgttc 49380
 ttggattcgg ttagcgagaa ttttattaag aatttttgc tcatgttca taagagaaat 49440
 25 tggctcgaag ttctctatct ttgttgatc tttctgtggt ttaggtatca gagtaatagt 49500
 ggcttcatag aatgagttgg gtagagtacc ttctacttct atcttctgaa aaagtttctg 49560
 30 cagaactgga gttagatctt ctttgaagggt ctgatagaac tctgcactaa acccatctgg 49620
 tcttgggctt tttttggctg ggagactatt aataactgct tctatttctt taggggatat 49680
 gggactggtt agaagggtcaa ctgatcctg attcaacttt ggtacctggt atctgtccag 49740
 35 aaatttctc atttctcca ggttttccag tttgttgag tatagccttt tgtagaagga 49800
 tctgatggtg ttttgattt ctccaggatc tgttggtatg tctccctttt catttctgat 49860
 40 tttgttaatt aggattttgt cctgtgccc tttagtgagt ctagctaagg gtttatctat 49920
 cttgttgatt ttctcaaaga accaactcct cgtttggtta attctttgaa tagttcttct 49980
 45 tgtttccact tggttgatt caccctgag tttgattatt tcttgcctc tactcctctt 50040
 ggggtgaattt gcttctttt tttctagagc ttttagatgt gttgtcaagc tgctagtatg 50100
 tctctctctc cgttttttct tgaaggctca taactatgag tttccctctt agaaatgctt 50160
 50 tcattgtgtc ccaaagggtg ggtacgttgt ggcttcattt tcattaaact ctaaaaagtc 50220
 ttttaatttct ttctttatc ctctctgac caaggatca ttgagaagag tgttgttcag 50280
 55 tttccacgtg aatgtggctt tccattatta tgttggtatt gaagatcagt cttaggcat 50340
 ggtggtctga taggatacat gggacaatct caatattttt ttgttaattt tttaatgatt 50400
 60 aattgtgaat ttcacatcat gtaccccaat tacactcctc tccccatcc ctccatctct 50460
 gccttgcac cctcctaagg aaaacaaat ataaaaataa aaacaacaaa aaggagaaaa 50520
 acaccatttt aaacaaacta aagaaaagtc atctcctctg agtctgataa gtatactctt 50580
 65 ctgtctgtac attttaactt gaaatgttca tggaatgagt cattggtctg gttccctctg 50640

ES 2 652 018 T3

aactccctct tatttgaatt ttattcttaa gattctctct attctaagt ctttagtact 50700
 ctttagtgat taacacaggc ttttaataa tactctgaat tttctttat ctttataaaa 50760
 5 ttatcatgta taacattttc cttttttct gagttgaata aaattcttc ttactggaac 50820
 ttctatgaga tatatggtga agattatcaa cctgtattcc attaatggta actgctcatt 50880
 10 cagatgtttc attgaaattg tcttcatttt gaaataggaa ataaacctat aattgcagtg 50940
 tctggtacaa agaagcagat caaattctaa gcttcocagtg tcacattgtc cagcagctct 51000
 ggcaactggt atatttttaa gtcattttta aggtacactt tattattgga tattttcttt 51060
 15 atttacattt caaatagtct cccctttccc tatccccccc agaaactccc tateccatcc 51120
 ccccttctcc tgtttctatg aggggtgtgc cccaocccact cactctctcc tgcctaccct 51180
 20 catattcccc tactcggggg aaacaaacct tcatgggacc aagggtgtct tctcccattg 51240
 atgcctgaca aggccatcct ctgctacata tgcagttgaa gccatgggtc ettctatgtg 51300
 tactccttgg ttggtggttt agaccctgga agctctggtt ggtaaatatt gttgttcttt 51360
 25 ttatgggggtt gcaaacccca tcagctcctt cagtcttcta actaacacct ccattgggga 51420
 cccagagatc agtttaattg tcagctggga gcatccgctt ctgtataggt caggctctgg 51480
 30 cagagccata cactttttat tgggtacctt gttgaaacca agagaaatat aaaatcctaa 51540
 agtattctga cctcagcata acaagatcaa ttcagctgat taaaatgtct tctattgitt 51600
 ctttctgitt cctcatctct agcaactata aataacagat cccataaatg aatgtgtac 51660
 35 aatccagag aacaaaagga gggactgtca acaatgagga gtccaacaaa gagtgacagc 51720
 aagcagtttt agatagttta caagaaatgt ctaaaagaat atccagctca acaacctta 51780
 40 aatttctgcc cactaaaaca atgtcagatc attatttctt taaatgtcaa taaaggagag 51840
 gggtaattga gatagcaact gtaactgtga aattgagata tctgttagt atgacatgag 51900
 45 tagagatttg tacagatgaa tgacctgagg aaaaogtct atcaattcta cctctttgtg 51960
 cagtgatatt gcttctggaa aacaactgtt agagaagaag tagaaataca ccagaactcc 52020
 atcctccacc accccagaga tgattattgt gataatcctc atgttactga aaaactggca 52080
 50 atactcaata tcaataaacc cacaaaagtt ttaattatca gatcctaaca tgaaaacctt 52140
 agtgcaaata gacacacagg cattcaaggt ttcacgtgaa gaaactgatt gttctctcc 52200
 55 attcatttaa atacatgaag aacaacagat gttgggttta acccgttgaa agatgagttg 52260
 tggctcacag ttgaaaaatg actgtcctaa atagcaggtg gtcaatacat cgtgaaatat 52320
 tagttaatat ggtcattcaa tgttatgtcc ttagttttct gtttatatgg tggcatgagt 52380
 60 gggagatgct acatttcttc ctocagtgag aaggagaatg ctttcaggca tataatgacg 52440
 attttttttt tctgttaaga tacataactc tttgcatctc ctacctcca caccagccta 52500
 65 tcatggatca ttaacggatt ctgtgcatte ttcttaaate ctctccccat atcctttgca 52560
 agttctgcaa gtagatagga tgtttttagg tgatccagtc tgcagcatcc ctttttaate 52620

agcctttcat gttaagattt tattcttggc atattcagat aatatcaaca aagctgagct 52680
 gatttcactt gaattaacaa agaacaaaag gccttttcta gaaatgaggg tgacaatata 52740
 5 tccagtatgt attgaggaga ttctaataaa aatgaaacaa aaatcaaat aaaaaggaaa 52800
 actatttaat ataaagccct tctttcaatt ttctttacac attttattag aaaatacctc 52860
 10 ctctgcctcc tcaccttct tectctctcc ccatacatcc acaaatgtga ttgctaaatt 52920
 tctgtgtacc caagtgtgca tttataatga taaaaagatc aaaattgact ctggaaaaaa 52980
 atgatagggt tgtaaacaga tttcttatat ttctattata atttagctca tcttcttgaa 53040
 15 atgtgccccaa ggctacaatt ctgtttgaaa ctggagatat cagtttgcaac tgctcagggt 53100
 gtctcagagt aactacttc atgttcaagt ggtttgtagg gagccagtac agaaacctaa 53160
 20 aaggagctac agaccaggct cattttcttg atgtcttctt tcttgttctt ctagtctaata 53220
 ttttgtgtaa tttgatgaag ccactagtag cttcagattt aaatctgcca tttggggtaa 53280
 tgtggggcag aatgtcatct attttcttta ttaagccaaa gtaacattct tatctaacaa 53340
 25 gaactttgcc tctgtgaagt ctaataattt ccocataaa aactagtccc tgaccaaaaa 53400
 aaaccctact gagaagttct aactaatcca actatatctg acttcaacac tataatggga 53460
 30 tttatctctc ccttgaacaa aatgttattc ttgaagattt attaaaatgc agatgcaaac 53520
 acttaggtgc attgtcttc aatgagtatt tgggcaacat tcttttaaat tttttattag 53580
 35 gtattttctt tatttacatt tcaaatgcta tcccaaaagt cccccatacc ctccccacc 53640
 cactctccta cccaccact cccacttctt ggcoctggtg tttcoctgta ctgaggcata 53700
 taaagtttgc aagaccaagg ggctctctt cccaatgatg gctgacgagg ccatcttctg 53760
 40 ctacatatgc agctagagac acgagctctg ggggtactgg ttagttcata ttgttgttcc 53820
 accaataggg tgcagacc ctttagatcc ttgggtacgg tattagtcag ggttctctag 53880
 45 agtcacagaa tttatggata gtctctatat agtaaaagaa tttattgatg acttacagtt 53940
 ggcagcccaa ttccaacaa tggttcagtc gcaggatga atggaagtcc aaggatctag 54000
 50 cagttactca gtctcacaca gcaagcaggc gaaggagcaa gagcaagacg ccttcttcc 54060
 aagcagaagg tgtagcccag attaaagggt tgttctacca cacgcttaata tccagatgac 54120
 cttgaactca gagatttaata cttctggaat ccactatgcc tcaagatctc cataccaaga 54180
 55 tccagatcag aatcttctat ctccaagcct ccagataagg gtcactggtg agccttccaa 54240
 ttctgtattg tagttcattc caatacagt caagttgaca accaggaata gccactacag 54300
 60 gtactttctc tagctctctc attgggggcc ctgagttcca tccaatagct gactgtgagc 54360
 atccacttct gtgtttgcca ggcaccggca tagcctcaca agagacagct atatcaagggt 54420
 cctttcagca aaatcttgc ggtgtatgca atggtgtcag catttgagg tggactccag 54480
 65 aaaatcaaat aaccccccaa aatggggatc agagctaaac aaagaattct catcttgagt 54540

aacattttaa ggtatgttgt tacacaaatt tttgcactcc tttctcetta tcttacactg 54600
 gaatctaaaa aggagagaaa gttccctttc aaggataaat taggaagatc tagaactaca 54660
 5 tagtagatta tctaagatca cataacatcc aatccagtag gagaagagaa ggagatgcgc 54720
 agtctacaaa attatatgcc acttgtaactc atgacttgct agcttggatg tagtcttatg 54780
 10 actacagtca gctacaagggt tctctgtgaa atggccttta ctgggtccta ttgctaattc 54840
 aaattagaaa gtgtcaataa aactggcaat tagtaactta gagcatgtca tagacggcta 54900
 tatcaatcct atgagtaaag tcatttaaata gtttattcaa aaggttgtca tgttaataac 54960
 15 tgtgattcat gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtaaaa atatgaattg 55020
 gagaggatta ggaaagcatt cttcaagtc c aatttagaat gttggctagg acttgggcat 55080
 ttctagtaga gaagataaca aaaatataat ggactcaaaa ttagctgaaa tggcaacttg 55140
 aagatatgat aggcaatgga ggcaaacct cttgataaca ttagacttc tgatatgtaa 55200
 tgcaaacctc ggagacaggt atttatgggt acttgagttt tgttttagaa ttgtgtttca 55260
 25 gaggcctcta ccatgctatc ggtttctgtc tttccaaaac atgatttgaa aaacaatcaa 55320
 tcacaattct caatgctatc actgttaact attcccatga acactctttt tgaggctatc 55380
 cttaggctct tcgttctatc cttagggagt ttgaatgat caaacatcac agaatgctga 55440
 30 atttcatact tcaaaaagggt aagctgcatg aacaggctca ataccagca cattaattct 55500
 gtcaacagga atggatcaca actgtcttcc tgtggtatta gtgtggacag gactgtcaact 55560
 35 cacatagtga aatgttcgtc tcacagtctt ctgtgtggag ttatttagtc ctaatgacaa 55620
 ccatgaatgt tctaactaca tgagttagta aaagaacat agcaaaaattc cagaccgggg 55680
 aagtcacctt tttcatttgt attgctcata tatgtatttc actaactact tggctctttg 55740
 40 taacatttct tgactcatga ccttttttta aaatctgaaa tagctcaatc ataacataat 55800
 ttaaaaaaac atccaacagg caaagcatgc tgggtgcacat ctgtatttag agcatgctgg 55860
 45 tgcacatctg tatttagagc actcagcaac tggaggctga agccagagga tgaggagttc 55920
 aaggtcattc tgggctacag aacaaacact ttcttgggaa attttctcag agagagagag 55980
 50 aactaaatca aataaaaaac atattatcta agtgtatgct cctcaattaa ttattcttta 56040
 attaacattg gtgcaactgaa cattggtgca ctgaaatgaa gaaagaaacc aatgtttaca 56100
 gaacatacta caggtattcc agtaaaagac actgctacaa tgaatggta aatgtatacc 56160
 55 atagaatgaa atagactagg atttttaatg catattggta tttcagaatt tgtttttgca 56220
 tttatttctt ctttaaaaaa tattcaatgt tctgcaactc gaggccttgg taaacttaaa 56280
 60 ttcagtggac ttctcttctt actcttctta gagatgtcac aggaccagat taaaattaca 56340
 cagttatacc taggtggtgt tggtagacccc ctttaatctc aatatttgag acaaagacag 56400
 gtggatcttt gagtttgagg ccagcctatt ctacagagtt ctagaacagc caggggctac 56460
 65 aaagagaaac ccaatcttaa aaacacaagc aaaaaaaaaa aatccaata ttatattcaa 56520

<400> 103
 tacctgagac ctcggagttt 20

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

 <220>
 10 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 104
 acaaagatcc atacctgaga 20

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

 20 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 105
 gctgggttag cctcactcc 20
 25
 <210> 106
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 106
 35 ttgccaaga gtagctggtg 20

 <210> 107
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 45 <400> 107
 acgacactg gtgaatcgag 20

 <210> 108
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 55
 <400> 108
 tggctttccc ttttagcata 20

 <210> 109
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60

 <220>
 65 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 109
 atgagcaatt ctgcagctt 20

5 <210> 110
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 110
 agttgaagta acagctgtt 20

15 <210> 111
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 111
 agtaggtat ccaatggag 20

25 <210> 112
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

35 <400> 112
 gtccagttga ggccaatggg 20

<210> 113
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

45 <400> 113
 gaattatcca tcccttcaga 20

<210> 114
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 55 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 114
 gtactgaatt tcatactcca 20

60 <210> 115
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 115
 ctgaactcgc tgtacttttc 20
 5
 <210> 116
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 116
 15 aactggatat ctcttcaca 20
 <210> 117
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 25 <400> 117
 tgctactcca aatattcca 20
 <210> 118
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 35 <400> 118
 gctttgaaaa tataactaca 20
 <210> 119
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 119
 atcagcatct taatccttg 20
 50 <210> 120
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 120
 60 tgagaagatc tggatcaatc 20
 <210> 121
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 121
 5 ttgtagttat catgaatgcc 20

 <210> 122
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 122
 15 catcattgta gaagtcgggt 20

 <210> 123
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 123
 25 ctccaaggat accagctgat 20

 <210> 124
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 124
 35 aggcaacaaga gatcagcttc 20

 <210> 125
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 125
 agagccaagg gaagcatcat 20

 <210> 126
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 126
 60 aagtcaatgt ttgccagtga 20

 <210> 127
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 65

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 127
 5 tgtcgcttac ttgggcataa 20

 <210> 128
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 128
 15 gtaatttct tggcagggcg 20

 <210> 129
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 25 <400> 129
 cactgttcat gctgtaattt 20

 <210> 130
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 35 <400> 130
 ttttggcat ctgactcaca 20

 <210> 131
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 45 <400> 131
 atgtcctctt ggttaaagct 20

 <210> 132
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 132
 60 cgtggtgtag tctgggacag 20

 <210> 133
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 133
 5 cggtgtgaac cggtgtgtag 20

 <210> 134
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 15 <400> 134
 tcaggcaaag gcaaagcagt 20
 <210> 135
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 25 <400> 135
 taggaaaggc tactgcatga 20

 <210> 136
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 35 <400> 136
 taaaacatag ttttggtta 20

 <210> 137
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 45 <400> 137
 tccaacaca gatttaaac 20

 <210> 138
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 138
 60 caaaagccac ctgattgtt 20

 <210> 139
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 65

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 139
 5 tcctgaactg caaaagccac 20

 <210> 140
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 15 <400> 140
 gcatcaatt tcctgaactg 20

 <210> 141
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 25 <400> 141
 taaatgttt gcatatccaa 20

 <210> 142
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 142
 ttgtaaaaat ctaactgtt 20

 40 <210> 143
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 143
 50 tacctgagac cccagttcat 20

 <210> 144
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 144
 60 tacctgagac cccgcgagc 20

 <210> 145
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

5 <400> 145
 tacctgagac ccacaagcgg 20

<210> 146
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 146
 cctccagtac ctcggagttt 20

<210> 147
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

25 <400> 147
 gtccttgctc caggtagca 20

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

30

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

35 <400> 148
 ttccactcac cccagttcat 20

40 <210> 149
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

50 <400> 149
 gcagtctat cagaacttg 20

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

55

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

60 <400> 150
 ctccagacgt gacccgactc 20

<210> 151
 <211> 20
 <212> ADN

65

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 5
 <400> 151
 ccacgcaccc acaagcggat 20
 <210> 152
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 152
 taacctatgg tgactatgtc 20
 20 <210> 153
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 153
 30 tacctgagac ctgcaagaca 20
 <210> 154
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 154
 40 atgctcacgt cagctattgg 20
 <210> 155
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 155
 50 aaattcttac ttgtccccag 20
 <210> 156
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 60 <400> 156
 ttggcttcc ctggagggtc 20
 <210> 157
 65 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 157
 cttcactaac cttgcagctt 20

 10 <210> 158
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 158
 cacggcttac ctatttcgct 20
 20
 <210> 159
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 159
 30 tcacacctac ctttgctgct 20

 <210> 160
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 40 <400> 160
 catcttaatc cttggaaaca 20

 <210> 161
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>

 <400> 161
 50 gaatggaaag aatgccctga 20

 <210> 162
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> H. sapiens

 <220>

 <400> 162
 60 gaaagaatgc cctgattatg 20

 <210> 163
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> H. sapiens

<220>

<400> 163
 5 ccagttccaa agattaaagg 20

<210> 164
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> H. sapiens

<220>

<400> 164
 15 attgagctag atattgatga 20

<210> 165
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> H. sapiens

<220>

<400> 165
 25 gacacagaca gacttctaag 20

<210> 166
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> H. sapiens

<220>

<400> 166
 35 agcgacatta caccagcagg 20

<210> 167
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> H. sapiens

<220>

<400> 167
 45 aaccaagagg acatttacat 20

<210> 168
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> H. sapiens

<220>

<400> 168
 55 agaggacatt tacatcacca 20

<210> 169
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> H. sapiens

<220>

<400> 169
 65 acatttacat caccacagaa 20

<210> 170
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> H. sapiens

 <220>

 <400> 170
 10 tacatcacca cagaaagcct 20

 <210> 171
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> H. sapiens

 <220>

 <400> 171
 20 caccacagaa agccttacca 20

 <210> 172
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> H. sapiens

 <220>

 <400> 172
 30 tatgtgagca cagaccaact 20

 <210> 173
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> H. sapiens

 <220>

 <400> 173
 40 gagcacagac caactgaaca 20

 <210> 174
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> H. sapiens

 <220>

 <400> 174
 50 ccaactgaac aaaatcatgc 20

 <210> 175
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> H. sapiens

 <220>

 <400> 175
 60 tctgctactt tgctgctatg 20

 <210> 176
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> H. sapiens

ES 2 652 018 T3

<220>
<400> 176
5 tttctatagc caaaaatagc 20
<210> 177
<211> 20
<212> ADN
10 <213> H. sapiens
<220>
<400> 177
15 aatagctaaa tacctcaatc 20
<210> 178
<211> 20
<212> ADN
20 <213> H. sapiens
<220>
<400> 178
25 aggtcctaca ggtatggatc 20
<210> 179
<211> 20
<212> ADN
30 <213> H. sapiens
<220>
<400> 179
35 ctacaggtat ggatctctgg 20
<210> 180
<211> 20
<212> ADN
40 <213> H. sapiens
<220>
<400> 180
45 cacagcagct atccttagca 20
<210> 181
<211> 20
<212> ADN
50 <213> H. sapiens
<220>
<400> 181
55 taatccaggc ctaaagacaa 20
<210> 182
<211> 20
<212> ADN
60 <213> H. sapiens
<220>
<400> 182
65 tctaaggagc ctaaattcac 20

<210> 183
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 5 <220>

 <400> 183
 gaacctagga cccatacagc 20
 10
 <210> 184
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 15 <220>

 <400> 184
 gctggggaaa acagctgta 20
 20
 <210> 185
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 25 <220>

 <400> 185
 tgggtgtaca gtggatgaaa 20
 30
 <210> 186
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 35 <220>

 <400> 186
 ctgttgatga aatagtgcaa 20
 40
 <210> 187
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 45 <220>

 <400> 187
 tagtgcaacc agatccaccc 20
 50
 <210> 188
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 55 <220>

 <400> 188
 gatgggaagc accacgcaat 20
 60
 <210> 189
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 65

<220>
 <400> 189
 atggaaaatg atggacccta 20
 5
 <210> 190
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 10
 <220>
 <400> 190
 cagttccagt gtactcattg 20
 15
 <210> 191
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 20
 <220>
 <400> 191
 tctggaaatt atggcgagtt 20
 25
 <210> 192
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 30
 <220>
 <400> 192
 atctttggaa tatttgggct 20
 35
 <210> 193
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 40
 <220>
 <400> 193
 gcaaaggatt aaaatgctga 20
 45
 <210> 194
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 50
 <220>
 <400> 194
 tctcctcaag gaaggaaaat 20
 55
 <210> 195
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 60
 <220>
 <400> 195
 agaggagggtg aacacaatct 20
 65
 <210> 196

<211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>
 5
 <400> 196
 acagtgatga ctctgggtt 20

 <210> 197
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

 <220>
 15
 <400> 197
 gctagatatt gatgagccag 20

 <210> 198
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

 <220>
 25
 <400> 198
 agactgagga atcagacaca 20

 <210> 199
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

 <220>
 35
 <400> 199
 atttcaatgc caatgacata 20

 <210> 200
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

 <220>
 45
 <400> 200
 aagcagatct cttatgcctt 20

 <210> 201
 50 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

 <220>
 55
 <400> 201
 tcctactgaa ggagctgagt 20

 <210> 202
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

 <220>
 65

ES 2 652 018 T3

<400> 202
agaataaggc agggatgtcc 20

5 <210> 203
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

<220>

10 <400> 203
acttccttat ggacaatgcc 20

15 <210> 204
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

<220>

20 <400> 204
tgaggcagat gccaaaaagt 20

25 <210> 205
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

<220>

30 <400> 205
cagatgcaa aaagtgcac 20

35 <210> 206
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

<220>

40 <400> 206
cctcactc aatgcgactg 20

45 <210> 207
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

<220>

50 <400> 207
tgccctgcc tgacaaagag 20

55 <210> 208
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

<220>

60 <400> 208
tcatgtggct atgtgagcac 20

65 <210> 209
<211> 20

ES 2 652 018 T3

<212> ADN
<213> H. sapiens

<220>
5
<400> 209
atcatgcctt agccttctt 20

<210> 210
10 <211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

<220>
15
<400> 210
ttccaagag ctacgtattt 20

<210> 211
20 <211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

<220>
25
<400> 211
ctgtttagta gcagtgattg 20

<210> 212
30 <211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

<220>
35
<400> 212
ttgaatgcaa accatagcac 20

<210> 213
40 <211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

<220>
45
<400> 213
atagtttga tatgtaaacc 2
<210> 214
<211> 20
50 <212> ADN
<213> H. sapiens

<220>
55
<400> 214
tcaccaaatc ttggtgatg 20

<210> 215
<211> 20
60 <212> ADN
<213> H. sapiens

<220>
65 <400> 215

ES 2 652 018 T3

gagataagat ctatagcctc 20
<210> 216
<211> 20
5 <212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
10 <400> 216
agaaacttfc tttctcacta 20
<210> 217
<211> 20
15 <212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
20 <400> 217
acatcattct tgagagcatt 20
<210> 218
<211> 20
25 <212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
30 <400> 218
gaaaagctag aattgagtgt 20
<210> 219
<211> 20
35 <212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
40 <400> 219
gctatggttt tctccaagag 20
<210> 220
<211> 20
45 <212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
50 <400> 220
taaagtatca tcagtgtaga 20
<210> 221
<211> 20
55 <212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
60 <400> 221
taattcaatt caaagctgtg 20
<210> 222
<211> 20
65 <212> ADN

<213> H. sapiens
 <220>
 5 <400> 222
 agctgtgtgt ttggaagact 20
 <210> 223
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>
 15 <400> 223
 ttactatttc acaacagcct 20
 <210> 224
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>
 25 <400> 224
 cagcctgaca acatttctat 20
 <210> 225
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>
 35 <400> 225
 gtctcagaat gtcatttgg 20
 <210> 226
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>
 45 <400> 226
 gtggccacat aagccattat 20
 <210> 227
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>
 55 <400> 227
 tcaatcaggg tcacataact 20
 <210> 228
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>
 65 <400> 228
 tttgaacctc cagcctccat 20

ES 2 652 018 T3

<210> 229
<211> 20
<212> ADN
5 <213> H. sapiens

<220>

<400> 229
10 gtcttgaaag atggacccta 20

<210> 230
<211> 20
<212> ADN
15 <213> H. sapiens

<220>

<400> 230
20 gtttagattc tatctggaga 20

<210> 231
<211> 20
<212> ADN
25 <213> H. sapiens
<220>

<400> 231
30 aaagtaccag aatatttga 20

<210> 232
<211> 20
<212> ADN
35 <213> M. musculus
<220>

<400> 232
40 tgccaagcag gcgcagccat 20

<210> 233
<211> 20
<212> ADN
45 <213> M. musculus
<220>

<400> 233
50 aaactccgag gtctcagga 20

<210> 234
<211> 20
<212> ADN
55 <213> M. musculus
<220>

<400> 234
60 tctcaggat ggatcttgt 20

<210> 235
<211> 20
<212> ADN
65 <213> M. musculus

ES 2 652 018 T3

<220>
<400> 235
5 ggaagtgagg ctacaccagc 20
<210> 236
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus
10 <220>
<400> 236
15 caccagctac tcttgcaaa 20
<210> 237
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus
20 <220>
<400> 237
25 ctcgattcac caagtgctgt 20
<210> 238
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus
30 <220>
<400> 238
35 tatgctaaaa gggaaagcca 20
<210> 239
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus
40 <220>
<400> 239
45 aaacagctgt tacttcaact 20
<210> 240
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus
50 <220>
<400> 240
55 ccattggcc tcaactggac 20
<210> 241
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus
60 <220>
<400> 241
65 tctgaagga tggataattc 20

ES 2 652 018 T3

<210> 242
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus
5
<220>

<400> 242
tggagtatga aattcagtac 20
10
<210> 243
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus
15
<220>

<400> 243
gaaaagtaca gcgagttcag 20
20
<210> 244
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus
25
<220>

<400> 244
ttggaatatt tggagtagca 20
30
<210> 245
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus
35
<220>

<400> 245
gattgatcca gatcttctca 20
40
<210> 246
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus
45
<220>

<400> 246
ggcattcatg ataactacaa 20
50
<210> 247
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus
55
<220>

<400> 247
atcagctggt atccttgag 20
60
<210> 248
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus
65

<220>

<400> 248
 gaagctgatc tcttgcct 20
 5 <210> 249
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus

10 <220>

<400> 249
 tcactgcaa acattgactt 20

15 <210> 250
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus

20 <220>

<400> 250
 ttatgcccaa gtaagcgaca 20

25 <210> 251
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus

30 <220>

<400> 251
 aaattacagc atgaacagtg 20

35 <210> 252
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus

40 <220>

<400> 252
 tgtgagtcag atgccaaaa 20

45 <210> 253
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus

50 <220>

<400> 253
 agcttaacc aagaggacat 20

55 <210> 254
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus

60 <220>

<400> 254
 tcatgcagta gccttccta 20

65 <210> 255

ES 2 652 018 T3

<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus

5 <220>

<400> 255
gttttaaadc tgtgttgga 20

10 <210> 256
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus

15 <220>

<400> 256
aaacaatcag gtggctttg 20

20 <210> 257
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus

25 <220>

<400> 257
cagtcagga aattgaatgc 20

30 <210> 258
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus

35 <220>

<400> 258
ttggatatgc aaaacattta 20

40 <210> 259
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus

45 <220>

<400> 259
aaactccgag gtactggagg 20

50 <210> 260
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus

55 <220>

<400> 260
tgtaacctg gagcaaggac 20

<210> 261
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus

60 <220>

65

ES 2 652 018 T3

<400> 261
atgaactggg gtagtgga 20

5 <210> 262
<211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus

<220>

10 <400> 262
caaagtctg atagaactgc 20

<210> 263
15 <211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus

<220>

20 <400> 263
gagtcgggtc acgtctggag 20

<210> 264
25 <211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus

<220>

30 <400> 264
atccgctgt ggtgcgtgg 20

<210> 265
35 <211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus

<220>

40 <400> 265
gaacctccag gaaagccaa 20

<210> 266
45 <211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus
<220>

50 <400> 266
aagctgcaag gttagtgaag 20

<210> 267
55 <211> 20
<212> ADN
<213> M. musculus

<220>

60 <400> 267
agagagctac ctaactaaca 20

<210> 268
65 <211> 20
<212> ADN

ES 2 652 018 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido de control mezclado

5

<400> 268 ttaccgatg gttcctcact 20

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Un oligonucleótido dirigido a una molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de la hormona de crecimiento humana, en donde la secuencia de base nitrogenada de dicho oligonucleótido consiste de las IDENTIFICACIONES SECUENCIALES NÚMEROS: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 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, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 93 o 94, en donde las vinculaciones internucleosídicas de dicho oligonucleótido se modifican, y en donde dicho oligonucleótido hibrida específicamente con dicha molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de la hormona de crecimiento e inhibe la expresión del receptor de la hormona de crecimiento.
- 10 2. El oligonucleótido de la reivindicación 1, en donde dicho oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido.
- 15 3. El oligonucleótido de la reivindicación 1, en donde dicho oligonucleótido es un oligonucleótido quimérico.
4. El oligonucleótido de la reivindicación 1, en donde dicho oligonucleótido comprende al menos una partícula modificada de azúcar o una base nitrogenada modificada.
- 20 5. El oligonucleótido de la reivindicación 4, en donde dicho oligonucleótido comprende al menos una vinculación internucleosídica de fosforotioato o partícula de azúcar de 2'-O-metoxietil o 5-metilcitosina.
- 25 6. El oligonucleótido de cualquier reivindicación anterior, en donde dicho oligonucleótido apunta a una región en los nucleótidos 332 a 351 de la IDENTIFICACION SECUENCIAL NÚMERO: 4.
7. El oligonucleótido de cualquier reivindicación anterior, en donde la secuencia de base nitrogenada del oligonucleótido consiste de la IDENTIFICACION SECUENCIAL NÚMERO: 19.
- 30 8. El oligonucleótido de cualquier reivindicación anterior, en donde dicho oligonucleótido es un oligonucleótido quimérico de 20 nucleótidos de longitud, compuesto de una región "vacía" central que consiste de diez 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por cinco "alas" de nucleótido compuestas de nucleótidos de 2'-metoxietilo (2'-MOE), en donde cada vinculación internucleosídica (esqueleto) es fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido, y todas las partículas de citidina son 5-metilcitidinas.
- 35 9. Un oligonucleótido quimérico de 20 nucleótidos de longitud, compuesto de una región "vacía" central que consiste de diez 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por cinco "alas" de nucleótido compuestas de nucleótidos de 2'-metoxietilo (2'-MOE), en donde cada vinculación internucleosídica (esqueleto) es fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido, y todas las partículas de citidina son 5-metilcitidinas, en donde la secuencia de base nitrogenada del oligonucleótido consiste de las IDENTIFICACIONES SECUENCIALES NÚMEROS: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 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, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 93 o 94.
- 40 10. El oligonucleótido de la reivindicación 9, en donde la secuencia de base nitrogenada del oligonucleótido consiste de la IDENTIFICACION SECUENCIAL NÚMERO: 19.
- 45 11. El oligonucleótido de cualquier reivindicación anterior, en donde dicho oligonucleótido inhibe la expresión del receptor de la hormona de crecimiento y el factor-I de crecimiento tipo insulina.
- 50 12. Una composición que comprende el oligonucleótido de cualquiera de las reivindicación 1 a 11 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 55 13. El oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso como un producto farmacéutico en un método de tratamiento o profilaxis.
- 60 14. El oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o la composición de la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento o profilaxis de acromegalia, gigantismo, cáncer, diabetes, nefropatía diabética, retinopatía diabética, neovascularización aberrante, neovascularización retiniana, angiogénesis aberrante, degeneración macular, degeneración macular relacionada con la edad, artritis reumatoide, hipertrofia glomerular, esclerosis, metástasis hepáticas o artritis reumatoide.
- 65 15. El uso del oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o la composición de la reivindicación 12 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de acromegalia, gigantismo, cáncer, diabetes, nefropatía diabética, retinopatía diabética, neovascularización aberrante, neovascularización retiniana, angiogénesis aberrante, degeneración macular, degeneración macular relacionada con la edad, artritis reumatoide, hipertrofia glomerular, esclerosis, metástasis hepáticas o artritis reumatoide.

16. El oligonucleótido para el uso de acuerdo con la reivindicación 14 o el uso de la reivindicación 15, en donde dicha cáncer es cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas o meningioma.

5 **17.** El uso de la reivindicación 15 ó 16, en donde el medicamento inhibe la expresión del factor-1 de crecimiento tipo insulina.

10 **18.** Un método para inhibir la expresión del receptor de la hormona de crecimiento en células o tejidos un vitro o ex vivo que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con el oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o la composición de la reivindicación 12.

19. El método de la reivindicación 18, en donde se inhibe la expresión del factor-1 de crecimiento tipo insulina.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65