

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 960**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/US2012/071371**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13096837**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12860563 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2794880**

54 Título: **Métodos para modular la expresión de un Transcrito-1 de adenocarcinoma en pulmón asociado a metástasis (MALAT-1)**

30 Prioridad:

22.12.2011 US 201161579343 P

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

26.06.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BENNETT, C., FRANK;
FREIER, SUSAN, M.;
MARCUSSON, ERIC, G.;
HSU, SSUCHENG, J. y
MACLEOD, ROBERT, A.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 673 960 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).

Métodos para modular la expresión de un Transcrito-1 de adenocarcinoma en pulmón asociado a metástasis (MALAT-1)**Descripción**

5

CAMPO

10 Las presentes realizaciones se refieren al campo de la biología del cáncer. Más particularmente, las realizaciones proporcionadas en la presente se refieren a compuestos y métodos para reducir la expresión del ARN y/o proteína asociados al Transcrito-1 de Adenocarcinoma en Pulmón Asociado a Metástasis (MALAT-1) en un animal. Tales métodos son útiles para tratar el cáncer, como cáncer de colon, cáncer intestinal, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de hígado y/o cáncer de próstata. En varios aspectos, el cáncer es un cáncer primario.

ANTECEDENTES

20 El MALAT, también conocido como transcrito abundante nuclear-enriquecido no codificante 2 (NEAT2) es un ARN no codificante, infrecuentemente cortado y empalmado, grande, que está altamente conservado entre los mamíferos. El MALAT-1 se expresa en el núcleo y regula positivamente la motilidad celular mediante regulación transcripcional y/o postranscripcional de los genes relacionados con la motilidad. Adicionalmente, el MALAT-1 ha sido implicado en la regulación del corte y empalme alternativo. Sin embargo, el papel funcional del MALAT-1 en la carcinogénesis es en gran parte desconocido.

25 Schmidt et al. (2011) se refiere al ARN MALAT-1 no codificante largo indicando un pronóstico pobre en cáncer de pulmón de células no pequeñas e induciendo la migración y el crecimiento tumoral. Guo et al. (2010) trata la inhibición del transcrito de adenocarcinoma de pulmón asociado a metástasis 1 en células de cáncer de cuello uterino humano CaSki que suprimen la proliferación e invasión celular. Tano et al. (2010) se refiere a MALAT-1 mejorando la motilidad celular de células de adenocarcinoma de pulmón influyendo en la expresión de genes relacionados con la motilidad. Lai et al. (2011) se refiere a la sobreexpresión de MALAT-1 de ARN no codificante largo que predice la recurrencia tumoral del carcinoma hepatocelular después del trasplante de hígado. La WO 2012/012467 se refiere a métodos, compuestos y composiciones para reducir la expresión de ARN conservado nuclearmente.

SUMARIO

35

40 La invención proporciona un oligonucleótido antisentido para su uso en un método para tratar un animal que tiene cáncer, en donde el cáncer es un cáncer primario, y en donde el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos ligados que tiene una secuencia de nucleobases por lo menos un 85% complementaria a un ácido nucleico asociado a un ácido nucleico del Transcrito-1 de Adenocarcinoma en Pulmón Asociado a Metástasis (MALAT-1) y en donde el compuesto antisentido reduce la expresión de MALAT-1.

45 Las realizaciones divulgadas en la presente se refieren al descubrimiento de que los inhibidores específicos de MALAT-1 pueden tratar el cáncer *in vivo*. Se perfilan varias realizaciones para inhibidores específicos de MALAT-1, como compuestos antisentido, y métodos para modular la expresión de ARN y proteína de MALAT-1 usando los mismos. En ciertas realizaciones, los inhibidores específicos de MALAT-1 modulan la expresión o actividad de ARN y/o proteína de MALAT-1.

50 También se divulgan métodos para tratar el cáncer con inhibidores específicos de MALAT-1, tales como compuestos antisentido. En algunas realizaciones, los métodos para tratar el cáncer primario en un animal incluyen administrar al animal un compuesto antisentido que reduce la expresión de MALAT-1. Los tipos de cánceres que pueden tratarse con los inhibidores específicos de MALAT-1 proporcionados en la presente incluyen, pero no están limitados a, cáncer de colon, cáncer intestinal, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de hígado, y/o cáncer de próstata.

55 En varias realizaciones, un método para tratar el cáncer en un animal incluye administrar al animal un compuesto antisentido que reduce la expresión de MALAT-1. El compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos ligados, en donde el oligonucleótido modificado es por lo menos un 85% complementario a un ácido nucleico de MALAT-1.

60 Varias realizaciones divulgadas en la presente se refieren al uso de un compuesto que incluye un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos ligados por lo menos un 85% complementario a un ácido nucleico de MALAT-1 en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.

65 Realizaciones adicionales se refieren a compuestos para su uso en el tratamiento del cáncer que incluyen un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos ligados por lo menos un 85% complementario a

un ácido nucleico de MALAT-1.

En varios aspectos de cualquiera de las realizaciones anteriormente mencionadas, se reduce la expresión de ARN de MALAT-1; se reduce la expresión de la proteína de MALAT-1; el animal es un humano; el ácido nucleico de MALAT-1 es un ácido nucleico de MALAT-1 humano (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NO: 1-9); el oligonucleótido modificado es un 100% complementario a un ácido nucleico de MALAT-1 humano (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NO: 1-9); el oligonucleótido modificado inhibe el crecimiento del cáncer primario y opcionalmente la metástasis; el oligonucleótido modificado aumenta la supervivencia del animal; el cáncer es cáncer de colon, cáncer intestinal, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, o cáncer de próstata; el cáncer es un cáncer primario; la expresión de MALAT-1 se reduce en las células cancerosas del animal en comparación con animales de control o no tratados; el oligonucleótido modificado es un oligonucleótido de cadena sencilla; el oligonucleótido modificado comprende por lo menos un enlace internucleosídico modificado como un enlace internucleosídico de fosforotioato; por lo menos un nucleósido comprende un azúcar modificado; el azúcar modificado es un azúcar bicíclico como un puente 4'-CH(CH₃)-O-2'; el oligonucleótido modificado incluye por lo menos un nucleósido modificado con tetrahidropirano en el que un anillo de tetrahidropirano reemplaza al anillo de furanosa; el azúcar modificado comprende un grupo 2'-O-metoxietilo; y/o por lo menos un nucleósido comprende una nucleobase modificada como una 5-metilcitosina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son explicativas solamente y no son restrictivas de la invención tal como se reivindica. En la presente, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. Como se usa en la presente, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Adicionalmente, como se usa en la presente, el uso de "y" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluyendo", así como otras formas, como "incluye" e "incluido", no es limitativo.

Definiciones

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

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

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

"Nucleósido 2'-MOE" (también nucleósido 2'-O-metoxietil) significa un nucleósido que comprende una fracción de azúcar modificado 2'-MOE.

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

"Aproximadamente" significa dentro del ±7% de un valor. Por ejemplo, si se afirma, "los compuestos inhibieron MALAT-1 en aproximadamente un 70%", se da a entender que los niveles de MALAT-1 se inhiben dentro de un intervalo del 63% y el 77%.

"Región objetivo activa" o "región objetivo" significa una región a la que están dirigidos uno o más compuestos antisentido activos. "Compuestos antisentido activos" significa compuestos antisentido que reducen los niveles del ácido nucleico objetivo o los niveles de proteína.

"Administrar" significa proporcionar un agente farmacéutico a un individuo, e incluye, pero no está limitado a, administrar por un profesional médico y autoadministración.

"Mejora" o "mejorar" o "mejorando" se refiere a una disminución de por lo menos un indicador, signo o síntoma de una enfermedad, trastorno o afección asociada. La gravedad de los indicadores puede determinarse mediante medidas subjetivas u objetivas, que son conocidas por los expertos en la técnica.

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

"Actividad antisentido" significa cualquier actividad detectable o medible atribuible a la hibridación de un compuesto antisentido con su ácido nucleico objetivo. En ciertas realizaciones, la actividad antisentido es una

disminución en la cantidad o expresión de un ácido nucleico objetivo o proteína codificada por dicho ácido nucleico objetivo.

5 "Compuesto antisentido" significa un compuesto oligomérico que es capaz de experimentar hibridación con un ácido nucleico objetivo a través de enlaces de hidrógeno. Los ejemplos de compuestos antisentido incluyen compuestos de cadena sencilla y de cadena doble, como oligonucleótidos antisentido, ARNip, ARNhc y ARNmi.

10 "Inhibición antisentido" significa la reducción de los niveles del ácido nucleico objetivo o niveles de proteína objetivo en presencia de un compuesto antisentido complementario a un ácido nucleico objetivo en comparación con los niveles del ácido nucleico objetivo o los niveles de la proteína objetivo en ausencia del compuesto antisentido.

"Oligonucleótido antisentido" significa un oligonucleótido de cadena sencilla que tiene una secuencia de nucleobases que permite la hibridación con una región o segmento correspondiente de un ácido nucleico objetivo.

15 "Azúcar bicíclico" significa un anillo de furanosilo modificado por el puente de dos átomos. Un azúcar bicíclico es un azúcar modificado.

20 "Nucleósido bicíclico" (también BNA) significa un nucleósido que tiene una fracción de azúcar que comprende un puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de azúcar, formando así un sistema de anillo bicíclico. En ciertas realizaciones, el puente conecta el 4'-carbono y el 2'-carbono del anillo de azúcar.

"Estructura de tapón" o "fracción de tapón terminal" significa modificaciones químicas, que se han incorporado en cualquiera de los extremos terminales de un compuesto antisentido.

25 "cEt" o "etilo restringido" significa un nucleósido bicíclico que tiene una fracción de azúcar que comprende un puente que conecta el 4'-carbono y el 2'-carbono, en donde el puente tiene la fórmula: 4'-CH(CH₃)-O-2'.

30 "Nucleósido de etilo restringido" (también nucleósido cEt) significa un nucleósido que comprende una fracción de azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH(CH₃)-O-2'.

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

"Compuesto antisentido quimérico" significa un compuesto antisentido que tiene por lo menos dos regiones químicamente distintas.

40 "Complementariedad" significa la capacidad de emparejamiento entre nucleobases de un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico.

"Nucleobases contiguas" significa nucleobases inmediatamente adyacentes entre sí.

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

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

55 " Transcrito-1 de Adenocarcinoma en Pulmón Asociado a Metástasis (MALAT-1)" significa cualquier ácido nucleico o proteína de MALAT-1. "Ácido nucleico de MALAT-1" significa cualquier ácido nucleico que codifica MALAT-1. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ácido nucleico de MALAT-1 incluye una secuencia de ADN que codifica MALAT-1, una secuencia de ARN transcrita de ADN que codifica MALAT-1 (incluyendo ADN genómico que comprende intrones y exones), que incluye una codificación no proteica (*es decir* no codificante) secuencia de ARN, y una secuencia de ARNm que codifica MALAT-1. "ARNm de MALAT-1" significa un ARNm que codifica una proteína de MALAT-1.

60 "Inhibidor específico de MALAT-1" se refiere a cualquier agente capaz de inhibir específicamente el ARN MALAT-1 y/o la expresión o actividad de la proteína de MALAT-1 a nivel molecular. Por ejemplo, los inhibidores específicos de MALAT-1 incluyen ácidos nucleicos (incluyendo compuestos antisentido), péptidos, anticuerpos, moléculas pequeñas y otros agentes capaces de inhibir la expresión de ARN de MALAT-1 y/o proteína de MALAT-1.

65

"Completamente complementario" o "100% complementario" significa que cada nucleobase de un primer ácido nucleico tiene una nucleobase complementaria en un segundo ácido nucleico. En ciertas realizaciones, un primer ácido nucleico es un compuesto antisentido y un ácido nucleico objetivo es un segundo ácido nucleico.

5 "Gapmer" significa un compuesto antisentido quimérico en el que una región interna que tiene una pluralidad de nucleósidos que soportan la escisión de RNasa H está situada entre regiones externas que tienen uno o más nucleósidos, en donde los nucleósidos que comprenden la región interna son químicamente distintos del nucleósido o nucleósidos que comprenden las regiones externas. La región interna puede denominarse "hueco" y las regiones externas pueden denominarse "alas".

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

15 "Hibridación" significa el apareamiento de moléculas de ácido nucleico complementarias. En ciertas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico complementarias incluyen un compuesto antisentido y un ácido nucleico objetivo.

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

"Individuo" significa un animal humano o no humano seleccionado para tratamiento o terapia.

25 "Inhibir MALAT-1" significa reducir la expresión de los niveles de ARN y/o proteína de MALAT-1 en presencia de un inhibidor específico de MALAT-1, incluyendo un oligonucleótido antisentido de MALAT-1, en comparación con la expresión de ARN y/o niveles de proteína de MALAT-1 en ausencia de un inhibidor específico de MALAT-1, como un oligonucleótido antisentido de MALAT-1.

30 "Enlace internucleosídico" se refiere al enlace químico entre nucleósidos.

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

35 "Malapareamiento" o "nucleobase no complementaria" se refiere al caso en el que una nucleobase de un primer ácido nucleico no es capaz de emparejarse con la nucleobase correspondiente de un segundo ácido nucleico objetivo.

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

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

45 "Nucleótido modificado" significa un nucleótido que tiene, independientemente, una fracción de azúcar modificado, un enlace internucleosídico modificado o una nucleobase modificada. Un "nucleósido modificado" significa un nucleósido que tiene, independientemente, una fracción de azúcar modificado o nucleobase modificada.

50 "Oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido que comprende un enlace internucleosídico modificado, un azúcar modificado o una nucleobase modificada.

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

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

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

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

60 "Ácido nucleico" se refiere a moléculas compuestas de nucleótidos monoméricos. Un ácido nucleico incluye ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos nucleicos de cadena sencilla, ácidos nucleicos de cadena doble, ácidos ribonucleicos interferentes pequeños (ARNip) y microARN (miARN).

65 "Nucleobase" significa una fracción heterocíclica capaz de emparejarse con una base de otro ácido nucleico.

"Secuencia de nucleobases" significa el orden de las nucleobases contiguas independientemente de cualquier modificación de azúcares, enlaces o nucleobases.

5 "Nucleósido" significa una nucleobase ligada a un azúcar.

10 "Mimético de nucleósido" incluye aquellas estructuras usadas para reemplazar el azúcar o el azúcar y la base y no necesariamente el enlace en una o más posiciones de un compuesto oligomérico como, por ejemplo, miméticos de nucleósidos que tienen morfolino, ciclohexenilo, ciclohexilo, tetrahidropiraniolo, miméticos de azúcar biciclo o triciclo, por ejemplo, unidades de azúcar sin furanosa. El mimético de nucleótido incluye aquellas estructuras usadas para reemplazar el nucleósido y el enlace en una o más posiciones de un compuesto oligomérico como, por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos o morfolinos (morfolinos ligados por -N(H)-C(=O)-O- u otro enlace no fosfodiéster). El sustituto de azúcar se superpone con el mimético de nucleósido de término ligeramente más amplio, pero se pretende que indique el reemplazo de la unidad de azúcar (anillo de furanosa) solamente. Los anillos de tetrahidropiraniolo proporcionados en la presente son ilustrativos de un ejemplo de un sustituto de azúcar en donde el grupo de azúcar de furanosa ha sido reemplazado un sistema de anillo de tetrahidropiraniolo.

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

20 "Compuesto oligomérico" u "oligómero" significa un polímero de subunidades monoméricas enlazadas que es capaz de hibridar con por lo menos una región de una molécula de ácido nucleico.

25 "Oligonucleótido" significa un polímero de nucleósidos ligados cada uno de los cuales puede estar modificado o sin modificar, uno independiente del otro.

30 "Administración parenteral" significa la administración a través de inyección o infusión. La administración parenteral incluye administración subcutánea, administración intravenosa, administración intramuscular, administración intraarterial, administración intraperitoneal o administración intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intracerebroventricular.

"Péptido" significa una molécula formada ligando por lo menos dos aminoácidos por enlaces amida. Péptido se refiere a polipéptidos y proteínas.

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

40 "Enlace de fosforotioato" significa un enlace entre nucleósidos donde el enlace de fosfodiéster se modifica reemplazando uno de los átomos de oxígeno no puente por un átomo de azufre. Un enlace de fosforotioato (P=S) es un enlace internucleosídico modificado.

45 "Porción" significa un número definido de nucleobases contiguas (es decir, ligadas) de un ácido nucleico. En ciertas realizaciones, una porción es un número definido de nucleobases contiguas de un ácido nucleico objetivo. En ciertas realizaciones, una porción es un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido.

"Oligonucleótido de cadena sencilla" significa un oligonucleótido que no está hibridado con una cadena complementaria.

50 "Específicamente hibridable" se refiere a un compuesto antisentido que tiene un grado suficiente de complementariedad entre un oligonucleótido antisentido y un ácido nucleico objetivo para inducir un efecto deseado, a la vez que muestra efectos mínimos o nulos sobre ácidos nucleicos no objetivo bajo condiciones en las que se desea unión específica, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* y tratamientos terapéuticos.

55 "Direccionamiento" o "dirigido" significa el proceso de diseño y selección de un compuesto antisentido que hibridará específicamente con un ácido nucleico objetivo e inducirá un efecto deseado.

60 "Ácido nucleico objetivo", "ARN objetivo" y "transcrito de ARN objetivo" se refieren todos a un ácido nucleico capaz de ser el objetivo de los compuestos antisentido.

65 "Segmento objetivo" significa la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico objetivo al que se dirige un compuesto antisentido. "Sitio objetivo 5' " se refiere al nucleótido más 5' de un segmento objetivo. "sitio objetivo 3' " se refiere al nucleótido más 3 de un segmento objetivo.

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

5 "Tratar" se refiere a administrar una composición farmacéutica para efectuar una alteración o mejora de una enfermedad, trastorno o afección.

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

Ciertas Realizaciones

15 Ciertas realizaciones proporcionadas en la presente se refieren a métodos para disminuir la expresión de ARN y/o proteína de MALAT-1 en un animal.

20 Ciertas realizaciones proporcionan métodos para el tratamiento o mejora de enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con MALAT-1, como cáncer, en un animal con necesidad de ello. En varias realizaciones, el cáncer puede ser cáncer de colon, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de hígado y/o cáncer de próstata.

Ciertas realizaciones proporcionan el uso de un inhibidor específico de MALAT-1 para tratar cáncer en un animal administrando un inhibidor específico de MALAT-1, como ácidos nucleicos (incluyendo compuestos antisentido) capaces de reducir los niveles de ARN de MALAT-1 y/o proteína de MALAT-1.

25 Ciertas realizaciones proporcionan métodos para tratar el cáncer en un animal, que comprenden administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor específico de MALAT-1. En ciertas realizaciones, el animal es un humano.

30 En ciertas realizaciones, el inhibidor específico de MALAT-1 es un compuesto antisentido. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido es un oligonucleótido modificado.

En ciertas realizaciones, el inhibidor específico de MALAT-1 es un ácido nucleico. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico es un oligonucleótido modificado.

35 En ciertas realizaciones, el inhibidor específico de MALAT-1 es un oligonucleótido modificado.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados.

40 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado es un oligonucleótido de cadena sencilla.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste de 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleósidos ligados.

45 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que es un 80%, 85%, 90%, 95% o 100% complementaria a un ácido nucleico de MALAT-1 humano.

50 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado comprende por lo menos un enlace internucleosídico modificado. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico modificado es un enlace internucleosídico de fosforotioato.

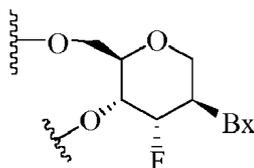
En ciertas realizaciones, por lo menos un nucleósido del oligonucleótido modificado comprende un azúcar modificado. En ciertas realizaciones, el azúcar modificado es un azúcar bicíclico. En ciertas realizaciones, el azúcar bicíclico comprende un puente 4'-CH(CH₃)-O-2'.

55 En ciertas realizaciones, el azúcar modificado comprende un grupo 2'-O-metoxietilo.

En ciertas realizaciones, por lo menos un nucleósido del oligonucleótido modificado comprende una nucleobase modificada. En ciertas realizaciones, la nucleobase modificada es una 5'-metilcitosina.

60 En ciertas realizaciones, por lo menos un nucleósido del oligonucleótido modificado comprende por lo menos un nucleósido modificado con tetrahidropirano en donde un anillo de tetrahidropirano reemplaza al anillo de furanosa. En ciertas realizaciones, cada uno de por lo menos un nucleósido modificado con tetrahidropirano tiene la estructura:

65



en la que Bx es una fracción de base heterocíclica opcionalmente protegida.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado del compuesto comprende:

(i) un segmento de hueco que consiste de desoxinucleósidos ligados;

(ii) un segmento de ala 5' que consiste de nucleósidos ligados;

(iii) un segmento de ala 3' que consiste de nucleósidos ligados, en donde el segmento de hueco está situado inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3' y en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado. En algunas de dichas realizaciones, cada citosina en el oligonucleótido modificado es una 5-metilcitosina.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado del compuesto comprende:

(i) un segmento de hueco que consiste de diez desoxinucleósidos ligados;

(ii) un segmento de ala 5' que consiste de cinco nucleósidos ligados;

(iii) un segmento de ala 3' que consiste de cinco nucleósidos unidos, en donde el segmento de hueco está situado inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo; y en donde cada enlace internucleosídico es un enlace de fosforotioato. En algunas de dichas realizaciones, cada citosina en el oligonucleótido modificado es una 5-metilcitosina.

Varias realizaciones descritas en la presente proporcionan métodos que comprenden administrar a un animal que tiene cáncer una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados, en donde el oligonucleótido modificado es por lo menos un 80% complementario a un ácido nucleico de MALAT-1 humano. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado es por lo menos un 90% complementario a un ácido nucleico de MALAT-1 humano. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado es un 100% complementario a un ácido nucleico de MALAT-1 humano.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado está dirigido a un ácido nucleico de MALAT-1 humano que puede seleccionarse de, pero no está limitado a, uno o más de los N° de acceso de GENBANK EF177381.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 1), N° de acceso de GENBANK BK001411.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 2), N° de acceso de GENBANK BQ429080.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 3), N° de acceso de GENBANK BQ428957.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 4), N° de acceso de GENBANK NT_033903.7 truncado de las nucleobases 10569000 a 10582000 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 5), N° de acceso de GENBANK XR_001309.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 6), o N° de acceso de GENBANK NR_002819.2 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 7), N° de acceso de GENBANK NC_000011.9 de las nucleobases 65265233 a 65273940 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 8) o el complemento del mismo, y el N° de acceso de GENBANK AC_000143.1 de las nucleobases 61592326 a 61601033 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 9) o el complemento del mismo.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado está dirigido a un ácido nucleico de MALAT-1 de ratón que puede seleccionarse de, pero no está limitado a, uno o más del N° de acceso de GENBANK NR_002847.2 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 10), N° de acceso de GENBANK FJ209304.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 11), y el complemento del N° de acceso de GENBANK NT_082868.4 truncado de las nucleobases 2689000 a 2699000 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 12).

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido pueden comprender un oligonucleótido modificado que comprende una secuencia de nucleobases por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 96%, por lo menos un 97%, por lo menos un 98%, o por lo menos un 99% complementaria a una porción de longitud igual de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido pueden comprender un oligonucleótido modificado que comprende una secuencia de nucleobases 100% complementaria a una porción de longitud igual de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12.

En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido modificado es un 100% complementaria a una secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12.

Compuestos Antisentido

Los compuestos antisentido proporcionados en la presente se refieren a compuestos oligoméricos capaces de experimentar hibridación con un ácido nucleico objetivo mediante enlaces de hidrógeno. Los ejemplos de compuestos antisentido incluyen compuestos de cadena sencilla y de cadena doble, como oligonucleótidos antisentido, ARNip, ARNhc y miARN.

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

En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de MALAT-1 tiene una longitud de 12 a 30 subunidades. En otras palabras, tales compuestos antisentido son de 12 a 30 subunidades ligadas. En otras realizaciones, el compuesto antisentido está formado por de 8 a 80, 12 a 50, 15 a 30, 18 a 24, 19 a 22 o 20 subunidades ligadas. En ciertas de tales realizaciones, los compuestos antisentido son de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, u 80 subunidades ligadas de longitud, o un intervalo definido por dos cualquiera de los valores anteriores. En algunas realizaciones, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido, y las subunidades ligadas son nucleósidos.

En varias realizaciones, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de MALAT-1 puede tener porciones antisentido de 10 a 50 nucleobases de longitud. Un experto en la técnica apreciará que esto incluye compuestos antisentido que tienen porciones antisentido de 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, o 50 nucleobases de longitud, o cualquier intervalo dentro de los mismos.

En varias realizaciones, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de MALAT-1 puede tener porciones antisentido de 12 a 30 nucleobases de longitud. Un experto en la materia apreciará que esto incluye compuestos antisentido que tienen porciones antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleobases de longitud, o cualquier intervalo dentro de los mismos.

En algunas realizaciones, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de MALAT-1 puede tener porciones antisentido de 12 ó 13 a 24 nucleobases de longitud. Un experto en la técnica apreciará que esto incluye compuestos antisentido que tienen porciones antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 nucleobases de longitud, o cualquier intervalo dentro de los mismos.

En algunas realizaciones, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de MALAT-1 puede tener porciones antisentido de 19 a 23 nucleobases de longitud. Un experto en la técnica apreciará que esto incluye compuestos antisentido que tienen porciones antisentido de 19, 20, 21, 22, o 23 bases nucleotídicas de longitud, o cualquier intervalo dentro de los mismos.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de MALAT-1 pueden acortarse o truncarse. Por ejemplo, una subunidad individual puede eliminarse del extremo 5' (truncamiento 5'), o alternativamente del extremo 3' (truncamiento 3'). Un compuesto antisentido acortado o truncado dirigido a un ácido nucleico de MALAT-1 puede tener dos subunidades eliminadas del extremo 5', o alternativamente puede tener dos subunidades eliminadas del extremo 3', del compuesto antisentido. Alternativamente, los nucleósidos eliminados pueden dispersarse a través del compuesto antisentido, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene un nucleósido eliminado del extremo 5' y un nucleósido eliminado del extremo 3'.

Cuando hay una única subunidad adicional en un compuesto antisentido alargado, la subunidad adicional puede estar localizada en el extremo 5' o 3' del compuesto antisentido. Cuando están presentes dos o más subunidades adicionales, las subunidades añadidas pueden estar adyacentes entre sí, por ejemplo, en un

compuesto antisentido que tiene dos subunidades añadidas al extremo 5' (adición 5'), o alternativamente al extremo 3' (adición 3'), del compuesto antisentido. Alternativamente, las subunidades añadidas pueden dispersarse a través del compuesto antisentido, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene una subunidad añadida al extremo 5' y una subunidad añadida al extremo 3'.

5 Es posible aumentar o disminuir la longitud de un compuesto antisentido, tal como un oligonucleótido antisentido, y/o introducir malapareamientos sin eliminar la actividad. Por ejemplo, en Woolf et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992)), se probaron una serie de oligonucleótidos antisentido de 13-25 nucleobases de longitud para determinar su capacidad para inducir la escisión de un ARN objetivo en un modelo de inyección de oocitos. Los oligonucleótidos antisentido de 25 nucleobases de longitud con 8 ó 11 bases malapareadas cerca de los extremos de los oligonucleótidos antisentido eran capaces de dirigir la escisión específica del ARNm objetivo, aunque en menor medida que los oligonucleótidos antisentido que no contenían malapareamientos. De manera similar, se logró la escisión específica del objetivo usando oligonucleótidos antisentido de 13 nucleobases, incluyendo aquellas con 1 ó 3 malapareamientos.

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

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

Ciertos Motivos y Mecanismos de Compuestos Antisentido

30 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido han modificado químicamente subunidades dispuestas en patrones, o motivos, para conferir a los compuestos antisentido propiedades tales como actividad inhibitora mejorada, afinidad de unión aumentada para un ácido nucleico objetivo, o resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*. Los compuestos antisentido quiméricos contienen típicamente por lo menos una región modificada para conferir una resistencia aumentada a la degradación de nucleasa, una captación celular aumentada, una afinidad de unión aumentada para el ácido nucleico objetivo y/o actividad inhibitora aumentada. Una segunda región de un compuesto antisentido quimérico puede conferir otra propiedad deseada, por ejemplo, servir como un sustrato para la RNasa H de endonucleasa celular, que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN.

40 La actividad antisentido puede ser resultado de cualquier mecanismo que implica la hibridación del compuesto antisentido (por ejemplo, oligonucleótido) con un ácido nucleico objetivo, en el que la hibridación finalmente da como resultado un efecto biológico. En ciertas realizaciones, la cantidad y/o actividad del ácido nucleico objetivo está modulada. En ciertas realizaciones, la cantidad y/o actividad del ácido nucleico objetivo se reduce. En ciertas realizaciones, la hibridación del compuesto antisentido con el ácido nucleico objetivo finalmente da como resultado la degradación del ácido nucleico objetivo. En ciertas realizaciones, la hibridación del compuesto antisentido con el ácido nucleico objetivo no da como resultado la degradación del ácido nucleico objetivo. En ciertas de tales realizaciones, la presencia del compuesto antisentido hibridado con el ácido nucleico objetivo (ocupación) da como resultado una modulación de la actividad antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido que tienen un motivo químico particular o patrón de modificaciones químicas son particularmente adecuados para explotar uno o más mecanismos. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido funcionan a través de más de un mecanismo y/o a través de mecanismos que no se han elucidado. Por consiguiente, los compuestos antisentido descritos en la presente no están limitados por mecanismos particulares.

50 Los mecanismos antisentido incluyen, sin limitación, antisentido mediado por RNasa H; mecanismos de ARNi, que utilizan la vía de RISC e incluyen, sin limitación, mecanismos de ARNip, ARNmc y microARN; y mecanismos basados en la ocupación. Ciertos compuestos antisentido pueden actuar a través de más de uno de tales mecanismos y/o a través de mecanismos adicionales.

Antisentido Mediado por RNasa H

60 En ciertas realizaciones, la actividad antisentido es resultado por lo menos en parte de la degradación del ARN objetivo por la RNasa H. La RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. Se sabe en la técnica que los compuestos antisentido de cadena sencilla que son "tipo ADN" provocan actividad de RNasa H en células mamíferas. Por consiguiente, los compuestos antisentido que comprenden por lo menos una porción de ADN o nucleósidos de tipo ADN pueden activar la RNasa H, dando como resultado la escisión del ácido nucleico objetivo. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido que utilizan

RNasa H comprenden uno o más nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, tales compuestos antisentido comprenden por lo menos un bloque de 1-8 nucleósidos modificados. En ciertas de tales realizaciones, los nucleósidos modificados no soportan la actividad RNasa H. En ciertas realizaciones, tales compuestos antisentido son gapmers, como se describe en la presente. En ciertas de dichas realizaciones, el hueco del gapmer comprende nucleósidos de ADN. En ciertas de tales realizaciones, el hueco del gapmer comprende nucleósidos tipo ADN. En ciertas de tales realizaciones, el hueco del gapmer comprende nucleósidos de ADN y nucleósidos de tipo ADN.

Ciertos compuestos antisentido que tienen un motivo gapmer se consideran compuestos antisentido quiméricos. En un gapmer una región interna que tiene una pluralidad de nucleótidos que soportan la escisión de RNasaH se coloca entre regiones externas que tienen una pluralidad de nucleótidos que son químicamente distintos de los nucleósidos de la región interna. En el caso de un oligonucleótido antisentido que tiene un motivo gapmer, el segmento hueco generalmente sirve como sustrato para la escisión de endonucleasa, mientras que los segmentos ala comprenden nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, las regiones de un gapmer se diferencian por los tipos de fracciones de azúcar que comprenden cada región distinta. Los tipos de fracciones de azúcar que se usan para diferenciar las regiones de un gapmer pueden en algunas realizaciones incluir β -D-ribonucleósidos, β -D-desoxirribonucleósidos, nucleósidos 2'-modificados (tales nucleósidos 2'-modificados pueden incluir 2'-MOE y 2'-O-CH₃, entre otros), y nucleósidos modificados con azúcar bicíclico (tales nucleósidos modificados con azúcar bicíclico pueden incluir aquellos que tienen un etilo restringido). En ciertas realizaciones, los nucleósidos en las alas pueden incluir varias fracciones de azúcar modificadas, incluyendo, por ejemplo, 2'-MOE y fracciones de azúcar bicíclico como etilo o LNA restringido. En ciertas realizaciones, las alas pueden incluir varias fracciones de azúcar modificadas y no modificadas. En ciertas realizaciones, las alas pueden incluir varias combinaciones de nucleósidos 2'-MOE, fracciones de azúcar bicíclico como nucleósidos de etilo o nucleósidos de LNA restringidos, y 2'-desoxinucleósidos.

Cada región distinta puede comprender fracciones de azúcar uniformes, variantes o fracciones de azúcar alternas. El motivo ala-espacio-ala se describe frecuentemente como "X-Y-Z", donde "X" representa la longitud del ala 5', "Y" representa la longitud del hueco, y "Z" representa la longitud del ala 3'. "X" y "Z" pueden comprender fracciones de azúcar uniformes, variantes o alternas. En ciertas realizaciones, "X" e "Y" pueden incluir uno o más 2'-desoxinucleósidos. "Y" puede comprender 2'-desoxinucleósidos. Como se usa en la presente, un gapmer descrito como "X-Y-Z" tiene una configuración tal que el hueco está colocado inmediatamente adyacente a cada una de las alas 5' y 3'. Por tanto, no existen nucleótidos intervinientes entre el ala 5' y el hueco, o el hueco y el ala 3'. Cualquiera de los compuestos antisentido descritos en la presente puede tener un motivo gapmer. En ciertas realizaciones, "X" y "Z" son iguales; en otras realizaciones, son diferentes. En ciertas realizaciones, "Y" está entre 8 y 15 nucleósidos. X, Y o Z pueden ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o más nucleósidos.

En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de MALAT-1 tiene un motivo gapmer en el que el hueco consiste de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleósidos ligados.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido tiene un motivo de azúcar descrito por la Fórmula A como sigue: $(J)_m-(B)_n-(J)_p-(B)_r-(A)_t-(D)_g-(A)_v-(B)_w-(J)_x-(B)_y-(J)_z$ en donde:

cada A es independientemente un nucleósido 2'-sustituido;
 cada B es independientemente un nucleósido bicíclico;
 cada J es independientemente un nucleósido 2'-sustituido o un 2'-desoxinucleósido;
 cada D es un 2'-desoxinucleósido;
 m es 0-4; n es 0-2; p es 0-2; r es 0-2; t es 0-2; v es 0-2; w es 0-4; x es 0-2; y es 0-2; z es 0-4; g es 6-14;

siempre que:

por lo menos uno de m, n, y r sea distinto de 0;
 por lo menos uno de w e y sea distinto de 0;
 la suma de m, n, p, r y t sea de 2 a 5; y
 la suma de v, w, x, y, y z sea de 2 a 5.

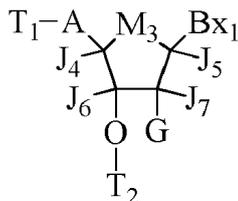
Compuestos de ARNi

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son compuestos de ARN interferente (ARNi), que incluyen compuestos de ARN de cadena doble (también denominados ARN de interferencia corta o ARNip) y compuestos de ARNi de cadena sencilla (o ARNmc). Dichos compuestos funcionan por lo menos en parte a través de la vía RISC para degradar y/o secuestrar un ácido nucleico objetivo (por tanto, incluyen compuestos de microARN/mímicos de microARN). En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido comprenden modificaciones que los hacen particularmente adecuados para tales mecanismos.

i. compuestos de ARNmc

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido incluyendo aquellos particularmente adecuados para uso como compuestos de ARNi de cadena sencilla (ARNmc) comprenden un extremo 5' terminal modificado. En ciertas realizaciones, dicho fosfato modificado está estabilizado (por ejemplo, es resistente a la degradación/escisión en comparación con el 5'-fosfato no modificado). En ciertas realizaciones, dichos nucleósidos 5'-terminales estabilizan la fracción de 5'-fósforo. Ciertos nucleósidos 5'-terminales modificados pueden encontrarse en la técnica, por ejemplo, en la WO/2011/139702.

En ciertas realizaciones, el 5'-nucleósido de un compuesto de ARNmc tiene la Fórmula IIc:



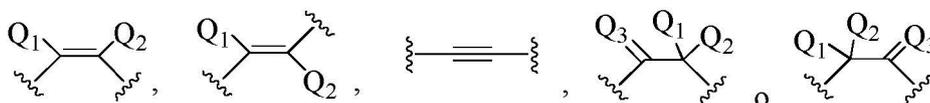
IIc

en la que:

T₁ es una fracción de fósforo opcionalmente protegido;

T₂ es un grupo de enlace internucleosídico que liga el compuesto de Fórmula IIc con el compuesto oligomérico;

A tiene una de las fórmulas:



Q₁ y Q₂ son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆ sustituido, alquenilo C₂-C₆, alquenilo C₂-C₆ sustituido, alquinilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆ sustituido o N(R₃)(R₄);

Q₃ es O, S, N(R₅) o C(R₆)(R₇);

cada R₃, R₄, R₅, R₆ y R₇ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido o alcoxi C₁-C₆;

M₃ es O, S, NR₁₄, C(R₁₅)(R₁₆), C(R₁₅)(R₁₆)C(R₁₇)(R₁₈), C(R₁₅)=C(R₁₇), OC(R₁₅)(R₁₆) o OC(R₁₅)(Bx₂);

R₁₄ es H, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆ sustituido, alquenilo C₂-C₆, alquenilo C₂-C₆ sustituido, alquinilo C₂-C₆ o alquinilo C₂-C₆ sustituido;

R₁₅, R₁₆, R₁₇ y R₁₈ son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆ sustituido, alquenilo C₂-C₆, alquenilo C₂-C₆ sustituido, alquinilo C₂-C₆ o alquinilo C₂-C₆ sustituido;

Bx₁ es una fracción de base heterocíclica;

o si Bx₂ está presente, entonces Bx₂ es una fracción de base heterocíclica y Bx₁ es H, halógeno, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆ sustituido, alquenilo C₂-C₆, alquenilo C₂-C₆ sustituido, alquinilo C₂-C₆ o alquinilo C₂-C₆ sustituido;

J₄, J₅, J₆ y J₇ son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆ sustituido, alquenilo C₂-C₆, alquenilo C₂-C₆ sustituido, alquinilo C₂-C₆ o alquinilo C₂-C₆ sustituido;

o J_4 forma un puente con uno de J_5 o J_7 en donde dicho puente comprende de 1 a 3 grupos birradicales ligados seleccionados de O, S, NR_{19} , $C(R_{20})(R_{21})$, $C(R_{20})=C(R_{21})$, $C[=C(R_{20})(R_{21})]$ y $C(=O)$ y los otros dos de J_5 , J_6 y J_7 son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 sustituido, alqueno C_2-C_6 , alqueno C_2-C_6 sustituido, alquino C_2-C_6 o alquino C_2-C_6 sustituido;

cada R_{19} , R_{20} y R_{21} es, independientemente, H, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 sustituido, alqueno C_2-C_6 , alqueno C_2-C_6 sustituido, alquino C_2-C_6 o alquino C_2-C_6 sustituido;

G es H, OH, halógeno u $O-[C(R_8)(R_9)]_n-[(C=O)_m-X_1]-Z$;

cada R_8 y R_9 es, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido;

X_1 es O, S o $N(E_1)$;

Z es H, halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alqueno C_2-C_6 , alqueno C_2-C_6 sustituido, alquino C_2-C_6 , alquino C_2-C_6 sustituido o $N(E_2)(E_3)$;

E_1 , E_2 y E_3 son cada uno, independientemente, H, alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido;

n es de 1 a aproximadamente 6;

m es 0 ó 1;

j es 0 ó 1;

cada grupo sustituido comprende uno o más grupos sustituyentes opcionalmente protegidos seleccionados independientemente de halógeno, OJ_1 , $N(J_1)(J_2)$, $=NJ_1$, SJ_1 , N_3 , CN , $OC(=X_2)J_1$, $OC(=X_2)N(J_1)(J_2)$ y $C(=X_2)N(J_1)(J_2)$;

X_2 es O, S o NJ_3 ;

cada J_1 , J_2 y J_3 es, independientemente, H o alquilo C_1-C_6 ;

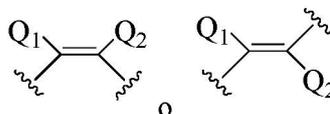
cuando j es 1 entonces Z es distinto de halógeno o $N(E_2)(E_3)$; y

en donde dicho compuesto oligomérico comprende de 8 a 40 subunidades monoméricas y es hibridable a por lo menos una porción de un ácido nucleico objetivo.

En ciertas realizaciones, M_3 es O, $CH=CH$, OCH_2 o $OC(H)(BX_2)$. En ciertas realizaciones, M_3 es O.

En ciertas realizaciones, J_4 , J_5 , J_6 y J_7 son cada uno H. En ciertas realizaciones, J_4 forma un puente con uno de J_5 o J_7 .

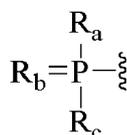
En ciertas realizaciones, A tiene una de las fórmulas:



en las que:

Q_1 y Q_2 son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6 o alcoxi C_1-C_6 sustituido. En ciertas realizaciones, Q_1 y Q_2 son cada uno H. En ciertas realizaciones, Q_1 y Q_2 son cada uno, independientemente, H o halógeno. En ciertas realizaciones, Q_1 y Q_2 es H y el otro de Q_1 y Q_2 es F, CH_3 o OCH_3 .

En ciertas realizaciones, T_1 tiene la fórmula:

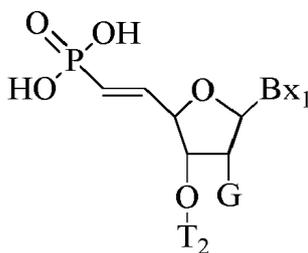


en la que:

R_a y R_c son cada uno, independientemente, hidroxilo protegido, tiol protegido, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6 o alcoxi C_1-C_6 sustituido, amino protegido o amino sustituido; y
 R_b es O o S. En ciertas realizaciones, R_b es O y R_a y R_c son cada uno, independientemente, OCH_3 , OCH_2CH_3 o $CH(CH_3)_2$.

En ciertas formas de realización, G es halógeno, OCH_3 , OCH_2F , $OCHF_2$, OCF_3 , OCH_2CHE_3 , $O(CH_2)_2F$, OCH_2CHF_2 , OCH_2CF_3 , $OCH_2-CH=CH_2$, $O(CH_2)_2-OCH_3$, $O(CH_2)_2-SCH_3$, $O(CH_2)_2-OCF_3$, $O(CH_2)_3-N(R_{10})(R_{11})$, $O(CH_2)_2-ON(R_{10})(R_{11})$, $O(CH_2)_2-O(CH_2)_2-N(R_{10})(R_{11})$, $OCH_2C(=O)-N(R_{10})(R_{11})$, $OCH_2C(=O)-N(R_{12})-(CH_2)_2-N(R_{10})(R_{11})$ u $O(CH_2)_2-N(R_{12})-C(=NR_{13})[N(R_{10})(R_{11})]$ en donde R_{10} , R_{11} , R_{12} y R_{13} son cada uno, independientemente, H o alquilo C_1-C_6 . En ciertas realizaciones, G es halógeno, OCH_3 , OCF_3 , OCH_2CH_3 , OCH_2CF_3 , $OCH_2-CH=CH_2$, $O(CH_2)_2-OCH_3$, $O(CH_2)_2-O(CH_2)_2-N(CH_3)_2$, $OCH_2C(=O)-N(H)CH_3$, $OCH_2C(=O)-N(H)-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$ u $OCH_2-N(H)-C(=NH)NH_2$. En ciertas realizaciones, G es F, OCH_3 u $O(CH_2)_2-OCH_3$. En ciertas realizaciones, G es $O(CH_2)_2-OCH_3$.

En ciertas realizaciones, el nucleósido 5'-terminal tiene la Fórmula IIe:



IIe

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido, incluyendo aquellos particularmente adecuados para ARNm comprenden uno o más tipos de fracciones de azúcar modificado y/o fracciones de azúcar de origen natural dispuestas a lo largo de un oligonucleótido o región del mismo en un patrón definido o motivo de modificación de azúcar. Dichos motivos pueden incluir cualquiera de las modificaciones de azúcar tratadas en la presente y/o otras modificaciones de azúcar conocidas.

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden o consisten de una región que tiene modificaciones de azúcar uniformes. En ciertas de tales realizaciones, cada nucleósido de la región comprende la misma modificación de azúcar tipo ARN. En ciertas realizaciones, cada nucleósido de la región es un nucleósido 2'-F. En ciertas realizaciones, cada nucleósido de la región es un nucleósido 2'-OMe. En ciertas realizaciones, cada nucleósido de la región es un nucleósido 2'-MOE. En ciertas realizaciones, cada nucleósido de la región es un nucleósido cEt. En ciertas realizaciones, cada nucleósido de la región es un nucleósido LNA. En ciertas realizaciones, la región uniforme constituye todo o esencialmente todo el oligonucleótido. En ciertas realizaciones, la región constituye el oligonucleótido completo excepto por 1-4 nucleósidos terminales.

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden una o más regiones de modificaciones de azúcar alternas, en donde los nucleósidos alternan entre nucleótidos que tienen una modificación de azúcar de un primer tipo y nucleótidos que tienen una modificación de azúcar de un segundo tipo. En ciertas realizaciones, los nucleósidos de ambos tipos son nucleósidos tipo ARN. En ciertas realizaciones, los nucleósidos alternos se seleccionan de: 2'-OMe, 2'-F, 2'-MOE, LNA y cEt. En ciertas realizaciones, las modificaciones alternas son 2'-F y 2'-OMe. Tales regiones pueden ser contiguas o pueden estar interrumpidas por nucleósidos modificados de manera diferente o nucleósidos conjugados.

En ciertas realizaciones, la región alterna de las modificaciones alternas consiste cada una de un único nucleósido (es decir, el patrón es $(AB)_x A_y$ donde A es un nucleósido que tiene una modificación de azúcar de un primer tipo y B es un nucleósido que tiene una modificación de azúcar de un segundo tipo; x es 1-20 e y es 0 ó 1). En ciertas realizaciones, una o más regiones alternas en un motivo alterno incluyen más de un único nucleósido de un tipo. Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden incluir una o más regiones de cualquiera de los siguientes motivos de nucleósidos:

AABBAA;
 ABBABB;
 AABAAB;
 ABBABAABB;
 ABABAA;

AABABAB;
 ABABAA;
 ABBAABBABABAA;
 BABBAABBABABAA; o
 ABABBAABBABABAA;

5

donde A es un nucleósido de un primer tipo y B es un nucleósido de un segundo tipo. En ciertas realizaciones, A y B se seleccionan cada uno de 2'-F, 2'-OMe, BNA y MOE.

10 En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos que tienen dicho motivo alterno también comprenden un nucleósido 5' terminal modificado, como los de fórmula IIc o IIe.

15 En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden una región que tiene un motivo 2-2-3. Tales regiones comprenden el siguiente motivo:



en donde: A es un primer tipo de nucleósido modificado;
 B y C son nucleósidos que están modificados de manera diferente que A, sin embargo, B y C pueden tener las mismas o diferentes modificaciones entre sí;
 x e y son de 1 a 15.

20 En ciertas realizaciones, A es un nucleósido modificado 2'-OMe. En ciertas realizaciones, B y C son ambos nucleósidos modificados 2'-F. En ciertas realizaciones, A es un nucleósido modificado 2'-OMe y B y C son ambos nucleósidos modificados 2'-F.

25

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos tienen el siguiente motivo de azúcar:

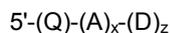


30

en donde:

35 Q es un nucleósido que comprende una fracción de fosfato estabilizado. En ciertas realizaciones, Q es un nucleósido que tiene la Fórmula IIc o IIe;
 A es un primer tipo de nucleósido modificado;
 B es un segundo tipo de nucleósido modificado;
 D es un nucleósido modificado que comprende una modificación diferente del nucleósido adyacente a él. Por tanto, si y es 0, entonces D debe modificarse de manera diferente que B y si y es 1, entonces D debe modificarse de manera diferente que A. En ciertas realizaciones, D difiere de A y B.
 40 X es 5-15;
 Y es 0 o 1;
 Z es 0-4.

45 En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos tienen el siguiente motivo de azúcar:



en donde:

50 Q es un nucleósido que comprende una fracción de fosfato estabilizado. En ciertas realizaciones, Q es un nucleósido que tiene la Fórmula IIc o IIe;
 A es un primer tipo de nucleósido modificado;
 D es un nucleósido modificado que comprende una modificación diferente de A.
 55 X es 11-30;
 Z es 0-4.

60 En ciertas realizaciones, A, B, C y D en los motivos anteriores se seleccionan de: 2'-OMe, 2'-F, 2'-MOE, LNA y cEt. En ciertas realizaciones, D representa nucleósidos terminales. En ciertas realizaciones, dichos nucleósidos terminales no están diseñados para hibridar con el ácido nucleico objetivo (aunque uno o más podrían hibridar por casualidad). En ciertas realizaciones, la nucleobase de cada nucleósido D es adenina, independientemente de la identidad de la nucleobase en la posición correspondiente del ácido nucleico objetivo. En ciertas realizaciones, la nucleobase de cada nucleósido D es timina.

65 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido, que incluyen aquellos particularmente adecuados para uso como enlaces internucleosídicos modificados que comprenden ARNmc dispuestos a lo largo del oligonucleótido

o la región del mismo en un patrón definido o motivo de enlace internucleosídico modificado. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden una región que tiene un motivo de enlace internucleosídico alterno. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden una región de enlaces internucleosídicos modificados uniformemente. En ciertas de tales realizaciones, el oligonucleótido comprende una región que está ligada uniformemente por enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido se liga uniformemente mediante enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico del oligonucleótido se selecciona de fosfodiéster y fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico del oligonucleótido se selecciona de fosfodiéster y fosforotioato y por lo menos un enlace internucleosídico es fosforotioato.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende por lo menos 6 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende por lo menos 8 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende por lo menos 10 enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende por lo menos un bloque de por lo menos 6 enlaces internucleosídicos de fosforotioato consecutivos. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende por lo menos un bloque de por lo menos 8 enlaces internucleosídicos de fosforotioato consecutivos. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende por lo menos un bloque de por lo menos 10 enlaces internucleosídicos de fosforotioato consecutivos. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende por lo menos un bloque de por lo menos 12 enlaces internucleosídicos de fosforotioato consecutivos. En ciertas de tales realizaciones, por lo menos uno de tales bloques está localizado en el extremo 3' del oligonucleótido. En ciertas de tales realizaciones, por lo menos uno de dichos bloques está localizado dentro de 3 nucleósidos del extremo 3' del oligonucleótido.

Los oligonucleótidos que tienen cualquiera de los varios motivos de azúcar descritos en la presente, pueden tener cualquier motivo de enlace. Por ejemplo, los oligonucleótidos, incluyendo, pero no limitados a, los descritos anteriormente, pueden tener un motivo de enlace seleccionado de la siguiente tabla no limitativa:

Enlace más 5'	Región central	Región 3'-
PS	PO/PS alterno	6 PS
PS	PO/PS alterno	7 PS
PS	PO/PS alterno	8 PS

ii. Compuestos de ARNip

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son compuestos de ARNi de cadena doble (ARNip). En tales realizaciones, una o ambas cadenas pueden comprender cualquier motivo de modificación descrito anteriormente para ARNmc. En ciertas realizaciones, los compuestos de ARNmc pueden ser RNA no modificado. En ciertas realizaciones, los compuestos de ARNip pueden comprender nucleósidos de ARN no modificados, pero enlaces internucleosídicos modificados.

Varias realizaciones se refieren a composiciones de cadena doble en las que cada cadena comprende un motivo definido por la localización de uno o más nucleósidos modificados o no modificados. En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden un primer y un segundo compuesto oligomérico que están hibridados completamente o al menos parcialmente para formar una región dúplex y que comprenden además una región que es complementaria e hibrida con un objetivo de ácido nucleico. Es adecuado que tal composición comprenda un primer compuesto oligomérico que es una cadena antisentido que tiene complementariedad total o parcial con un objetivo de ácido nucleico y un segundo compuesto oligomérico que es una cadena de sentido que tiene una o más regiones de complementariedad y forme por lo menos un región dúplex con el primer compuesto oligomérico.

Las composiciones de varias realizaciones modulan la expresión génica hibridando con un objetivo de ácido nucleico que da como resultado la pérdida de su función normal. En algunas realizaciones, el ácido nucleico objetivo es MALAT-1. En cierta realización, la degradación del MALAT-1 objetivo se ve facilitada por un complejo RISC activado que se forma con las composiciones de la invención.

Varias realizaciones están dirigidas a composiciones de cadena doble en las que una de las cadenas es útil, por ejemplo, en influenciar la carga preferente de la cadena opuesta en el complejo RISC (o escisión). Las composiciones son útiles para dirigir moléculas de ácido nucleico seleccionadas y modular la expresión de uno o más genes. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención hibridan con una porción de un ARN objetivo dando como resultado la pérdida de la función normal del ARN objetivo.

Ciertas realizaciones se perfilan para composiciones de cadena doble en las que ambas cadenas

comprenden un motivo de hemímero, un motivo completamente modificado, un motivo posicionalmente modificado o un motivo alterno. Cada cadena de las composiciones de la presente invención puede modificarse para cumplir un papel particular en, por ejemplo, la vía de ARNip. Usar un motivo diferente en cada cadena o el mismo motivo con diferentes modificaciones químicas en cada cadena permite dirigir la cadena antisentido para el complejo RISC a la vez que se inhibe la incorporación de la cadena de sentido. Dentro de este modelo, cada cadena puede modificarse de manera independiente de modo que se mejore para su función particular. La cadena antisentido puede modificarse en el extremo 5' para mejorar su papel en una región del RISC mientras que el extremo 3' puede modificarse diferencialmente para mejorar su papel en una región diferente del RISC.

Las moléculas de oligonucleótidos de cadena dobles pueden ser una molécula de polinucleótidos de cadena doble que comprende regiones de sentido y antisentido auto-complementarias, en donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico objetivo o una porción de la misma y la región de sentido tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico objetivo o una porción de la misma. Las moléculas de oligonucleótidos cadena doble pueden ensamblarse a partir de dos oligonucleótidos separados, donde una cadena es la cadena de sentido y la otra es la cadena antisentido, en donde las cadenas sentido y antisentido son auto-complementarias (es decir, cada cadena comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en la otra cadena; como cuando la cadena antisentido y la cadena sentido forman una estructura dúplex o de cadena doble, por ejemplo, en donde la región de cadena doble es de aproximadamente 15 a aproximadamente 30, por ejemplo, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 pares de bases; la cadena antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico objetivo o una porción de la misma y la cadena de sentido comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico objetivo o una porción de la misma (por ejemplo, de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 o más nucleótidos de la molécula de oligonucleótido de cadena doble son complementarios al ácido nucleico objetivo o a una porción del mismo). Alternativamente, el oligonucleótido de cadena doble se ensambla a partir de un oligonucleótido individual, donde las regiones de sentido y antisentido auto-complementarias del ARNip están ligadas por medio de un conector(es) a base de ácidos nucleicos o a base de no ácidos nucleicos.

El oligonucleótido de cadena doble puede ser un polinucleótido con una estructura secundaria dúplex, dúplex asimétrica, horquilla o horquilla asimétrica, que tiene regiones de sentido y antisentido auto-complementarias, en donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico separada o una porción de la misma y la región de sentido tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico objetivo o una porción de la misma. El oligonucleótido de cadena doble puede ser un polinucleótido de cadena sencilla circular que tiene dos o más estructuras de giro y un vástago que comprende regiones de sentido y antisentido auto-complementarias, en donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico objetivo o una porción de la misma y la región de sentido tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico objetivo o una porción de la misma, y en donde el polinucleótido circular puede procesarse o in vivo o in vitro para generar una molécula de ARNip activa capaz de mediar ARNi.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido de cadena doble comprende secuencias o regiones de sentido y antisentido separadas, en donde las regiones sentido y antisentido están ligadas covalentemente por moléculas conectoras de nucleótidos o no nucleótidos como se conoce en la técnica, o están alternativamente ligadas no covalentemente mediante interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones hidrófobas y/o interacciones de apilamiento. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido de cadena doble comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de un gen objetivo. En otra realización, el oligonucleótido de cadena doble interacciona con la secuencia de nucleótidos de un gen objetivo de una manera que provoca la inhibición de la expresión del gen objetivo.

Como se usa en la presente, los oligonucleótidos de cadena doble no necesitan estar limitados a las moléculas que contienen solo ARN, sino que abarcan además nucleótidos y no nucleótidos químicamente modificados. En ciertas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico interferentes cortas carecen de nucleótidos que contienen 2'-hidroxi (2'-OH). En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos interferentes cortos no incluyen opcionalmente ningún ribonucleótido (por ejemplo, nucleótidos que tengan un grupo 2'-OH). Dichos oligonucleótidos de cadena doble que no requieren la presencia de ribonucleótidos dentro de la molécula para soportar ARNi pueden sin embargo tener un conector o conectores unidos u otros grupos, fracciones o cadenas unidos o asociados que contienen uno o más nucleótidos con grupos 2'-OH. Opcionalmente, los oligonucleótidos de cadena doble pueden comprender ribonucleótidos en aproximadamente el 5, 10, 20, 30, 40, o 50% de las posiciones de nucleótidos. Como se usa en la presente, el término ARNip pretende ser equivalente a otros términos usados para describir moléculas de ácido nucleico que son capaces de mediar ARNi específico de la secuencia, por ejemplo, ARN corto interferente (ARNip), ARNA de cadena doble (ARNcd), micro-RNA (ARNmi), ARN de horquilla corta (ARNhc), oligonucleótido interferente corto, ácido nucleico interferente corto, oligonucleótido modificado interferente corto, ARNip químicamente modificado, ARN silenciador de genes postranscripcional (ARNptgs) y otros. Adicionalmente, como se

5
10
usa en la presente, el término ARNi pretende ser equivalente a otros términos usados para describir la interferencia de ARN específica de la secuencia, como silenciamiento génico postranscripcional, inhibición traduccional o epigenética. Por ejemplo, los oligonucleótidos de cadena doble pueden usarse para silenciar epigenéticamente genes tanto a nivel post-transcripcional como a nivel pre-transcripcional. En un ejemplo no limitativo, la regulación epigenética de la expresión génica por moléculas de ARNi de la invención puede resultar de la modificación mediada por ARNi de la estructura de la cromatina o del patrón de metilación para alterar la expresión génica (ver, por ejemplo, Verdel et al., 2004, Science, 303, 672-676; Pal-Bhadra et al., 2004, Science, 303, 669-672; Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218; y Hall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237).

15
20
Se contempla que los compuestos y composiciones de varias realizaciones proporcionadas en la presente puedan dirigirse a MALAT-1 mediante un silenciamiento génico mediado por ARNcd o mecanismo de ARNi, incluyendo, por ejemplo, moléculas efectoras de ARN de cadena doble de "horquilla" o vástago-giro en las que una única cadena de ARN con secuencias auto-complementarias es capaz de asumir una conformación de cadena doble, o moléculas efectoras de ARNcd dúplex que comprenden dos cadenas separadas de ARN. En varias realizaciones, el ARNcd consiste completamente de ribonucleótidos o consiste de una mezcla de ribonucleótidos y desoxinucleótidos, como los híbridos de ARN/ADN divulgados, por ejemplo, por la WO 00/63364, presentada el 19 de abril de 2000, o la U.S. N° de Serie 60/130.377, presentada el 21 de abril de 1999. El ARNcd o la molécula efectora de ARNcd puede ser una sola molécula con una región de auto-complementariedad tal que los nucleótidos en un segmento de la base de la molécula se emparejan con nucleótidos en otro segmento de la molécula. En varias realizaciones, un ARNcd que consiste en una sola molécula consiste completamente en ribonucleótidos o incluye una región de ribonucleótidos que es complementaria a una región de desoxirribonucleótidos. Alternativamente, el ARNcd puede incluir dos cadenas diferentes que tienen una región de complementariedad entre sí.

25
30
35
En varias realizaciones, ambas cadenas consisten completamente de ribonucleótidos, una cadena consiste completamente de ribonucleótidos y una cadena consiste completamente de desoxirribonucleótidos, o una o ambas cadenas contienen una mezcla de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. En ciertas realizaciones, las regiones de complementariedad son por lo menos un 70, 80, 90, 95, 98 o 100% complementarias entre sí y con una secuencia de ácido nucleico objetivo. En ciertas realizaciones, la región del ARNcd que está presente en una conformación de cadena doble incluye por lo menos 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 50, 75, 100, 200, 500, 1000, 2000 o 5000 nucleótidos o incluye todos los nucleótidos en un ADNc u otra secuencia de ácido nucleico objetivo representada en el ARNcd. En algunas realizaciones, el ARNcd no contiene ninguna región de cadena sencilla, como extremos de cadena sencilla, o el ARNcd es una horquilla. En otras realizaciones, el ARNcd tiene una o más regiones de cadena sencilla o sobresale. En ciertas realizaciones, los híbridos de ARN/ADN incluyen una cadena o región de ADN que es una cadena o región antisentido (por ejemplo, tiene por lo menos un 70, 80, 90, 95, 98 o 100% de complementariedad con un ácido nucleico objetivo) y una cadena o región de ARN que es una cadena o región de sentido (por ejemplo, tiene por lo menos un 70, 80, 90, 95, 98 o 100% de identidad con un ácido nucleico objetivo), y viceversa.

40
45
50
En varias realizaciones, el híbrido de ARN/ADN se prepara in vitro usando métodos sintéticos enzimáticos o químicos como los descritos en la presente o los descritos en la WO 00/63364, presentada el 19 de abril de 2000, o la U.S. N° de Serie 60/130.377, presentada el 21 de abril de 1999. En otras realizaciones, una cadena de ADN sintetizada in vitro se compleja con una cadena de ARN producida in vivo o in vitro antes, después o simultáneamente con la transformación de la cadena de ADN en la célula. En otras realizaciones más, el ARNcd es un único ácido nucleico circular que contiene una región de sentido y una antisentido, o el ARNcd incluye un ácido nucleico circular y un segundo ácido nucleico circular o un ácido nucleico lineal (ver, por ejemplo, la WO 00/63364, presentada el 19 de abril de 2000, o la U.S. N° de serie 60/130.377, presentada el 21 de abril de 1999). Los ácidos nucleicos circulares ejemplares incluyen estructuras de lariat en las que el grupo 5' fosforilo libre de un nucleótido se liga al grupo 2' hidroxilo de otro nucleótido en una manera de retorno de giro.

55
60
En otras realizaciones, el ARNcd incluye uno o más nucleótidos modificados en los que la posición 2' en el azúcar contiene un halógeno (como un grupo flúor) o contiene un grupo alcoxi (como un grupo metoxi) que aumenta la vida media del ARNcd in vitro o in vivo en comparación con el ARNcd correspondiente en el que la posición 2' correspondiente contiene un hidrógeno o un grupo hidroxilo. En otras realizaciones más, el ARNcd incluye uno o más enlaces entre nucleótidos adyacentes distintos del enlace fosfodiéster de origen natural. Los ejemplos de tales enlaces incluyen enlaces fosforamida, fosfortioato y fosforoditioato. Los ARNcd también pueden ser moléculas de ácido nucleico químicamente modificadas como se enseña en la Patente U.S. N° 6.673.661. En otras realizaciones, el ARNcd contiene una o dos cadenas tapadas, como se describe, por ejemplo, por la WO 00/63364, presentada el 19 de abril de 2000, o la U.S. N° de Serie 60/130.377, presentada el 21 de abril de 1999.

65
En otras realizaciones, el ARNcd puede ser cualquiera de las moléculas de ARNcd por lo menos parcialmente divulgadas en la WO 00/63364, así como cualquiera de las moléculas de ARNcd divulgadas en la Solicitud Provisional U.S. 60/399.998; y la Solicitud Provisional U.S. 60/419.532 y el PCT/US2003/033466. Cualquiera de los ARNcd puede expresarse in vitro o in vivo usando los métodos descritos en la presente o métodos estándar, tales como los descritos en la WO 00/63364.

Ocupación

En ciertas realizaciones, no se espera que los compuestos antisentido den como resultado la escisión o el ácido nucleico objetivo a través de la RNasa H o que den como resultado la escisión o el secuestro a través de la vía de RISC. En ciertas de tales realizaciones, la actividad antisentido puede dar como resultado de la ocupación, en donde la presencia del compuesto antisentido hibridado altera la actividad del ácido nucleico objetivo. En ciertas de tales realizaciones, el compuesto antisentido puede modificarse uniformemente o puede comprender una mezcla de modificaciones y/o nucleósidos modificados y no modificados.

10 **Ácidos Nucleicos Objetivo, Regiones Objetivo y Secuencias de Nucleótidos**

"Dirigir" un compuesto oligomérico a una molécula de ácido nucleico particular puede ser un proceso de múltiples pasos. El proceso comienza generalmente con la identificación de un ácido nucleico objetivo cuya función se va a modular. Este ácido nucleico objetivo puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito del gen) cuya expresión está asociada con un trastorno o estado patológico particular, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. En varias realizaciones proporcionadas en la presente, el ácido nucleico objetivo codifica MALAT-1.

Las secuencias de nucleótidos que codifican MALAT-1 humano son ácidos nucleicos objetivo en varias realizaciones que incluyen, sin limitación, las siguientes: N° de acceso GENBANK EF177381.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 1), N° de acceso GENBANK BK001411.1 1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 2), N° de acceso GENBANK BQ429080.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 3), N° de acceso GENBANK BQ428957.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 4), N° de acceso GENBANK NT_033903.7 truncado de las nucleobases 10569000 a 10582000 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 5), N° de acceso GENBANK XR_001309.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 6), o N° de acceso GENBANK NR_002819.2 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 7), N° de acceso GENBANK NC_000011.9 de las nucleobases 65265233 a 65273940 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 8), N° de acceso GENBANK AC_000143.1 de las nucleobases 61592326 a 61601033 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 9).

Las secuencias de nucleótidos que codifican MALAT-1 de ratón son ácidos nucleicos objetivo en varias realizaciones que incluyen, sin limitación, los siguientes: N° de acceso GENBANK NR_002847.2 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 10), N° de acceso GENBANK FJ209304.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 11), y el complemento del N° de acceso GENBANK NT_082868.4 truncado de las nucleobases 2689000 a 2699000 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 12).

Se entiende que la secuencia que expuesta en cada SEQ ID NO en la Descripción Detallada y/o los Ejemplos contenidos en la presente es independiente de cualquier modificación en una fracción de azúcar, un enlace internucleosídico o una nucleobase. Como tales, los compuestos antisentido definidos por una SEQ ID NO pueden comprender, independientemente, una o más modificaciones en una fracción de azúcar, un enlace internucleosídico o una nucleobase. Los compuestos antisentido descritos por el Número Isis (Isis N°) indican una combinación de secuencia de nucleobases y motivo.

El proceso de direccionamiento también incluye habitualmente la determinación de por lo menos una región, segmento o sitio objetivo dentro del ácido nucleico objetivo para que tenga lugar la interacción antisentido de manera que resulte el efecto deseado, por ejemplo, modulación de la expresión. Dentro del contexto de las presentes realizaciones, 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 objetivo hay segmentos. Los "segmentos" se definen como porciones más pequeñas o sub-porciones de regiones dentro de un ácido nucleico objetivo. "Sitios", como se usan en la presente invención, se definen como posiciones dentro de un ácido nucleico objetivo.

El direccionamiento incluye la determinación de por lo menos un segmento objetivo al que se hibrida un compuesto antisentido, de manera que tiene lugar un efecto deseado. En ciertas realizaciones, el efecto deseado es una reducción en los niveles de ácido nucleico objetivo de ARNm. En ciertas realizaciones, el efecto deseado es la reducción de los niveles de proteína codificada por el ácido nucleico objetivo o un cambio fenotípico asociado con el ácido nucleico objetivo.

Una región objetivo puede contener uno o más segmentos objetivo. Pueden superponerse múltiples segmentos objetivo dentro de una región objetivo. Alternativamente, pueden no superponerse. En ciertas realizaciones, los segmentos objetivo dentro de una región objetivo están separados por no más de aproximadamente 300 nucleótidos. En ciertas realizaciones, los segmentos objetivo dentro de una región objetivo están separados por un número de nucleótidos que es, es aproximadamente, no es más que, no es más que aproximadamente, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, o 10 nucleótidos en el ácido nucleico objetivo, o es un intervalo definido por dos cualquiera de los valores precedentes. En ciertas realizaciones, los segmentos objetivo dentro de una región objetivo están separados por no más de, o no más de aproximadamente, 5 nucleótidos

en el ácido nucleico objetivo. En ciertas realizaciones, los segmentos objetivo son contiguos. Se contemplan regiones objetivo definidas por un intervalo que tiene un ácido nucleico de partida que es cualquiera de los sitios objetivo 5' o sitios objetivo 3' enumerados en la presente.

5 En general, se pueden encontrar segmentos objetivo adecuados dentro de una UTR 5', una región codificante, una UTR 3', un intrón, un exón o una unión exón/intrón. Los segmentos objetivo que contienen un codón de inicio o un codón de parada son generalmente también segmentos objetivo adecuados. Un segmento objetivo adecuado puede excluir específicamente una cierta región definida estructuralmente como el codón de inicio o el
10 codón de parada. Sin embargo, como los transcritos de MALAT-1 se consideran no codificantes, se pueden encontrar segmentos objetivo adecuados a lo largo de la longitud del transcrito, que se cree que no se ha traducido.

No obstante, los segmentos objetivo que incluyen posibles transcritos de codificación de MALAT-1 y cualquier región estructuralmente definida se contemplan todavía en varias realizaciones. Por ejemplo, una región objetivo puede abarcar una UTR 3', una UTR 5', un exón, un intrón, una unión exón/intrón, una región codificante,
15 una región de inicio de la traducción, una región de terminación de la traducción u otra región del ácido nucleico definida. Las regiones estructuralmente definidas para MALAT-1 se pueden obtener por el número de acceso de bases de datos de secuencias como NCBI. En ciertas realizaciones, una región objetivo puede abarcar la secuencia desde un sitio objetivo 5' de un segmento objetivo dentro de la región objetivo hasta un sitio objetivo 3' de otro
20 segmento objetivo dentro de la misma región objetivo.

Como, se sabe en la técnica, el codón de inicio de la traducción es típicamente 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcritas; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de inicio de la traducción también se denomina "codón AUG", el "codón de partida" o el "codón de partida AUG". Una minoría de genes tienen un codón de inicio de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG, y 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG que han demostrado funcionar *in vivo*. Por lo tanto, los términos "codón de inicio de la traducción" y "codón de partida" pueden abarcar muchas secuencias de codones, aunque el aminoácido iniciador en cada caso es típicamente metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). También se sabe en la técnica que los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de partida alternativos, cualquiera de los cuales puede utilizarse preferentemente para el inicio de la traducción en un tipo o tejido celular particular, o en un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la invención, "codón de partida" y "codón de inicio de la traducción" se refieren al codón o codones que se usan *in vivo* para iniciar la traducción de un ARNm transcrito de un gen que codifica tirosinasa, independientemente de la secuencia(s) de dichos codones. También se sabe en la técnica que un codón de terminación de la traducción (o "codón de parada") de un gen puede tener una de tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).
25
30
35

Los términos "región de codón de partida" y "región de codón de inicio de la traducción" se refieren a una porción de dicho ARNm o gen que abarca de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') a partir de un codón de inicio de traducción. De manera similar, los términos "región de codón de parada" y "región de codón de terminación de traducción" se refieren a una porción de dicho ARNm o gen que abarca de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') de un codón de terminación de la traducción. Consecuentemente, la "región de codón de partida" (o "región de codón de inicio de traducción") y la "región de codón de parada" (o "región de codón de terminación de la traducción") son todas regiones que pueden ser dirigidas efectivamente con los compuestos antisentido de la presente invención.
40
45

El marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que se conoce en la técnica para referirse a la región entre el codón de inicio de la traducción y el codón de terminación de la traducción, también es una región que puede dirigirse con eficacia.

50 Otras regiones objetivo incluyen la región 5' no traducida (5'UTR), conocida en la técnica para referirse a la porción de un ARNm en la dirección 5' del codón de inicio de la traducción, y que incluye nucleótidos entre el sitio de tapón 5' y el codón de inicio de la traducción de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen), y la región 3' no traducida (3'UTR), conocida en la técnica para referirse a la porción de un ARNm en la dirección 3' del codón de terminación de la traducción, y, por tanto, incluye nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). El sitio de tapón 5' de un ARNm comprende un residuo de guanosina N7-metilado unido al residuo más 5' del ARNm a través de un enlace trifosfato 5'-5'. La región tapón 5' de un ARNm se considera que incluye la misma estructura de tapón 5' así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes al sitio tapón.
55

60 Aunque algunos transcritos de ARNm eucariotas se traducen directamente, muchos contienen una o más regiones, conocidas como "intrones", que se extirpan de una transcripción antes de que se traduzca. Las regiones restantes (y por lo tanto traducidas) se conocen como "exones" y se cortan y empalman juntas para formar una secuencia continua de ARNm. Los sitios de corte y empalme dirigidos, es decir, uniones intrón-exón o uniones exón-intrón, también pueden ser particularmente útiles en situaciones donde el corte y empalme aberrante está implicado en la enfermedad, o cuando una sobreproducción de un producto de corte y empalme particular está implicado en la
65

enfermedad. Las uniones de fusión aberrantes debido a reordenamientos o deleciones también son posibles sitios objetivo. Los transcritos de ARNm producidos a través del proceso de corte y empalme de dos (o más) ARNm de diferentes fuentes de genes se conocen como "transcritos de fusión". También se sabe que los intrones pueden ser dirigidos eficazmente usando compuestos antisentido dirigidos a, por ejemplo, ADN o pre-ARNm.

También se sabe en la técnica que pueden producirse transcritos de ARN alternativos a partir de la misma región genómica de ADN. Estos transcritos alternativos se conocen generalmente como "variantes". Más específicamente, las "variantes de pre-ARNm" son transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico que difieren de otros transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico en su posición de inicio o parada y que contienen tanto secuencia intrónica como exónica.

Tras la escisión de una o más regiones de exones o intrones, o porciones de las mismas durante el corte y empalme, las variantes de pre-ARNm producen "variantes de ARNm" más pequeñas. Consecuentemente, las variantes de ARNm son variantes de pre-ARNm procesadas y cada variante única de pre-ARNm debe producir siempre una variante de ARNm única como resultado del corte y empalme. Estas variantes de ARNm también se conocen como "variantes de corte y empalme alternativas". Si no se produce el corte y empalme de la variante de pre-ARNm, entonces la variante de pre-ARNm es idéntica a la variante de ARNm.

También se sabe en la técnica que pueden producirse variantes mediante el uso de señales alternativas para iniciar o detener la transcripción y que los pre-ARNm y los ARNm pueden poseer más de un codón de inicio o codón de parada. Las variantes que se originan a partir de un pre-ARNm o ARNm que usan codones de partida alternativos se conocen como "variantes de partida alternativas" de ese pre-ARNm o ARNm. Aquellos transcritos que usan un codón de parada alternativo se conocen como "variantes de parada alternativas" de ese pre-ARNm o ARNm. Un tipo específico de variante de parada alternativa es la "variante poliA" en la que los múltiples transcritos producidos son el resultado de la selección alternativa de una de las "señales de parada poliA" por la maquinaria de transcripción, produciendo de este modo transcritos que terminan en sitios poliA únicos.

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

Puede haber variación en la actividad (por ejemplo, como se define por el porcentaje de reducción de los niveles de ácido nucleico objetivo) de los compuestos antisentido dentro de una región objetivo activa. En ciertas realizaciones, las reducciones en los niveles de ARNm de MALAT-1 son indicativas de la inhibición de la expresión de MALAT-1. Las reducciones en los niveles de proteína de MALAT-1 también son indicativas de la inhibición de la expresión del ARNm objetivo.

Hibridación

En algunas realizaciones, la hibridación se produce entre un compuesto antisentido divulgado en la presente y un ácido nucleico de MALAT-1. El mecanismo más común de hibridación implica enlaces de hidrógeno (por ejemplo, Watson-Crick, Hoogsteen o enlaces de hidrógeno de Hoogsteen invertidos) entre nucleobases complementarias de moléculas de ácido nucleico.

La hibridación puede tener lugar en diferentes condiciones. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y están determinadas por la naturaleza y la composición de las moléculas del ácido nucleico a hibridar.

Los métodos para determinar si una secuencia es específicamente hibridable con un ácido nucleico objetivo son bien conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido proporcionados en la presente son específicamente hibridables con un ácido nucleico de MALAT-1.

Complementariedad

Un compuesto antisentido y un ácido nucleico objetivo son complementarios entre sí cuando un número suficiente de nucleobases del compuesto antisentido puede unirse por hidrógeno con las nucleobases correspondientes del ácido nucleico objetivo, de modo que se producirá un efecto deseado (por ejemplo, inhibición antisentido de un ácido nucleico objetivo, como un ácido nucleico de MALAT-1).

Las nucleobases no complementarias entre un compuesto antisentido y un ácido nucleico de MALAT-1 pueden tolerarse siempre que el compuesto antisentido siga siendo capaz de hibridar específicamente con un ácido nucleico objetivo. Además, un compuesto antisentido puede hibridar sobre uno o más segmentos de un ácido nucleico de MALAT-1 de manera que los segmentos intervinientes o adyacentes no están implicados en el evento de hibridación (por ejemplo, una estructura de giro, malapareamiento o estructura en horquilla).

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido proporcionados en la presente, o una porción especificada de los mismos, son, o son por lo menos, un 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% complementarios a un ácido nucleico de MALAT-1, una región objetivo, segmento objetivo, o una porción específica de los mismos. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con un ácido nucleico objetivo puede determinarse usando métodos rutinarios.

Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de 20 nucleobases del compuesto antisentido son complementarias a una región objetivo, y por lo tanto hibridarían específicamente, representaría un 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, las nucleobases no complementarias restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleobases complementarias y no necesitan ser contiguas entre sí o con nucleobases complementarias. Como tal, un compuesto antisentido que es de 18 nucleobases de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleobases no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico objetivo tendría un 77,8% de complementariedad total con el ácido nucleico objetivo. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico objetivo puede determinarse rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineamientos locales básicos) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, *Genome Res.*, 1997, 7, 649-656). El porcentaje de homología, identidad de secuencia o complementariedad, puede determinarse mediante, por ejemplo, el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI), usando los ajustes por defecto, que usa el algoritmo de Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math.*, 1981, 2, 482-489).

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido proporcionados en la presente, o porciones específicas de los mismos, son completamente complementarios (es decir, 100% complementarios) a un ácido nucleico objetivo, o a una porción específica del mismo. Por ejemplo, un compuesto antisentido puede ser completamente complementario a un ácido nucleico de MALAT-1, o a una región objetivo, o a un segmento objetivo o secuencia objetivo de los mismos. Como se usa en la presente, "completamente complementario" significa que cada nucleobase de un compuesto antisentido es capaz de emparejar bases precisas con las nucleobases correspondientes de un ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, un compuesto antisentido de 20 nucleobases es completamente complementario a una secuencia objetivo que tiene una longitud de 400 nucleobases, siempre que haya una porción de 20 nucleobases correspondiente del ácido nucleico objetivo que sea completamente complementaria al compuesto antisentido. Completamente complementario también puede usarse en referencia a una porción especificada del primer y/o el segundo ácido nucleico. Por ejemplo, una porción de 20 nucleobases de un compuesto antisentido de 30 nucleobases puede ser "completamente complementaria" a una secuencia objetivo que tiene una longitud de 400 nucleobases. La porción de 20 nucleobases del oligonucleótido de 30 nucleobases es completamente complementaria a la secuencia objetivo si la secuencia objetivo tiene una porción de 20 nucleobases correspondiente en la que cada nucleobase es complementaria a la porción de 20 nucleobases del compuesto antisentido. Al mismo tiempo, el compuesto antisentido de 30 nucleobases completo puede ser o no completamente complementario a la secuencia objetivo, dependiendo de si las 10 nucleobases restantes del compuesto antisentido también son complementarias a la secuencia objetivo.

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

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido que son de, o son de hasta 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases de longitud comprenden no más de 4, no más de 3, no más de 2, o no más de 1 nucleobase(s) no complementaria(s) en relación a un ácido nucleico objetivo, como un ácido nucleico de MALAT-1, o una porción específica del mismo.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido que son, o son de hasta 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleobases de longitud comprenden no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2, o no más de 1 nucleobase(s) no complementaria(s) en relación a un ácido nucleico objetivo, como un ácido nucleico de MALAT-1, o una porción específica del mismo.

Los compuestos antisentido proporcionados en la presente también incluyen aquellos que son complementarios a una porción de un ácido nucleico objetivo. Como se usa en la presente, "porción" se refiere a un número definido de nucleobases contiguas (es decir, ligadas) dentro de una región o segmento de un ácido nucleico objetivo. Una "porción" también puede referirse a un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios a por lo menos una porción de 8 nucleobases de un segmento objetivo. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios a por lo menos una porción de 12 nucleobases de un segmento objetivo. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios a por lo menos una porción de 15 nucleobases de un segmento

objetivo. También se contemplan compuestos antisentido que son complementarios a por lo menos una porción de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleobases de un segmento objetivo, o un intervalo definido por dos cualquiera de estos valores.

5 **Identidad**

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

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido, o porciones de los mismos, son por lo menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticos a uno o más de los compuestos antisentido o SEQ ID NO, o una porción de los mismos, divulgados en la presente.

En ciertas realizaciones, una porción del compuesto antisentido se compara con una porción de igual longitud del ácido nucleico objetivo. En ciertas realizaciones, se compara una porción de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleobases con una porción de igual longitud del ácido nucleico objetivo.

En ciertas realizaciones, una porción del oligonucleótido antisentido se compara con una porción de igual longitud del ácido nucleico objetivo. En ciertas realizaciones, se compara una porción de de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleobases con una porción de igual longitud del ácido nucleico objetivo.

Modificaciones

Un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La porción de nucleobases (también conocida como base) del nucleósido es normalmente una fracción de base heterocíclica. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato ligado covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar de pentofuranosilo, el grupo fosfato puede ligarse a la fracción de hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. Los oligonucleótidos se forman a través del enlace covalente de nucleósidos adyacentes entre sí, para formar un oligonucleótido polimérico lineal. Dentro de la estructura del oligonucleótido, se hace referencia comúnmente a que los grupos fosfato forman los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido.

Las modificaciones de los compuestos antisentido abarcan sustituciones o cambios en los enlaces internucleosídicos, fracciones de azúcar o nucleobases. Los compuestos antisentido modificados a menudo se prefieren sobre las formas nativas debido a propiedades deseables como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad mejorada para el objetivo de ácido nucleico, estabilidad aumentada en presencia de nucleasas, o actividad inhibidora aumentada.

Los nucleósidos modificados químicamente también pueden emplearse para aumentar la afinidad de unión de un oligonucleótido antisentido acortado o truncado para su ácido nucleico objetivo. Consecuentemente, a menudo se pueden obtener resultados comparables con compuestos antisentido más cortos que tienen tales nucleósidos modificados químicamente.

Enlaces Internucleosídicos Modificados

El enlace internucleosídico de origen natural de ARN y ADN es un enlace fosfodiéster de 3' a 5'. Los compuestos antisentido que tienen uno o más enlaces internucleosídicos modificados, es decir, no de origen natural se seleccionan a menudo sobre compuestos antisentido que tienen enlaces internucleosídicos de origen natural debido a propiedades deseables como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad mejorada para ácidos nucleicos objetivo, y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas.

Los oligonucleótidos que tienen enlaces internucleosídicos modificados incluyen enlaces internucleosídicos que retienen un átomo de fósforo así como enlaces internucleosídicos que no tienen un átomo de fósforo. Los enlaces internucleosídicos que contienen fósforo representativos incluyen, pero no están limitados a, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamido y fosforotioatos. Los métodos de preparación de enlaces que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de MALAT-1 comprenden uno o más enlaces internucleosídicos modificados. En ciertas realizaciones, los enlaces internucleosídicos modificados son enlaces de fosfortioato. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico de un compuesto antisentido es un enlace internucleosídico de fosfortioato.

5

Fracciones de Azúcar Modificado

Los compuestos antisentido pueden contener opcionalmente uno o más nucleósidos en los que el grupo de azúcar ha sido modificado. Dichos nucleósidos modificados con azúcar pueden impartir estabilidad de nucleasas mejorada, afinidad de unión aumentada, o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, los nucleósidos comprenden fracciones de anillos de ribofuranosa químicamente modificados. Los ejemplos de anillos de ribofuranosa químicamente modificados incluyen sin limitación, la adición de grupos sustituyentes (incluyendo grupos sustituyentes 5' y 2', puentes de átomos de anillos no geminales para formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA), reemplazo del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S, N(R) o C(R₁)(R₂) (R, R₁ y R₂ son cada uno independientemente H, alquilo C₁-C₁₂ o un grupo protector) y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de azúcares químicamente modificados incluyen el nucleósido sustituido con 2'-F-5'-metilo (ver Solicitud Internacional de PCT WO 2008/101157 publicada el 21/08/08 para otros nucleósidos 5',2'-bis sustituidos divulgados) o sustitución del átomo de oxígeno del anillo de ribosilo por S con sustitución adicional en la posición 2' (ver Solicitud de Patente U.S. publicada US2005-0130923, publicada el 16 de junio del 2005) o alternativamente 5'-sustitución de un BNA (ver Solicitud Internacional de PCT WO2007/134181 publicada el 22/11/07 en donde LNA está sustituido con, por ejemplo, un grupo 5'-metilo o uno 5'-vinilo).

Los ejemplos de nucleósidos que tienen restos de azúcar modificados incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden grupos sustituyentes 5'-vinilo, 5'-metilo (R o S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃, 2'-OCH₂CH₃, 2'-OCH₂CH₂F y 2'-O (CH₂)₂OCH₃. El sustituyente en la posición 2' también puede seleccionarse de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C₁-C₁₀, OCF₃, OCH₂F, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂-ON(R_m)(R_n), O-CH₂(=O)-N(R_m)(R_n) y O-CH₂-C(=O)-N(R₁)-(CH₂)₂N(R_m)(R_n), donde cada R_i, R_m y R_n es, independientemente, H o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido.

Como se usa en la presente, "nucleósidos bicíclicos" se refiere a nucleósidos modificados que comprenden una fracción de azúcar bicíclico. Los ejemplos de nucleósidos bicíclicos incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo ribosílico 4' y 2'. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido proporcionados en la presente incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos que comprenden un puente 4' a 2'. Los ejemplos de tales nucleósidos bicíclicos en puente de 4' a 2' incluyen, pero no están limitados a, una de las fórmulas: 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (también denominado como etilo restringido o cEt) y 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (y análogos de los mismos ver Patente U.S. 7.399.845, concedida el 15 de julio del 2008); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (y análogos del mismo ver Solicitud Internacional publicada WO/2009/006478, publicada el 8 de enero del 2009); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (y análogos del mismo ver Solicitud Internacional publicada WO/2008/150729, publicada el 11 de diciembre del 2008); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (ver Solicitud de Patente U.S. publicada US2004-0171570, publicada el 2 de septiembre del 2004; 4'-CH₂-N(R)-O-2', en donde R es alquilo C₁-C₁₂, o un grupo protector (ver Patente U.S. 7.427.672, concedida el 23 de septiembre del 2008); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (ver Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); y 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (y análogos del mismo ver Solicitud Internacional publicada WO 2008/154401, publicada el 8 de diciembre del 2008).

Informes adicionales relacionados con nucleósidos bicíclicos también pueden encontrarse en la bibliografía publicada (ver, por ejemplo, Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26) 8362-8379; Elayadi et al., Curr. Opinion Invest. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; y Orum et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; Patentes U.S. N° 6.268.490; 6.525.191; 6.670.461; 6.770.748; 6.794.499; 7.034.133; 7.053.207; 7.399.845; 7.547.684; y 7.696.345; Publicación de Patente U.S. N° US2008-0039618; US2009-0012281; Número de Serie de Patente U.S. 60/989,574; 61/026,995; 61/026,998; 61/056,564; 61/086,231; 61/097,787; y 61/099,844; Solicitudes Internacionales de PCT publicadas WO 1994/014226; WO 2004/106356; WO 2005/021570; WO 2007/134181; WO 2008/150729; WO 2008/154401; y WO 2009/006478. Cada uno de los nucleósidos bicíclicos anteriores puede prepararse con una o más configuraciones estereoquímicas de azúcar que incluyen, por ejemplo, α-L-ribofuranosa y β-D-ribofuranosa (ver solicitud Internacional de PCT PCT/DK98/00393, publicada el 25 de marzo de 1999 como WO 99/14226).

En ciertas realizaciones, las fracciones de azúcares bicíclicos de nucleósidos de BNA incluyen, pero no están limitados a, compuestos que tienen por lo menos un puente entre la posición 4' y la posición 2' de la fracción de azúcar de pentofuranosilo en donde tales puentes comprenden independientemente 1 o de 2 a 4 grupos ligados seleccionados independientemente de $-\text{C}(\text{R}_a)(\text{R}_b)_n$ -, $-\text{C}(\text{R}_a)=\text{C}(\text{R}_b)$ -, $-\text{C}(\text{R}_a)=\text{N}$ -, $-\text{C}(=\text{O})$ -, $-\text{C}(=\text{NR}_a)$ -, $-\text{C}(=\text{S})$ -, $-\text{O}$ -, $-\text{Si}(\text{R}_a)_2$ -, $-\text{S}(=\text{O})_x$ -, y $-\text{N}(\text{R}_a)$ - en donde:

65 x es 0, 1 o 2;

n es 1, 2, 3 ó 4;

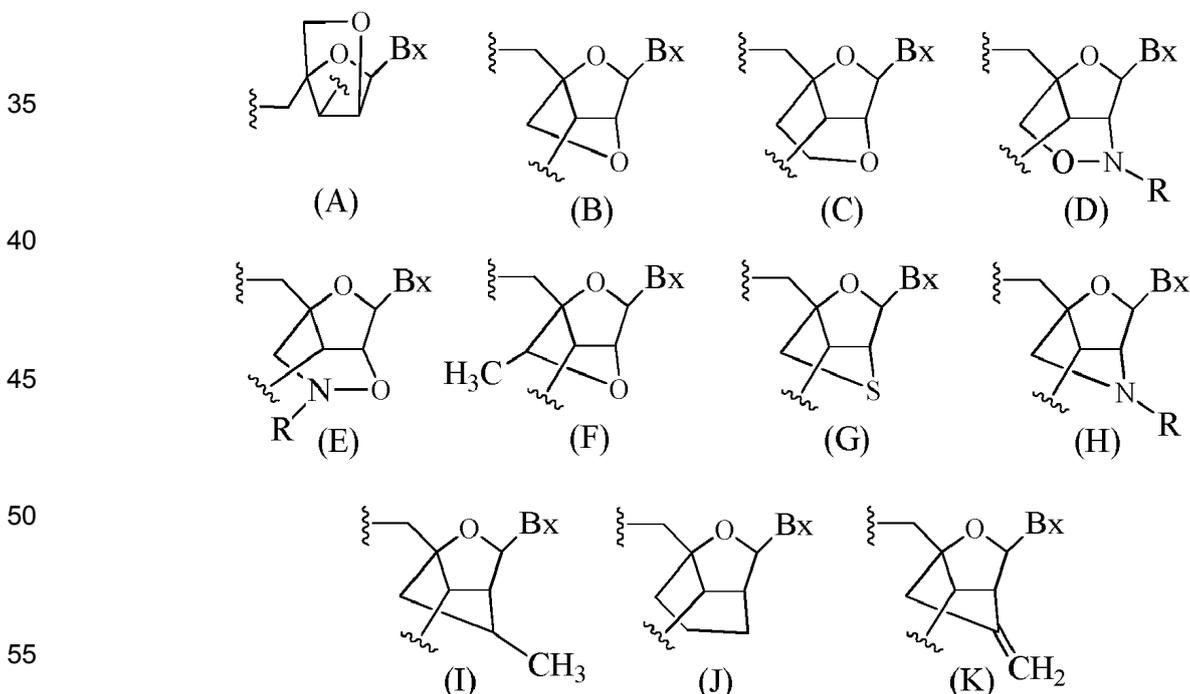
5 cada R_a y R_b es, independientemente, H, un grupo protector, hidroxilo, alquilo C_1-C_{12} , alquilo C_1-C_{12} sustituido, alquenoilo C_2-C_{12} , alquenoilo C_2-C_{12} sustituido, alquinoilo C_2-C_{12} , alquinoilo C_2-C_{12} sustituido, arilo C_5-C_{20} , arilo C_5-C_{20} sustituido, radical heterociclo, radical heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical alicíclico C_5-C_7 , radical alicíclico C_5-C_7 sustituido, halógeno, OJ_1 , NJ_1J_2 , SJ_1 , N_3 , $COOJ_1$, acilo ($C(=O)-H$), acilo sustituido, CN, sulfonilo ($S(=O)_2J_1$), o sulfoxilo ($S(=O)J_1$); y

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

15 En ciertas realizaciones, el puente de una fracción de azúcar bicíclico es $-[C(R_a)(R_b)]_n-$, $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$, $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$ or $-C(R_aR_b)-O-N(R)-$. En ciertas realizaciones, el puente es $4'-CH_2-2'$, $4'-(CH_2)_2-2'$, $4'-(CH_2)_3-2'$, $4'-CH_2-O-2'$, $4'-(CH_2)_2-O-2'$, $4'-CH_2-O-N(R)-2'$ and $4'-CH_2-N(R)-O-2'$ en donde cada R es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C_1-C_{12} .

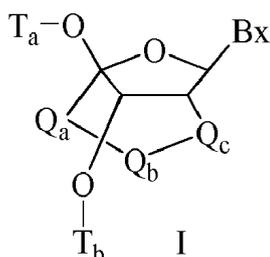
20 En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos se definen adicionalmente por la configuración isomérica. Por ejemplo, un nucleósido que comprende un puente 4'-2' metileno-oxi, puede estar en la configuración α -L o en la configuración β -D. Previamente, se han incorporado los BNA de α -L- metileno-oxi ($4'-CH_2-O-2'$) en oligonucleótidos antisentido que mostraron actividad antisentido (Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372).

25 En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos incluyen, pero no están limitados a, (A) α -L-metileno-oxi ($4'-CH_2-O-2'$) BNA, (B) β -D-metileno-oxi ($4'-CH_2-O-2'$) BNA, (C) etileno-oxi ($4'-(CH_2)_2-O-2'$) BNA, (D) amino-oxi ($4'-CH_2-O-N(R)-2'$) BNA, (E) oxiamino ($4'-CH_2-N(R)-O-2'$) BNA, y (F) metil(metileno-oxi) ($4'-CH(CH_3)-O-2'$) BNA, (G) metileno-tio ($4'-CH_2-S-2'$) BNA, (H) metileno-amino ($4'-CH_2-N(R)-2'$) BNA, (I) carbocíclico de metilo ($4'-CH_2-CH(CH_3)-2'$) BNA, (J) carbocíclico de propileno ($4'-(CH_2)_3-2'$) BNA y (K) vinil BNA como se representa a continuación:



60 en donde Bx es la fracción de base y R es independientemente H, un grupo protector, alquilo C_1-C_{12} o alcoxi C_1-C_{12} .

65 En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula I:



en la que:

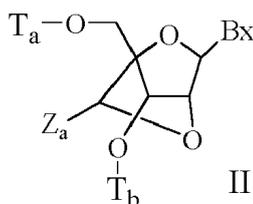
15 Bx es una fracción de base heterocíclica;

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

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

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

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula II:



en la que:

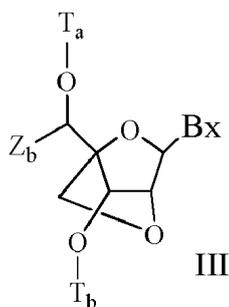
35 Bx es una fracción de base heterocíclica;

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

40 Z_a es alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, amida sustituida, tío o tío sustituido.

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

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula III:



60 en la que:

65 Bx es una fracción de base heterocíclica;

T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo

de fósforo reactivo, una fracción de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;

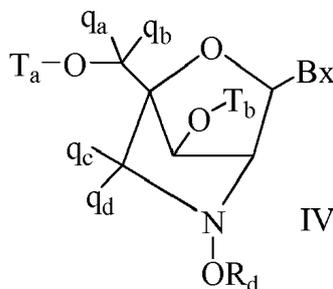
Z_b es alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆ sustituido o acilo sustituido (C(=O)-).

5

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula IV:

10

15



20 en la que:

Bx es una fracción de base heterocíclica;

25

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

R_d es alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆ o alquino C₂-C₆ sustituido;

30

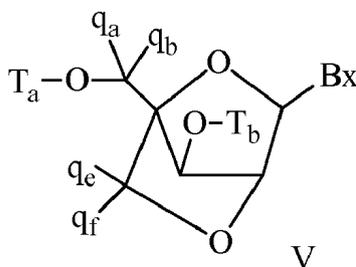
cada q_a, q_b, q_c y q_d es, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆ o alquino C₂-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C₁-C₆ o aminoalquilo C₁-C₆ sustituido;

35

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula V:

40

45



en la que:

50

Bx es una fracción de base heterocíclica;

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

55

q_a, q_b, q_e y q_f son cada uno, independientemente, hidrógeno, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO₂J_j, NJ_jJ_k, N₃, CN, C(=O)OJ_j, C(=O)NJ_jJ_k, C(=O)J_j, O-C(=O)-J_jJ_k, N(H)C(=NH)NJ_jJ_k, N(H)C(=O)NJ_jJ_k o N(H)C(=S)NJ_jJ_k;

60

o q_e y q_f juntos son = C(q_g)(q_h);

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

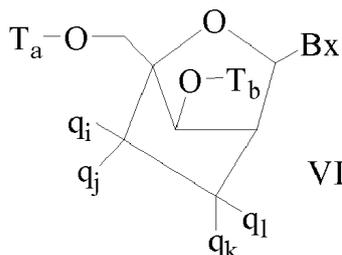
65

Se han descrito la síntesis y la preparación de los monómeros metileno(4'-CH₂-O-2') BNA adenina, citosina, guanina, 5-metil-citosina, timina y uracilo, junto con su oligomerización y las propiedades de reconocimiento de ácidos nucleicos (Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630). Los BNA y la preparación de los mismos

también se ha descrito en la WO 98/39352 y la WO 99/14226.

También se han preparado análogos de metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA y 2'-tio-BNA (Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222). También se ha descrito la preparación de análogos de nucleósidos bloqueados que comprenden dúplex de oligodesoxirribonucleótidos como sustratos para las polimerasas de ácidos nucleicos (Wengel et al., WO 99/14226) Además, se ha descrito en la técnica la síntesis de 2'-amino-BNA, un nuevo análogo de oligonucleótido de alta afinidad conformacionalmente restringido (Singh et al, J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039). Además, se han preparado 2'-amino- y 2'-metilamino-BNA y se ha informado anteriormente de la estabilidad térmica de sus dúplex con cadenas de ARN y ADN complementarias.

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula VI:



en la que:

B_x es una fracción de base heterocíclica;

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

cada q_i, q_j, q_k y q_l es, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO₂J_j, NJ_jJ_k, N₃, CN, C(=O)OJ_j, C(=O)NJ_jJ_k, C(=O)J_j, O-C(=O)NJ_jJ_k, N(H)C(=NH)NJ_jJ_k, N(H)C(=O)NJ_jJ_k o N(H)C(=S)NJ_jJ_k; y

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

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

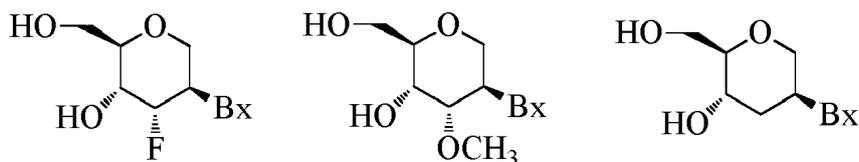
Como se usa en la presente, "nucleósido bicíclico 4'-2' " o "nucleósido bicíclico de 4' a 2' " se refiere a un nucleósido bicíclico que comprende un anillo de furanosa que comprende un puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de furanosa que conecta el átomo de carbono 2' y el átomo de carbono 4' del anillo de azúcar.

Como se usa en la presente, "nucleósidos monocíclicos" se refiere a nucleósidos que comprenden fracciones de azúcar modificado que no son fracciones de azúcares bicíclicos. En ciertas realizaciones, la fracción de azúcar, o análogo de la fracción de azúcar, de un nucleósido se puede modificar o sustituir en cualquier posición.

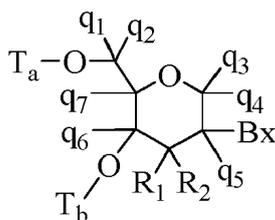
Como se usa en la presente, "azúcar modificado en 2' " significa un azúcar de furanosilo modificado en la posición 2'. En ciertas realizaciones, tales modificaciones incluyen sustituyentes seleccionados entre: un haluro, incluyendo, pero no limitado a, alcoxi sustituido y no sustituido, tioalquilo sustituido y no sustituido, aminoalquilo sustituido y no sustituido, alquilo sustituido y no sustituido, alilo sustituido y no sustituido, y alquino sustituido y no sustituido. En ciertas realizaciones, las modificaciones 2' se seleccionan de sustituyentes que incluyen, pero no están limitados a: O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nF, O(CH₂)_nONH₂, OCH₂C(=O)N(H)CH₃, and O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros grupos sustituyentes 2' también se pueden seleccionar de: alquilo C₁-C₁₂, alquilo sustituido, alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, F, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo informador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un compuesto antisentido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. En ciertas realizaciones, los nucleósidos modificados comprenden una cadena lateral 2'-MOE (Baker et

al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000.). Se ha descrito que dicha sustitución de 2'-MOE tiene una afinidad de unión mejorada en comparación con los nucleósidos no modificados y con otros nucleósidos modificados, como 2'-O-metilo, O-propilo y O-aminopropilo. También se ha demostrado que los oligonucleótidos que tienen el sustituyente 2'-MOE son inhibidores antisentido de la expresión génica con características prometedoras para el uso *in vivo* (Martin, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann et al., Chimia, 1996, 50, 168-176; Altmann et al., Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637; y Altmann et al., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926).

Como se usa en la presente, un "nucleósido de tetrahidropirano modificado" o "nucleósido de THP modificado" significa un nucleósido que tiene un "azúcar" de tetrahidropirano de seis miembros sustituido en el residuo de pentofuranosilo en nucleósidos normales (un sustituto del azúcar). Los nucleósidos de THP modificados incluyen, pero no están limitados a, lo que en la técnica es referido como ácido nucleico de hexitol (HNA), ácido nucleico de anitol (ANA), ácido nucleico de manitol (MNA) (ver Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841-854) o fluoro HNA (F-HNA) que tiene un sistema de anillo de tetrahidropirano como se ilustra a continuación:



En ciertas realizaciones, los sustitutos de azúcar se seleccionan teniendo la Fórmula VII:



VII

en la que independientemente para cada uno de dichos por lo menos un análogo de nucleósido de tetrahidropirano de Fórmula VII:

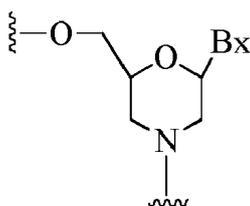
Bx es una fracción de base heterocíclica;

T_a y T_b son cada uno, independientemente, un grupo de enlace internucleosídico que liga el análogo de nucleósido de tetrahidropirano con el compuesto antisentido o uno de T_a y T_b es un grupo de enlace internucleosídico que liga el análogo de nucleósido de tetrahidropirano con el compuesto antisentido y el otro de T_a y T_b es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado ligado o un grupo terminal 5' o 3';

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

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos de THP modificados de fórmula VII en la que q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ son cada uno H. En ciertas realizaciones, por lo menos uno de q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ es distinto de H. En ciertas realizaciones, por lo menos uno de q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ es metilo. En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos de THP de fórmula VII en la que uno de R₁ y R₂ es fluoro. En ciertas realizaciones, R₁ es fluoro y R₂ es H; R₁ es metoxi y R₂ es H, y R₁ es metoxietoxi y R₂ es H.

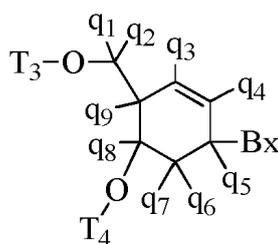
En ciertas realizaciones, los sustitutos de azúcar comprenden anillos que tienen más de 5 átomos y más de un heteroátomo. Por ejemplo, se ha informado de nucleósidos que comprenden fracciones de azúcar morfolino y su uso en compuestos oligoméricos (ver, por ejemplo, Braasch et al., Biochemistry, 2002, 41, 4503-4510; Patentes U.S. 5.698.685; 5.166.315; 5.185.444; y 5.034.506). Como se usa en la presente, el término "morfolino" significa un sustituto de azúcar que tiene la fórmula siguiente:



5
10 En ciertas realizaciones, los morfolinolinos pueden modificarse, por ejemplo añadiendo o alterando varios grupos sustituyentes de la estructura morfolino anterior. Tales sustitutos de azúcar son referidos en la presente como morfolinolinos modificados.

15 También se proporcionan combinaciones de modificaciones sin limitación, como nucleósidos sustituidos con 2'-F-5'-metilo (ver Solicitud internacional de PCT WO 2008/101157 publicada el 21/08/08 para otros nucleósidos 5',2'-bis sustituidos divulgados) y el reemplazo del átomo de oxígeno del anillo de ribosilo por S y la sustitución adicional en la posición 2' (ver Solicitud de Patente U.S. publicada US2005-0130923, publicada el 16 de junio de 2005) o alternativamente la 5'-sustitución de un ácido nucleico bicíclico (ver Solicitud internacional de PCT WO 2007/134181, publicada el 22 de noviembre del 2007 en donde un nucleósido bicíclico 4'-CH₂-O-2' está sustituido adicionalmente en la posición 5' con un grupo 5'-metilo o 5'-vinilo). También se han descrito la síntesis y preparación de nucleósidos bicíclicos carbocíclicos junto con sus estudios de oligomerización y bioquímicos (ver, por ejemplo, Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc. 2007, 129(26), 8362-8379).

25 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido comprenden uno o más nucleósidos de ciclohexenilo modificados, que es un nucleósido que tiene un ciclohexenilo de seis miembros en lugar del residuo de pentofuranosilo en nucleósidos de origen natural. Los nucleósidos de ciclohexenilo modificados incluyen, pero no están limitados a, los descritos en la técnica (ver, por ejemplo, la Solicitud de PCT de propiedad conjunta publicada WO 2010/036696, publicada el 10 de abril de 2010, Robeyns et al., J. Am. Chem. Soc., 2008, 130(6), 1979-1984; Horváth et al., Tetrahedron Letters, 2007, 48, 3621-3623; Nauwelaerts et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(30), 9340-9348; Gu et al., Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2005, 24(5-7), 993-998; Nauwelaerts et al., Nucleic Acids Research, 2005, 33(8), 2452-2463; Robeyns et al., Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2005, F61(6), 585-586; Gu et al., Tetrahedron, 2004, 60(9), 2111-2123; Gu et al., Oligonucleotides, 2003, 13(6), 479-489; Wang et al., J. Org. Chem., 2003, 68, 4499-4505; Verbeure et al., Nucleic Acids Research, 2001, 29(24), 4941-4947; Wang et al., J. Org. Chem., 2001, 66, 8478-82; Wang et al., Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2001, 20(4-7), 785-788; Wang et al., J. Am. Chem., 2000, 122, 8595-8602; Solicitud de PCT publicada, WO 06/047842; y Solicitud de PCT publicada WO 01/049687). Ciertos nucleósidos de ciclohexenilo modificados tienen Fórmula X.



X

50 en la que independientemente para cada uno de dichos por lo menos un análogo de nucleósido de ciclohexenilo de Fórmula X:

Bx es una fracción de base heterocíclica;

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

60 q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆, q₇, q₈ y q₉ son cada uno, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆, alquino C₂-C₆ sustituido u otro grupo sustituyente de azúcar.

65 Como se usa en la presente, "2'-modificado" o "2'-sustituido" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un sustituyente en la posición 2' distinta de H u OH. Los nucleósidos 2'-modificados incluyen, pero no están limitados a, nucleósidos bicíclicos en los que el puente que conecta dos átomos de carbono del anillo

de azúcar conecta el carbono 2' y otro carbono del anillo de azúcar; y nucleósidos con 2'-substituyentes sin puente, como alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C₁-C₁₀, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, o O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), donde cada R_m y R_n es, independientemente, H o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido. Los nucleósidos 2'-modificados pueden comprender además otras modificaciones, por ejemplo en otras posiciones del azúcar y/o en la nucleobase.

Como se usa en la presente, "2'-F" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo fluoro en la posición 2' del anillo de azúcar.

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

Como se usa en la presente, "MOE" o "2'-MOE" o "2'-OCH₂CH₂OCH₃" o "2'-O-metoxietilo" se refiere cada uno a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo -OCH₂CH₂OCH₃ en la posición 2' del anillo de azúcar.

Como se usa en la presente, "oligonucleótido" se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos ligados. En ciertas realizaciones, se modifican uno o más de la pluralidad de nucleósidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido comprende uno o más ribonucleósidos (ARN) y/o desoxirribonucleósidos (ADN).

También se conocen en la técnica muchos otros sistemas de anillo sustitutos de azúcar biciclo y triciclo que pueden usarse para modificar nucleósidos para su incorporación en compuestos antisentido (ver, por ejemplo, artículo de revisión: Leumann, *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, 10, 841-854). Dichos sistemas de anillos pueden someterse a varias sustituciones adicionales para mejorar la actividad.

Los métodos para las preparaciones de azúcares modificados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Algunas patentes U.S. representativas que enseñan la preparación de tales azúcares modificados incluyen sin limitación, U.S.: 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; 5.670.633; 5.700.920; 5.792.847 y 6.600.032 y la Solicitud Internacional PCT/US2005/019219, presentada el 2 de junio del 2005 y publicada como WO 2005/121371 el 22 de diciembre del 2005.

En los nucleótidos que tienen fracciones de azúcares modificados, las fracciones de nucleobases (naturales, modificados o una combinación de los mismos) se mantienen para la hibridación con un objetivo de ácido nucleico apropiado.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido comprenden uno o más nucleósidos que tienen fracciones de azúcares modificados. En ciertas realizaciones, la fracción de azúcar modificado es 2'-MOE. En ciertas realizaciones, los nucleósidos modificados con 2'-MOE están dispuestos en un motivo gapmer. En ciertas realizaciones, la fracción de azúcar modificado es un nucleósido bicíclico que tiene un grupo puente (4'-CH(CH₃)-O-2'). En ciertas realizaciones, los nucleósidos modificados con (4'-CH(CH₃)-O-2') están dispuestos a lo largo de las alas de un motivo gapmer.

Compuestos Antisentido Conjugados

Los compuestos antisentido se pueden ligar covalentemente a una o más fracciones o conjugados que mejoran la actividad, distribución celular o captación celular de los oligonucleótidos antisentido resultantes. Los grupos conjugados típicos incluyen fracciones de colesterol y fracciones de lípidos. Grupos conjugados adicionales incluyen carbohidratos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes.

Los compuestos antisentido también pueden modificarse para tener uno o más grupos estabilizadores que están generalmente unidos a uno o a ambos extremos terminales de compuestos antisentido para mejorar propiedades como, por ejemplo, estabilidad de nucleasas. Incluidas en los grupos estabilizadores están las estructuras de tapón. Estas modificaciones terminales protegen el compuesto antisentido que tiene ácido nucleico terminal de la degradación de exonucleasas, y pueden ayudar a la administración y/o localización dentro de una célula. El tapón puede estar presente en el extremo 5'-terminal (tapón 5), o en el 3'-terminal (tapón 3'), o puede estar presente en ambos extremos terminales. Las estructuras de tapón son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, tapones desoxi abásicas invertidas. Grupos 3' y 5' estabilizadores adicionales que pueden usarse para tapar uno o ambos extremos de un compuesto antisentido para impartir estabilidad a nucleasas incluyen los divulgados en la WO 03/004602 publicada el 16 de enero de 2003.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido, incluyendo, pero no limitados a, aquellos particularmente adecuados para usar como ARNmc, se modifican por la unión de uno o más grupos conjugados. En general, los grupos conjugados modifican una o más propiedades del oligonucleótido unido, incluyendo, pero no

limitado a, farmacodinamia, farmacocinética, estabilidad, unión, absorción, distribución celular, captación celular, carga y depuración. Los grupos conjugados se usan rutinariamente en las técnicas químicas y se ligan directamente o a través de una fracción de enlace conjugada opcional o grupo de enlace conjugado a un compuesto inicial como un oligonucleótido. Los grupos conjugados incluyen, sin limitación, intercaladores, moléculas informadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, tioéteres, poliéteres, colesteroles, tiocolesteroles, fracciones de ácido cólico, folato, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, fenantridina, antraquinona, adamantano, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Ciertos grupos conjugados se han descrito anteriormente, por ejemplo: fracción de colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de do-decan-diol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato de trietil-amonio (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una cadena de poliamina o de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido adamantano acético ((Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), una fracción de palmitilo (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), o una fracción de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937).

Para conjugados adicionales incluyendo aquellos útiles para ARNm y su colocación dentro de compuestos antisentido, ver, por ejemplo, Solicitud US N°: 61/583.963.

Composiciones y Métodos para Formular Composiciones Farmacéuticas

Los oligonucleótidos antisentido pueden mezclarse con sustancias activas o inertes farmacéuticamente aceptables para la preparación de composiciones o formulaciones farmacéuticas. Las composiciones y métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas dependen de una serie de criterios, incluyendo, pero no limitados a, vía de administración, extensión de la enfermedad, o dosis a administrar.

Un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de MALAT-1 se puede utilizar en composiciones farmacéuticas combinando el compuesto antisentido con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable adecuado. Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye solución salina tamponada con fosfato (PBS). El PBS es un diluyente adecuado para su uso en composiciones que se administran por vía parenteral. Por consiguiente, en una realización, se emplea en los métodos descritos en la presente una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de MALAT-1 y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, el diluyente farmacéuticamente aceptable es PBS. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido.

Tratamiento del Cáncer

En varias realizaciones, los compuestos antisentido proporcionados en la presente son útiles para el tratamiento del cáncer en un animal. Los ejemplos de ciertos tipos de cánceres que pueden tratarse con los compuestos antisentido descritos en la presente incluyen, pero no están limitados a, cáncer de colon, cáncer intestinal, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de hígado y/o cáncer de próstata.

Como se usan en la presente, los términos "células tumorales", "células cancerosas", "células malignas" y "células neoplásicas" se usan de manera intercambiable y no requieren una distinción particular en cuanto a la extensión o grado de transformación o malignidad con respecto a una "célula normal". En consecuencia, "células tumorales", "células cancerosas" y "células neoplásicas" son células transformadas y/o malignas, mientras que las "células normales" no se transforman y/o no son malignas.

El término "tratar el cáncer" se refiere a realizar acciones que llevan a la mejora del cáncer o de los síntomas acompañados con él en gran medida. La combinación de dichas acciones está abarcada por el término "tratamiento". La mejora de un cáncer incluye, pero no está limitada a, reducir el número de células cancerosas en un animal o reducir el número de células cancerosas en un sitio específico en el cuerpo de un animal. Dicho tratamiento, como se usa en la presente, también incluye una restauración completa de la salud con respecto a los cánceres referidos en la presente. Debe entenderse que el tratamiento según se usa de acuerdo con las realizaciones proporcionadas en la presente puede no ser eficaz en todos los sujetos a tratar. Sin embargo, una parte estadísticamente significativa de sujetos que padecen un cáncer referido en la presente puede tratarse con éxito. Si una parte es estadísticamente significativa puede determinarse sin un experto en la técnica usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc.

El término "administración" o "administrar" incluye vías de introducir un inhibidor específico de MALAT-1 a un animal para realizar su función prevista. Un ejemplo de una vía de administración que puede usarse incluye, pero no está limitado a, administración parenteral, como inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intraperitoneal o intracraneal.

Cuando un inhibidor específico de MALAT-1 se administra por vía parenteral, como por inyección subcutánea o intravenosa u otra inyección, puede estar en la forma de una solución o suspensión acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógenos. Las suspensiones pueden formularse usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. Las composiciones para inyección pueden contener un vehículo como agua, solución salina (por ejemplo, solución salina fisiológicamente tamponada) u otros vehículos isotónicos como solución isotónica de cloruro de sodio, solución de Ringer, solución de dextrosa u otros vehículos conocidos en la técnica.

Como se usa en la presente, el término "tratamiento del cáncer" o "tratar el cáncer" puede describirse por una serie de parámetros diferentes que incluyen, pero no limitados a, reducción en el tamaño de un tumor en un animal que tiene cáncer, reducción en el crecimiento o proliferación de un tumor en un animal que tiene cáncer, prevención de metástasis o reducción del alcance de la metástasis, y/o ampliación de la supervivencia de un animal que tiene cáncer en comparación con el control. En el contexto del cáncer de colon, el tratamiento del cáncer de colon también puede medirse mediante una reducción en el número de pólipos en el colon de un animal que tiene cáncer de colon. En varias realizaciones, el cáncer puede ser un cáncer primario.

Se perfilan varias realizaciones de métodos para reducir el volumen o el número de tumores en un animal que comprenden administrar un inhibidor específico de MALAT-1 al animal. En varios aspectos de tales realizaciones, el inhibidor específico de MALAT-1 puede ser un compuesto antisentido que reduce la expresión de MALAT-1. Se entenderá que cualquiera de los inhibidores específicos de MALAT-1 descritos en la presente puede usarse en realizaciones relacionadas con los métodos para reducir el volumen o el número de tumores en un animal. Además, cualquier compuesto antisentido dirigido a MALAT-1 como se describe en la presente puede usarse en métodos para reducir el volumen o el número de tumores en un animal. Por ejemplo, un compuesto antisentido útil para reducir el volumen tumoral puede incluir un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos ligados, en donde el oligonucleótido modificado es por lo menos un 85% complementario a un ácido nucleico de MALAT-1. En varias realizaciones, el volumen tumoral puede referirse al volumen de un tumor primario.

Se perfilan varias realizaciones de los métodos para inhibir el crecimiento o la proliferación tumoral en un animal que comprenden administrar un inhibidor específico de MALAT-1 al animal. En varios aspectos, el crecimiento o proliferación de un tumor primario se puede inhibir administrando un inhibidor específico de MALAT-1 al animal. En varios aspectos de tales realizaciones, el inhibidor específico de MALAT-1 puede ser un compuesto antisentido que reduce la expresión de MALAT-1. Se entenderá que cualquiera de los inhibidores específicos de MALAT-1 descritos en la presente puede usarse en realizaciones relacionadas con los métodos para inhibir el crecimiento o la proliferación tumoral en un animal. Además, cualquier compuesto antisentido dirigido a MALAT-1 como se describe en la presente puede usarse en métodos para inhibir el crecimiento o la proliferación tumoral en un animal. Por ejemplo, un compuesto antisentido útil para inhibir el crecimiento o proliferación tumoral puede incluir un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados, en donde el oligonucleótido modificado es por lo menos un 85% complementario a un ácido nucleico de MALAT 1.

Se perfilan ciertas realizaciones para métodos para inhibir metástasis de cáncer en un animal que comprenden administrar un inhibidor específico de MALAT-1 al animal. En varios aspectos de tales realizaciones, el inhibidor específico de MALAT-1 puede ser un compuesto antisentido que reduce la expresión de MALAT-1. Se entenderá que cualquiera de los inhibidores específicos de MALAT-1 descritos en la presente puede usarse en realizaciones relacionadas con métodos para inhibir metástasis de cáncer en un animal. Además, cualquier compuesto antisentido dirigido a MALAT-1 como se describe en la presente se puede usar en métodos de inhibición de metástasis de cáncer en un animal. Por ejemplo, un compuesto antisentido útil para inhibir metástasis de cáncer puede incluir un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados, en donde el oligonucleótido modificado es por lo menos un 85% complementario a un ácido nucleico de MALAT 1.

Se perfilan varias realizaciones de métodos para aumentar la supervivencia de un animal que tiene cáncer que comprenden administrar un inhibidor específico de MALAT-1 al animal. En varios aspectos de tales realizaciones, el inhibidor específico de MALAT-1 puede ser un compuesto antisentido que reduce la expresión de MALAT-1. Se entenderá que cualquiera de los inhibidores específicos de MALAT-1 descritos en la presente se puede usar en realizaciones relacionadas con métodos para aumentar la supervivencia de un animal que tiene cáncer. Además, cualquier compuesto antisentido dirigido a MALAT-1 como se describe en la presente puede usarse en métodos para aumentar la supervivencia de un animal que tiene cáncer. Por ejemplo, un compuesto antisentido útil para aumentar la supervivencia en un animal que tiene cáncer puede incluir un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos unidos, en donde el oligonucleótido modificado es por lo menos un 85% complementario a un ácido nucleico de MALAT 1.

Ciertas realizaciones están dirigidas al uso de un inhibidor específico de MALAT-1 en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer. En varios aspectos, el cáncer puede ser un cáncer primario. Se entenderá que cualquiera de los inhibidores específicos de MALAT-1 descritos en la presente puede usarse en realizaciones relacionadas con el uso de tales inhibidores en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer. En algunos aspectos, el inhibidor específico de MALAT-1 puede comprender un compuesto que incluye un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados por lo menos un 85% complementario a un ácido nucleico de MALAT-1. También se entenderá que los inhibidores específicos de MALAT-1 pueden usarse en la fabricación de un medicamento para reducir el volumen o el número de tumores, inhibir el crecimiento o la proliferación tumoral, inhibir la metástasis del cáncer, y/o aumentar la supervivencia de un animal que tiene cáncer.

De manera similar, varias realizaciones se refieren a un inhibidor específico de MALAT-1 para su uso en el tratamiento del cáncer. En varios aspectos, el cáncer puede ser un cáncer primario. Se entenderá que cualquiera de los inhibidores específicos de MALAT-1 descritos en la presente pueden ser para uso en el tratamiento del cáncer. En algunos aspectos, el inhibidor específico de MALAT-1 puede comprender un compuesto que incluye un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados por lo menos un 85% complementario a un ácido nucleico de MALAT-1. También se entenderá que los inhibidores específicos de MALAT-1 pueden usarse para reducir el volumen o el número de tumores, inhibir el crecimiento o la proliferación tumoral, inhibir la metástasis del cáncer y/o aumentar la supervivencia de un animal que tiene cáncer.

Se pueden proporcionar inhibidores específicos de MALAT-1 de varias realizaciones a un médico administrante u otro profesional del cuidado de la salud en forma de un kit. El kit es un paquete que aloja un recipiente que contiene el inhibidor específico de MALAT-1 en una composición farmacéutica adecuada, y las instrucciones para administrar la composición farmacéutica a un animal. El kit también puede contener dosis separadas de un inhibidor específico de MALAT-1 para administración en serie o secuencial. El kit puede contener dispositivos de administración adecuados, por ejemplo, jeringuillas y similares, junto con instrucciones para administrar el inhibidor específico de MALAT-1. El kit puede contener opcionalmente instrucciones para el almacenamiento, la reconstitución (si corresponde) y la administración. El kit puede incluir una pluralidad de recipientes que reflejan el número de administraciones que se administrarán a un animal.

Cultivo celular y tratamiento con compuestos antisentido

Los efectos de los compuestos antisentido sobre el nivel, actividad o expresión de los ácidos nucleicos de MALAT-1 pueden probarse *in vitro* en una variedad de tipos de células. Los tipos de células utilizadas para tales análisis están disponibles de proveedores comerciales (por ejemplo, American Type Culture Collection, Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walkersville, MD) y se cultivan de acuerdo con las instrucciones del vendedor usando reactivos comercialmente disponibles (por ejemplo, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Como un ejemplo, se pueden usar células b.END para probar compuestos antisentido sobre la actividad o expresión de ácidos nucleicos de MALAT-1.

Prueba *in vitro* de oligonucleótidos antisentido

En la presente se describen métodos para el tratamiento de células con oligonucleótidos antisentido, que se pueden modificar de forma apropiada para el tratamiento con otros compuestos antisentido.

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

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

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

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

Las células se tratan con oligonucleótidos antisentido por métodos rutinarios. Las células se recogen típicamente 16-24 horas después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido, en cuyo momento se miden los niveles de ARN o proteína de los ácidos nucleicos objetivo por métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente. En general, cuando los tratamientos se realizan en múltiples repeticiones, los datos se presentan como la

media de los tratamientos repetidos.

La concentración de oligonucleótido antisentido usado varía de línea celular a línea celular. Los métodos para determinar la concentración de oligonucleótidos antisentido óptima para una línea celular particular son bien conocidos en la técnica. Los oligonucleótidos antisentido se usan típicamente en concentraciones que varían de 1 nM a 300 nM cuando se transfectan con LIPOFECTAMINE. Los oligonucleótidos antisentido se usan a concentraciones más altas que varían de 625 a 20.000 nM cuando se transfectan usando electroporación.

Aislamiento de ARN

El análisis de ARN puede realizarse en ARN celular total o ARNm poli(A)+. Los métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. El ARN se prepara usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, usando el Reactivo TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con los protocolos recomendados por el fabricante.

Análisis de la inhibición de niveles o expresión objetivo

La inhibición de los niveles o la expresión de un ácido nucleico de MALAT-1 se puede analizar de diversas maneras conocidas en la técnica. Por ejemplo, los niveles de ácido nucleico objetivo pueden cuantificarse mediante, por ejemplo, análisis de transferencia Northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva o PCR en tiempo real cuantitativa. El análisis de ARN puede realizarse en ARN celular total o ARNm poli(A)+. Los métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. El análisis de transferencia Northern también es una rutina en la técnica. La PCR cuantitativa en tiempo real se puede llevar a cabo convenientemente usando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7600, 7700 o 7900 comercialmente disponible, disponible de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y usado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis de PCR en Tiempo Real Cuantitativo de los Niveles de ARN Objetivo

La cuantificación de los niveles de ARN objetivo puede realizarse mediante PCR en tiempo real cuantitativa usando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7600, 7700 o 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los métodos de PCR en tiempo real cuantitativa son bien conocidos en la técnica.

Antes de la PCR en tiempo real, el ARN aislado se somete a una reacción de transcriptasa inversa (RT), que produce ADN complementario (ADNc) que luego se usa como sustrato para la amplificación por PCR en tiempo real. La RT y las reacciones de PCR en tiempo real se realizan secuencialmente en la misma muestra. La RT y los reactivos de PCR en tiempo real se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). Las reacciones de RT y PCR en tiempo real se llevan a cabo por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Las cantidades objetivo de genes (o ARN) obtenidas mediante PCR en tiempo real se normalizan usando o el nivel de expresión de un gen cuya expresión es constante, como ciclofilina A, o cuantificando el ARN total usando RIBOGREEN (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA). La expresión de ciclofilina A se cuantifica mediante PCR en tiempo real, ejecutando simultáneamente con el objetivo, multiplexación o por separado. El ARN total se cuantifica usando el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN (Invitrogen, Inc. Eugene, OR). Los métodos de cuantificación de ARN por RIBOGREEN se enseñan en Jones, L.J., et al., (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374). Se usa un instrumento CYTOFLUOR 4000 (PE Applied Biosystems) para medir la fluorescencia de RIBOGREEN.

Las sondas y los cebadores están diseñados para hibridar con un ácido nucleico de MALAT-1. Los métodos para diseñar sondas y cebadores de PCR en tiempo real son bien conocidos en la técnica, y pueden incluir el uso de software como el Software PRIMER EXPRESS (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Análisis de los Niveles de Proteína

La inhibición antisentido de ácidos nucleicos MALAT-1 puede evaluarse midiendo los niveles de proteína de MALAT-1. Los niveles de proteína de MALAT-1 pueden evaluarse o cuantificarse de una variedad de formas bien conocidas en la técnica, como inmunoprecipitación, análisis de transferencia Western (inmunotransferencia), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayos de proteínas cuantitativos, ensayos de actividad de proteínas (por ejemplo, ensayos de actividad de caspasa), inmunohistoquímica, inmunocitoquímica o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Los anticuerpos dirigidos a un objetivo pueden identificarse y obtenerse a partir de una variedad de fuentes, como el catálogo de anticuerpos MSRS (Aerie Corporation, Birmingham, MI), o pueden prepararse por métodos convencionales de generación de anticuerpos monoclonales o policlonales bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos útiles para la detección de MALAT-1 están disponibles comercialmente.

EJEMPLOS

Habiendo descrito en general realizaciones perfiladas a compuestos y métodos para tratar el cáncer en un animal que incluyen administrar un compuesto antisentido que se dirige a MALAT-1, se puede obtener una comprensión adicional por referencia a ciertos ejemplos específicos que se proporcionan en la presente solo con fines ilustrativos, y que no se pretende que sean limitativos.

5 Ejemplo 1: Inhibición antisentido de ARN no codificante de transcrito¹ de adenocarcinoma en pulmón asociado a metástasis murino (MALAT-1) en células b.END

10 Los oligonucleótidos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de MALAT-1 murino se probaron para sus efectos sobre el ARN de MALAT-1 *in vitro*. Las células b.END cultivadas se colocaron en placas a una densidad de 4.000 células por pocillo y se transfectaron usando reactivo de Citofectina con concentraciones de 3,125 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25,0 nM, 50,0 nM o 100,0 nM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 1. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARN de MALAT-1 mediante PCR en tiempo real cuantitativa.

15 El ISIS 395251 (CCAGGCTGGTTATGACTCAG; SEQ ID NO: 13), dirigido a la secuencia del gen de MALAT-1 murino, SEQ ID NO: 10 (Nº de acceso GENBANK NR_002847.2) en el sitio de inicio 3338; el ISIS 399462 (GGGTCAGCTGCCAATGCTAG; SEQ ID NO: 14), dirigido a la SEQ ID NO: 10 en el sitio de inicio 1280; y el ISIS 399479 (CGGTGCAAGGCTTAGGAATT; SEQ ID NO: 15) dirigido a la SEQ ID NO: 10 en el sitio de inicio 4004, eran tres de los oligonucleótidos antisentido probados en el ensayo. El ISIS 395251 también tiene reactividad cruzada con la secuencia del gen de MALAT-1 humano (Nº de acceso GENBANK NR_00819.2, SEQ ID NO: 7) en el sitio de inicio 4897. Los oligonucleótidos antisentido se diseñaron como gapmers 5'-10-5 MOE, y son de 20 nucleósidos de longitud, en donde el segmento de hueco central comprende diez 2'-desoxinucleósidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden 5 nucleósidos cada una. Cada nucleósido en el segmento de ala 5' y cada nucleósido en el segmento de ala 3' tiene una modificación 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos en todo el gapmer son enlaces fosforotioato (P=S). Todos los residuos de citosina en todo el gapmer son 5-metilcitosinas. La concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀) de cada oligonucleótido se presenta también en la Tabla 1. Como se ilustra en la Tabla 1, los niveles de ARN de MALAT-1 se redujeron significativamente de una manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

30 **Tabla 1**

Inhibición dependiente de la dosis de ARN de MALAT-1 en células b.END							
ISIS Nº	3.125 nM	6.25 nM	12.5 nM	25.0 nM	50.0 nM	100.0 nM	IC ₅₀ (nM)
399479	14	31	55	71	84	91	12.6
399462	20	36	50	68	81	92	12.3
395251	23	45	57	66	85	90	10.1

35 Ejemplo 2: Efecto de la inhibición antisentido de MALAT-1 en un modelo de ratón ApcMin

45 La ApcMin (Min, neoplasia intestinal múltiple) es una mutación puntual en el homólogo murino del gen APC. Los ratones Min/+ desarrollan adenomas intestinales y se consideran un modelo estándar que refleja la condición humana (Moser, A.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 8977, 1993). El efecto de la inhibición de la expresión de ARN de MALAT-1 con oligonucleótidos antisentido en la carga de pólipos de intestino delgado se examinó en ratones ApcMin.

50 *Tratamiento*

Se dividieron aleatoriamente ratones ApcMin de 9 semanas de edad en tres grupos de tratamiento de 4 ratones cada uno. El primer grupo de tratamiento se inyectó con 50 mg/kg de ISIS 399479 (SEQ ID NO: 15), administrado por vía subcutánea 5 días a la semana durante 4 semanas. El segundo grupo de tratamiento se inyectó con 50 mg/kg de oligonucleótido de control, ISIS 141923 (5'-CCTTCCCTGAAGGTTCCCTCC-3', un gapmer 5-10-5 MOE, designado en la presente como SEQ ID NO: 16, que no tiene homología conocida con ningún gen de ratón), administrado por vía subcutánea 5 días a la semana durante 4 semanas. El tercer grupo se inyectó con PBS, administrado por vía subcutánea 5 días a la semana durante 4 semanas. El día 28, los ratones se sacrificaron con isoflurano seguido de una dislocación cervical. El intestino delgado, los colonos y el tejido hepático se recogieron y procesaron para su posterior análisis.

60 *Análisis de ARN*

65 El aislamiento del ARN se realizó usando el Kit de Purificación de ARN Total Invitrogen PureLink™, de

acuerdo con el protocolo del fabricante. Se realizó RT-PCR usando el sistema Step One Plus de Applied Biosystems. La expresión de ARN de MALAT-1 se midió usando el conjunto de sonda de cebador mMALAT1#2 (secuencia directa TGGGTTAGAGAAGGCGTGTACTG, designada en la presente como SEQ ID NO: 17, secuencia inversa TCAGCGGCAACTGGGAAA, designada en la presente como SEQ ID NO: 18, secuencia de sonda CGTTGGCACGACACCTTCAGGGACT, designada en la presente como SEQ ID NO: 19) y se normalizó a la expresión de ARNm de ciclofilina. La sonda de cebador establecida para ciclofilina fue m_Cyclo24 (secuencia directa TCGCCGCTTGCTGCA, designada en la presente como SEQ ID NO: 20, secuencia inversa ATCGGCCGTGATGTCGA, designada en la presente como SEQ ID NO: 21, secuencia de sonda CCATGGTCAACCCACCGTGTTC, designada en la presente como SEQ ID NO: 22).

La expresión de ARN de MALAT-1 se evaluó en el hígado y los intestinos. Como se muestra en la Tabla 2, la expresión de ARN de MALAT-1 en ratones tratados con ISIS 399479 se inhibió significativamente en comparación con el grupo tratado con oligonucleótido de control. Los niveles de expresión de ARNm se expresan como porcentaje de inhibición de los niveles de expresión en comparación con el control de PBS.

Tabla 2

Porcentaje de inhibición de los niveles de ARN de MALAT-1 (%) en comparación con el control de PBS		
	ISIS 399479	ISIS 141923
Hígado	98	0
Intestinos	94	6

Análisis de proliferación celular

El ensayo de proliferación celular BrdU (Rothaeusler, K. y Baumgarth, N. Curr. Protoc. Cytom. 2007. Capítulo 7: Unidad 7.31) detecta 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) incorporada en el ADN celular durante la proliferación celular. La cantidad de BrdU incorporada en las células es un indicador directo de la proliferación celular y se midió usando un anticuerpo anti-BrdU (Sigma Aldrich).

El BrdU, a una concentración de 50 mg/kg, se inyectó por vía intraperitoneal durante 5 días consecutivos comenzando en el día 24. Los animales se sacrificaron el día 28. Todo el intestino delgado de cada animal se hizo en un "rollo suizo", una técnica estándar para estudios histológicos de intestino de roedor (Moolenbeek, C. y Ruitenbergh, E.J. Lab Anim. 1981. 15: 57-9). Se extirparon dos secciones del intestino separadas por lo menos 500 µm de cada rodillo. Las células tumorales BrdU positivas se midieron de todos los pólipos en ambas secciones.

Los resultados se presentan en la Tabla 3, como el porcentaje de células BrdU positivas detectadas. Como se muestra en la Tabla 3 hubo una disminución en el porcentaje de células positivas en los ratones tratados con ISIS 399479 en comparación con el control. Este resultado se corresponde con la reducción en la expresión de MALAT-1, medida usando el software ViewRNA y como se muestra en la Tabla 4. Los datos se presentan como la densidad de señal de los niveles de expresión de ARNm de MALAT-1 multiplicados por las células BrdU positivas totales, presentadas en unidades arbitrarias .

Por lo tanto, el tratamiento de ratones ApcMin con oligonucleótidos antisentido dirigidos a MALAT-1 muestra una disminución en la proliferación de células tumorales en comparación con el grupo control.

Tabla 3

Células BrdU positivas (%) en ratones ApcMin	
	%
ISIS 399479	23
ISIS 141923	51
PBS	48

Tabla 4

Niveles de expresión de MALAT-1 en ratones ApcMin (densidad de señal de los niveles de expresión de ARNm de MALAT-1 multiplicados por el total de células BrdU positivas presentadas como unidades arbitrarias (a.u.))	
	a.u.
ISIS 399479	9.6
ISIS 141923	16.2

Medición de la carga de pólipos tumorales

El intestino delgado completo de cada animal se hizo en un "rollo suizo" y se procesó para inclusión en parafina. Se recogieron dos secciones del intestino separadas por al menos 500 µm de cada rollo. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina, y se contó el número de pólipos en ambas secciones, y luego se dividió por dos. Como se muestra en la Tabla 5, la carga de pólipos tumorales disminuyó en ratones ApcMin tratados con oligonucleótidos antisentido dirigidos a MALAT-1 en comparación con el grupo de oligonucleótidos de control.

Tabla 5

Carga de pólipos tumorales en ratones ApcMin	
	Pólipos/animal
ISIS 399479	1.6
ISIS 141923	4.5
PBS	5.8

Ejemplo 3: Efecto de la inhibición antisentido de MALAT-1 en un modelo de ratón de carcinoma hepatocelular inducido por DEN

La dietil nitrosamina (DEN) es un carcinógeno químico estándar para inducir carcinoma hepatocelular (HCC) en roedores (Park, D.H. et al., Toxicol. Lett. 2009. 191:321-6). En este modelo se examinó el efecto de la inhibición de la expresión de ARN de MALAT-1 con oligonucleótidos antisentido sobre el desarrollo y la progresión de HCC.

Tratamiento

A ratones machos C57BL/6, de 2 semanas de edad, se les dio 25 mg/ml de DEN por inyección intraperitoneal para inducir el desarrollo de HCC. Cinco meses después de la inyección de DEN, los ratones se dividieron aleatoriamente en tres grupos de tratamiento. El primer grupo de tratamiento recibió 50 mg/kg de ISIS 399479, administrado por vía subcutánea dos veces por semana durante 16 semanas. El segundo grupo de tratamiento se inyectó con 50 mg/kg de oligonucleótido de control, ISIS 141923, administrado por vía subcutánea dos veces por semana durante 16 semanas. El tercer grupo se inyectó con PBS, administrado por vía subcutánea dos veces por semana durante 16 semanas. Los ratones se sacrificaron el día 111 (el primer tratamiento con oligonucleótidos se contó como el día 1). Se contaron los HCC inducidos por DEN en la superficie del hígado y se recogieron y procesaron para análisis posterior.

Análisis de ARN

Se aisló ARN de cada HCC usando un kit de extracción de ARN de Qiagen. La expresión de ARN de MALAT-1 se midió mediante qPCR usando el conjunto de sonda de cebador mMALAT1#2 y se normalizó a la expresión de ARNm de ciclofilina.

La expresión de ARN de MALAT-1 en ratones tratados con ISIS 399479 se inhibió significativamente en un 94% en comparación con el grupo tratado con PBS.

Medición de carga tumoral

Los tumores de la superficie del hígado en ratones de todos los grupos se contaron al final del experimento. Como se muestra en la Tabla 6, el número de tumores disminuyó significativamente en ratones tratados con oligonucleótidos antisentido dirigidos a MALAT-1 en comparación con el grupo de PBS ($p=0,017$) o el

grupo de oligonucleótidos de control (p=0,02).

Tabla 6

Número de tumores en el modelo de ratón de HCC inducido por DEN	
Grupos de tratamiento	Tumores/ratón
ISIS 399479	1.9
ISIS 141923	4.0
PBS	4.3

5

10

15 **Ejemplo 4: Efecto de la inhibición antisentido de MALAT-1 en un modelo de ratón de xenoinjerto C26**

Se examinó el efecto de la inhibición de la expresión de ARN de MALAT-1 con oligonucleótidos antisentido sobre la progresión de HCC en el modelo de xenoinjerto de cáncer de colon C26 murino.

20 *Tratamiento*

Se cultivaron células de carcinoma de colon C26 en medio RPMI que contenía suero bovino fetal a una concentración final del 10%, y con 5% de CO₂ a 37° C. Se implantaron por vía subcutánea cinco millones de células en ratones CD2F1 macho.

25

Cuatro días después de la implantación tumoral, los ratones se dividieron aleatoriamente en tres grupos de tratamiento. El primer grupo de tratamiento se inyectó con 50 mg/kg de ISIS 399462 (SEQ ID NO: 14), administrado por vía subcutánea 5 días a la semana durante 3 semanas. El segundo grupo de tratamiento se inyectó con 50 mg/kg de ISIS 395251 (SEQ ID NO: 13), administrado por vía subcutánea 5 días a la semana durante 3 semanas. El tercer grupo de tratamiento se inyectó con 50 mg/kg de oligonucleótido de control, ISIS 347526 (TCTTATGTTTCCGAACCGTT; gapmer 5-10-5 MOE sin objetivo murino o humano conocido) (SEQ ID NO: 23) administrado por vía subcutánea 5 días a la semana durante 3 semanas. Los ratones se sacrificaron el día 26. Se recogieron los tejidos del hígado y del tumor y se procesaron para un análisis posterior. Los datos presentados son la media de 2 experimentos independientes con resultados similares.

30

35

Análisis de ARN

La extracción de ARN y los análisis se realizaron utilizando un kit de extracción de ARN de Qiagen. La expresión de ARN de MALAT-1 se midió usando el conjunto de sonda de cebador mMALAT1 (secuencia directa GTAGGTTAAGTTGACGGCCGTTA, designada en la presente como SEQ ID NO: 24, secuencia inversa ATCTTCCCTGTTTCCAACATCATG, designada en la presente como SEQ ID NO: 25, secuencia de sonda AAAAATCCTTCGACTGGCGCATGTACG, designada en la presente como SEQ ID NO: 26) y se normalizó a la expresión de ARNm de ciclofilina.

40

45

La expresión del ARN de MALAT-1 se evaluó en el hígado. Como se muestra en la Tabla 7, la expresión del ARN de MALAT-1 en ratones tratados con ISIS 395251 o ISIS 399462 se inhibió en comparación con el grupo tratado con oligonucleótido de control. Los niveles de expresión de ARNm se expresan como porcentaje de inhibición de los niveles de expresión en comparación con el del grupo control (normalizado al 0%).

50

Tabla 7

Porcentaje de inhibición de los niveles de ARN de MALAT-1 (%) en comparación con el control de PBS	
	% de inhibición
ISIS 395251	57
ISIS 399462	71

55

60 *Medición del peso y del volumen tumorales*

Los volúmenes tumorales se midieron de forma regular durante todo el período del estudio, usando calibres Vernier. Como se muestra en la Tabla 8, los volúmenes tumorales se redujeron significativamente en ratones tratados con ISIS 395251 o ISIS 399462.

65

El peso del tumor en cada ratón de todos los grupos también se evaluó el día 26. Tal como se muestra en la Tabla 9, el peso tumoral disminuyó en ratones tratados con oligonucleótidos antisentido dirigidos a MALAT-1 en comparación con el del grupo de oligonucleotídico de control. Estos resultados demuestran que los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MALAT-1 redujeron el crecimiento de cáncer de colon.

Tabla 8

Volumen tumoral (mm ³) en el modelo de xenoinjerto C26						
ISIS N°	día 8	día 11	día 14	día 19	día 22	día 25
399462	406	615	960	1365	1802	2275
395251	341	501	877	1480	1635	1641
347526	408	803	1493	2437	2647	3405

Tabla 9

Peso tumoral en el modelo de xenoinjerto C26	
ISIS N°	Peso (gramos)
395251	1.6
399462	1.7
347526	2.6

Ejemplo 5: Efecto de la inhibición antisentido de MALAT-1 en un modelo de ratón ortotópico de hígado Hep3B

Un modelo tumoral de xenoinjerto ortotópico de carcinoma hepatocelular creado por inyección de células Hep3B directamente en el parénquima del hígado de ratones desnudos es un modelo estándar para estudiar HCC (Yao, X. et al., Clin. Cancer Res. 2003. 9: 2719). El efecto de la inhibición de la expresión de ARN de MALAT-1 con oligonucleótidos antisentido sobre la supervivencia animal se examinó en el modelo ortotópico de hígado Hep3B.

Tratamiento

La línea celular de HCC humano Hep3B se adquirió de ATCC. Se mantuvieron células Hep3B se mantuvieron en medio MEM que contenía suero bovino fetal a una concentración final del 10%, y con 5% de CO₂ a 37° C. Se recogieron células Hep3B que crecían exponencialmente mediante tratamiento con tripsina-EDTA (Gibco-BRL) y se lavaron una vez con PBS. El sedimento celular se suspendió en PBS y se mantuvo en hielo antes de la inyección intrahepática en ratones.

Se anestesiaron ratones desnudos atímicos BALB/c hembra (nu/nu) de 4 a 6 semanas de edad con isoflurano. Se hizo una pequeña incisión transversal debajo del esternón para exponer el hígado. Se inyectó lentamente una suspensión PBS de 2 x 10⁶ células Hep3B en el lóbulo superior izquierdo del hígado usando una aguja de calibre 28. Las células se inyectaron en un ángulo de 30 grados en el hígado. Después de la inyección, se colocó una pequeña pieza de gasa estéril en el lugar de la inyección y se aplicó presión ligera durante 1 minuto para evitar el sangrado. El abdomen se cerró luego con una sutura de seda 6-0. Se permitió que los ratones se recuperasen en una jaula caliente.

Después de 10 días, se analizó el nivel de expresión de alfa-fetoproteína (AFP), que se usó como un marcador positivo de crecimiento tumoral en los ratones. Los ratones que dieron positivo para el marcador se dividieron aleatoriamente en dos grupos de tratamiento. El primer grupo de tratamiento se inyectó con 50 mg/kg de ISIS 395251 (SEQ ID NO: 13), administrado por vía intraperitoneal 2 días a la semana durante 7 semanas. El segundo grupo de tratamiento se inyectó con 50 mg/kg de oligonucleótido control, ISIS 347526 (SEQ ID NO: 23) administrado por vía intraperitoneal 2 días a la semana durante 7 semanas.

Supervivencia mediana

Cada grupo fue monitorizado y se registraron las muertes. Al final del estudio, se calculó la supervivencia mediana de cada grupo usando la fórmula estadística de Kaplan-Meier y los datos se presentan en la Tabla 10. Como se muestra en la Tabla 10, la supervivencia mediana aumentó significativamente en ratones tratados con ISIS

395251 en comparación con el grupo de control. Estos datos demuestran que los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MALAT-1 aumentan la supervivencia de los animales que tienen cáncer.

Tabla 10

Supervivencia mediana en el modelo ortotópico de hígado Hep3B	
ISIS N°	días
395251	88
347526	49

Ejemplo 6: Efecto de la inhibición antisentido de MALAT-1 en un modelo de ratón de xenoinjerto EBC-1 metastásico

El efecto de la inhibición de la expresión de ARN de MALAT-1 con oligonucleótidos antisentido sobre la metástasis se examinó en un modelo de ratón de xenoinjerto de cáncer de pulmón EBC-1.

Tratamiento

La línea celular humana EBC-1 se adquirió de Health Sciences Foundation, Japón. Se mantuvieron células EBC-1 en medio RPMI que contenía suero bovino fetal a una concentración final del 10%, y con 5% de CO₂ a 37° C. Se recogieron las células EBC-1 que crecían exponencialmente mediante tripsina-EDTA (Gibco-BRL) y se lavaron una vez con PBS. El sedimento celular se suspendió en PBS y se implantaron un millón de células mediante inyección subcutánea en ratones desnudos BALB/c.

Dos semanas después de la implantación del tumor humano EBC-1, los ratones se dividieron aleatoriamente en dos grupos de tratamiento. El primer grupo de tratamiento se inyectó con 50 mg/kg 5 días a la semana de ISIS 395251 (SEQ ID NO: 13), administrado por vía subcutánea durante 5 semanas. El segundo grupo de tratamiento se inyectó con 50 mg/kg 5 días a la semana de oligonucleótido de control, ISIS 347526 (SEQ ID NO: 23) administrado por vía subcutánea durante 5 semanas. En la semana 7, se extirpó quirúrgicamente el tumor subcutáneo y la herida se cerró con una sutura 4-0. Los ratones se sacrificaron en la semana 12 después del inicio del tratamiento con oligonucleótidos antisentido. El tejido pulmonar se recolectó y procesó para un análisis adicional. Los datos presentados son la media de 3 experimentos independientes con resultados similares.

Medición del volumen del tumor primario y la multiplicidad de tumores pulmonares

A lo largo del período de estudio se midieron los volúmenes tumorales primarios, usando calibres Vernier. Como se muestra en la Tabla 11, en la semana 7 justo antes de la extracción del xenoinjerto, los volúmenes del tumor disminuyeron significativamente en los ratones tratados con ISIS 395251 en comparación con el grupo control ($p=0,00006$).

La multiplicidad de tumores también se contó usando un microscopio de luz. Como se muestra en la Tabla 12, la multiplicidad de tumores disminuyó en ratones tratados con ISIS 395251 en comparación con el control. Estos datos demuestran que los oligonucleótidos antisentido dirigidos a MALAT-1 inhiben la metástasis.

Tabla 11

Volumen tumoral en el modelo de xenoinjerto EBC-1	
ISIS N°	Volumen (mm ³)
395251	1755
347526	2838

Tabla 12

Multiplicidad de tumores en el modelo de xenoinjerto EBC-1	
ISIS N°	Recuento de tumores
395251	68
347526	167

Ejemplo 7: Efecto de la inhibición antisentido de MALAT-1 en el modelo de ratón TRAMP

El adenocarcinoma transgénico del modelo de próstata de ratón (TRAMP) refleja estrechamente la patogénesis del cáncer de próstata humano (Hurwitz, A.A. et al., Curr. Protoc. Immunol. 2001. Capítulo 20: Unidad 20.5). El efecto de la inhibición de la expresión del ARN de MALAT-1 con oligonucleótidos antisentido en la progresión tumoral se examinó en ratones TRAMP.

Tratamiento

Se dividieron aleatoriamente ratones TRAMP de 23 semanas de edad en dos grupos de tratamiento. El primer grupo de tratamiento se inyectó con 50 mg/kg de ISIS 395251 (SEQ ID NO: 13), administrado por vía subcutánea 5 días a la semana durante 3 semanas. El segundo grupo de tratamiento se inyectó con PBS administrado por vía subcutánea 5 días a la semana durante 3 semanas. Los ratones se sacrificaron al final de las 26 semanas. El tejido de la próstata se recogió y procesó para análisis adicional.

Análisis de ARN

La extracción de ARN se realizó usando un kit de extracción de ARN de Qiagen. La expresión de ARN de MALAT-1 se midió usando el conjunto de sonda de cebador mMALAT1 y se normalizó a la expresión de ARNm de ciclofilina.

Se evaluó en el tumor la expresión de ARN de MALAT-1. La expresión de ARN de MALAT-1 en ratones tratados con ISIS 395251 se inhibió en un 80% en comparación con el grupo de control.

Medición del peso tumoral

El tejido tumoral se extirpó de la próstata. Los pesos tumorales se midieron de forma regular durante todo el período del estudio, usando calibres Vernier. Como se muestra en la Tabla 13, el peso tumoral disminuyó en los ratones tratados con ISIS 395251 en comparación con el grupo de control.

Tabla 13

Peso tumoral en el TRAMP	
	Peso (gramos)
ISIS 395251	1.0
PBS	9.3

Ejemplo 8: Efecto de la inhibición antisentido de MALAT-1 en un modelo de ratón de xenoinjerto de cáncer de pulmón de células no pequeñas derivado de paciente

La biopsia de la masa tumoral se realizó en un paciente con cáncer de pulmón de células no pequeñas (en la Universidad de California, Davis) y esta se implantó directamente en ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid}112rg^{tm1Wjl}/SzJ macho (NSG; Jackson Laboratories). Después de 2 pases *in vivo*, las células tumorales del xenoinjerto se depositaron en Jackson Laboratories (designadas en la presente como LG-476 P2). Se examinó el efecto de la inhibición de la expresión de ARN de MALAT-1 con oligonucleótidos antisentido en la progresión tumoral de este tumor en ratones.

Tratamiento

Se implantó a dos ratones NSG con el tumor LG-476 P2 y se monitorizaron tres veces por semana. Una vez que los tumores alcanzaron 1.000 mm³ de volumen, se recogieron los tumores y se fragmentaron do en 3-5 mm³

de tamaño. Cada fragmento se implantó luego subcutáneamente en el flanco trasero derecho de 30 ratones NSG. Los ratones se observaron tres veces por semana y una vez que los tumores alcanzaron 200-250 mm³ de tamaño, los ratones se dividieron aleatoriamente en dos grupos de tratamiento. El primer grupo de tratamiento se inyectó con 50 mg/kg de ISIS 395251 (SEQ ID NO: 13), administrado por vía subcutánea 5 días a la semana durante 3 semanas. El segundo grupo de tratamiento se inyectó con PBS administrado por vía subcutánea 5 días a la semana durante 3 semanas. Los ratones se sacrificaron por inhalación de CO₂ 24 horas después de la última dosis. El tejido tumoral se recogió y procesó para análisis adicional.

Análisis de ARN

La extracción de ARN se realizó usando un kit de extracción de ARN de Qiagen. La expresión de ARN de MALAT-1 se midió usando el conjunto de sonda de cebador RTS2736 y se normalizó a la expresión de ARNm de ciclofilina.

Se evaluó la expresión del ARN MALAT-1 en el tumor. La expresión de ARN de MALAT-1 en ratones tratados con ISIS 395251 se inhibió en un 76% en comparación con el grupo de control.

Medición del volumen tumoral

Los volúmenes tumorales se midieron de forma regular durante todo el período del estudio, usando calibres Vernier. Como se muestra en la Tabla 14, los volúmenes tumorales disminuyeron en los ratones tratados con ISIS 395251 en comparación con el grupo control.

Tabla 14

Volumen tumoral (mm ³) en diferentes días en el modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón de células pequeñas									
	Día 1	Día 3	Día 6	Día 8	Día 10	Día 13	Día 15	Día 17	Día 20
ISIS 395251	227	376	391	448	529	681	661	747	715
PBS	225	314	384	494	568	696	917	1047	2049

Ejemplo 9: Efecto de la inhibición antisentido de MALAT-1 en un modelo de ratón de xenoinjerto Colo201

El efecto de la inhibición de la expresión de ARN de MALAT-1 con oligonucleótidos antisentido sobre la progresión tumoral se examinó en el modelo de ratón de xenoinjerto Colo201.

Tratamiento

Se adquirió la línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano Colo201 de ATCC. Se mantuvieron células Colo201 en medio RPMI que contenía suero bovino fetal a una concentración final del 10%, y con 5% de CO₂ a 37° C. Se recogieron células Colo201 que crecían exponencialmente mediante tripsina-EDTA (Gibco-BRL) y se lavaron una vez con PBS. El sedimento celular se suspendió en PBS y se mantuvo en hielo antes de la inyección intrahepática en ratones desnudos BALB/c hembra.

Cuatro días después de la implantación del tumor, los ratones se dividieron aleatoriamente en tres grupos de tratamiento. El primer grupo de tratamiento se inyectó con 50 mg/kg de ISIS 395251 (SEQ ID NO: 13), administrado por vía subcutánea 5 días a la semana durante 3,5 semanas. El segundo grupo de tratamiento se inyectó con 50 mg/kg de ISIS 347526 (SEQ ID NO: 23), administrado por vía subcutánea 5 días a la semana durante 3,5 semanas. El tercer grupo se inyectó con PBS administrado por vía subcutánea 5 días a la semana durante 3,5 semanas. Los ratones se sacrificaron el día 29. El tejido tumoral se recogió y se procesó para análisis adicional.

Análisis de ARN

La extracción de ARN se realizó usando un kit de extracción de ARN de Qiagen. La expresión de ARN de MALAT-1 se midió usando el conjunto de sonda de cebador RTS2736 y se normalizó a la expresión de ARNm de ciclofilina.

Se evaluó en el hígado la expresión del ARN de MALAT-1. La expresión de ARN de MALAT-1 en ratones tratados con ISIS 395251 se inhibió en un 39% en comparación con el grupo de control.

Medición del volumen del tumoral

Los volúmenes tumorales se midieron de forma regular durante todo el período del estudio, usando calibres Vernier. Como se muestra en la Tabla 15, los volúmenes tumorales disminuyeron en ratones tratados con ISIS 395251 en comparación con el grupo de control.

5

Tabla 15

Volumen tumoral en días diferentes en el modelo de xenoinjerto de cáncer Colo201								
	Día 4	Día 7	Día 10	Día 15	Día 18	Día 21	Día 24	Día 29
ISIS 395251	138	132	186	207	241	247	288	341
ISIS 347526	148	156	209	238	354	439	428	476
PBS	159	142	184	240	373	393	404	495

10

15

LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> Isis Pharmaceuticals, Inc.
 C. Frank Bennett
 Susan M. Freier
 Eric G. Marcusson
 Ssucheng J. Hsu
 Youngsoo Kim
 25 Robert A. MacLeod

<120> METHODS FOR MODULATING METASTASI S-ASSOCIATED-IN-LUNG-ADENOCARCINOMA-
 TRANSCRIPT-1 (MALAT-1) EXPRESSION

30 <130> BIOL0181US.L

<150> 61/579,343
 <151> 2011-12-22

35 <160> 29
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
 <211> 8708
 40 <212> ADN
 <213> Homo sapien

45

50

55

60

65

	gtaaaggact	ggggccccgc	aactggcctc	tcctgccctc	ttaagcgag	cgccatttta	60
	gcaacgcaga	agccccggcg	cgggaagcct	cagctcgctc	gaaggcaggt	cccctctgac	120
	gcctccggga	gcccagggtt	cccagagtcc	ttgggacgca	gcgacgagtt	gtgctgctat	180
5	cttagctgtc	cttataggct	ggccattcca	ggtggtggt	tttagataaa	accactcaaa	240
	ctctgcagtt	tggctctggg	gtttgaggga	aagcttttat	ttttcttcct	gctccggttc	300
	agaaggtctg	aagctcatac	ctaaccaggc	ataacacaga	atctgcaaaa	caaaaacccc	360
	taaaaaagca	gacccagagc	agtgtaaaca	cttctgggtg	tgtccctgac	tggctgcca	420
	aggtctctgt	gtcttcggag	acaaagccat	tcgcttagtt	ggtctacttt	aaaaggccac	480
10	ttgaactcgc	tttccatggc	gatttgccct	gtgagcactt	tcaggagagc	ctggaagctg	540
	aaaaacggta	gaaaaatttc	cgtgcggggc	gtggggggct	ggcggcaact	ggggggccgc	600
	agatcagagt	gggccactgg	cagccaacgg	ccccggggc	tcaggcgggg	agcagctctg	660
	tgggtgtgga	ttgaggcggt	ttccaagagt	gggttttcac	gtttctaaga	tttcccaagc	720
	agacagcccg	tgctgctccg	atctctcgaa	caaaaaagca	aaacgtgtgg	ctgtcttggg	780
15	agcaagtctc	aggactgcaa	gcagttgggg	gagaaagtcc	gccattttgc	cacttctcaa	840
	ccgtccctgc	aaggctgggg	ctcagttgcg	taatggaaag	taaagccctg	aactatcaca	900
	ctttaatctt	ccttcaaaag	gtggtaaaact	atacctactg	tccctcaaga	gaacacaaga	960
	agtgtcttaa	gaggtatctt	aaaagttccg	ggggttttgt	gaggtgtttg	atgacccgtt	1020
20	taaaatatga	tttccatggt	tcttttgtct	aaagtttgca	gctcaaactc	ttccacacgc	1080
	tagtaattta	agtatttctg	catgtgtagt	ttgcattcaa	gttccataag	ctgttaagaa	1140
	aatctagaa	aagtaaaact	agaacctatt	tttaaccgaa	gaactacttt	ttgcctccct	1200
	cacaaaggcg	gcggaagggt	atcgaattcc	ggtgatgcga	gttgttctcc	gtctataaat	1260
	acgcctcgcc	cgagctgtgc	ggtaggcatt	gaggcagcca	gcgcaggggc	ttctgctgag	1320
25	ggggcaggcg	gagcttgagg	aaaccgcaga	taagtttttt	tctctttgaa	agatagagat	1380
	taatacaact	acttaaaaaa	tatagtcaat	aggttactaa	gatattgctt	agcgttaagt	1440
	ttttaacgta	attttaatag	cttaagattt	taagagaaaa	tatgaagact	tagaagagta	1500
	gcatgaggaa	ggaaaagata	aaaggtttct	aaaacatgac	ggaggttgag	atgaagcttc	1560
	ttcatggagt	aaaaaatgta	tttaaaagaa	aattgagaga	aaggactaca	gagccccgaa	1620
30	ttaataccaa	tagaagggca	atgcttttag	attaaaatga	aggtgactta	aacagcttaa	1680
	agtttagttt	aaaagttgta	ggtgattaaa	ataatttgaa	ggcgatcttt	taaaaagaga	1740
	ttaaaccgaa	ggtgattaaa	agaccttgaa	atccatgacg	cagggagaaat	tgcgtcattt	1800
	aaagcctagt	taacgcattt	actaaacgca	gacgaaaatg	gaaagattaa	ttgggagtg	1860
35	taggatgaaa	caatttgag	aagatagaag	tttgaagtgg	aaaactggaa	gacagaagta	1920

40
45
50
55
60
65

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

```

cgggaaggcg aagaaaagaa tagagaagat agggaaatta gaagataaaa acatactttt 1980
agaagaaaaa agataaattt aaacctgaaa agtaggaagc agaagaaaaa agacaagcta 2040
ggaacaaaaa agctaagggc aaaatgtaca aacttagaag aaaattggaa gatagaaaca 2100
agatagaaaa tgaaaatatt gtcaagagtt tcagatagaa aatgaaaaac aagctaagac 2160
aagtattgga gaagtataga agatagaaaa atataaagcc aaaaattgga taaaatagca 2220
ctgaaaaaat gaggaaatta ttggtaacca atttatttta aaagcccatc aatttaattt 2280
ctggtggtgc agaagttaga aggtaaagct tgagaagatg aggggtgtta cgtagaccag 2340
aaccaattta gaagaatact tgaagctaga aggggaagtt ggttaaaaat cacatcaaaa 2400
agctactaaa aggactggtg taatttaaaa aaaactaagg cagaaggctt ttggaagagt 2460
tagaagaatt tggaaggcct taaatatagt agcttagttt gaaaaatgtg aaggactttc 2520
gtaacggaag taattcaaga tcaagagtaa ttaccaactt aatgtttttg cattggactt 2580
tgagtaaga ttatTTTTTA aatcctgagg actagcatta attgacagct gaccaggtg 2640
ctacacagaa gtggattcag tgaatctagg aagacagcag cagacaggat tccaggaacc 2700
agtgtttgat gaagctagga ctgaggagca agcgagcaag cagcagttcg tggatgaagt 2760
agggaaaagag tccaggagcc agtgcgattt ggtgaaggaa gctaggaaga aggaaggagc 2820
gctaaccgatt tgggtggtgaa gctagaaaaa aggtaccag gaaggagcga gtgcaatttg 2880
gtgatgaagg tagcaggcgg cttggcttgg caaccacacg gaggaggcga gcaggcgttg 2940
tgcgtagagg atcctagacc agcatgccag tgtgccaagg ccacagggaa agcgagtgg 3000
tggtaaaaat ccgtgaggtc ggcaatatgt tgtttttctg gaacttactt atggtaacct 3060
ttattttatt ttctaataata atggggagtt ttcgtactga ggtgtaaagg gatttatatg 3120
gggacgtagg ccgatttccg ggtgtttag gtttctcttt ttcaggctta tactcatgaa 3180
tcttgtctga agctttttgag ggcagactgc caagtccctgg agaaatagta gatggcaagt 3240
ttgtgggttt ttttttttta cacgaatttg aggaaaacca aatgaatttg atagcctaat 3300
tgagacaatt tcagcaaatc tgtaaagcagt ttgtatgttt agttggggtta atgaagtatt 3360
tcagttttgt gaatagatga cctgttttta ctctctcacc ctgaattcgt tttgtaaagt 3420
tagagtttgg atgtgtaact gaggcggggg ggagttttca gtatTTTTTT ttgtgggggt 3480
gggggcaaaa tatgttttca gttctttttc ccttaggtct gtctagaatc ctaaaggcaa 3540
atgactcaag gtgtaacaga aaacaagaaa atccaatatc aggataatca gaccaccaca 3600
ggtttacagt ttatagaaac tagagcagtt ctcacgttga ggtctgtgga agagatgtcc 3660
attggagaaa tggctggtag ttactctttt ttccccccac ccccttaatc agacttttaa 3720
agtgttaaac cccttaact tttttttttt tacttgaagc attttgggat ggtcttaaca 3780
gggaagagag aggggtgggg agaaaatggt ttttctaaag attttccaca gatgctatag 3840
tactattgac aaactgggtt agagaaggag tgtaccgctg tgctgttggc acgaacacct 3900
tcagggactg gagctgcttt tatccttgga agagtattcc cagttgaagc tgaaaagtac 3960
agcacagtgc agctttgggt catattcagt catctcagga gaacttcaga agagcttgag 4020
taggcctaat gttgaagtta agttttccaa taatgtgact tcttaaaagt tttattaaag 4080
gggaggggca aatattggca attagttggc agtggcctgt tacggttggg attggtgggg 4140
tgggtttagg taattgttta gtttatgatt gcagataaac tcatgccaga gaacttaag 4200
tcttagaatg gaaaaagtaa agaaatatca atctccaagt tggcaagtaa ctcccaatga 4260
tttagttttt ttccccccag tttgaattgg gaagctgggg gaagttaaat atgagccact 4320
gggtgtacca gtgcattaat ttgggcaagg aaagtgtcat aatttgatac tgtatctggt 4380
ttccttcaa gtatagagct tttggggaag gaaagtattg aactgggggt tggctggcc 4440
tactgggctg acattaacta caattatggg aaatgcaaaa gttgtttgga tatggtagt 4500
tgtggttctc ttttggaatt ttttccaggt gatttaataa taatttaaaa ctactataga 4560
aactgcagag caaaggaagt ggcttaatga tcctgaaggg atttctctctg atggtagctt 4620
ttgtattatc aagtaagatt ctattttcag ttgtgtgtaa gcaagttttt ttttagtga 4680
ggagaaatac ttttccattg tttactgca aaacaagatg ttaaggtatg cttcaaaaat 4740
ttgtaaatt gtttatttta aacttatctg tttgtaaatt gtaactgatt aagaattgtg 4800
atagttcagc ttgaatgtct cttagagggt gggcttttgt tgatgagga ggggaaactt 4860
tttttttttc tatagacttt tttcagataa catcttctga gtcataacca gcctggcagt 4920
atgatggcct agatgcagag aaaacagctc cttggtgaat tgataagtaa aggcagaaaa 4980
gattatatgt catacctcca ttggggaata agcataaacc tgagattcct actactgatg 5040
agaacattat ctgcatatgc caaaaaattt taagcaaatg aaagctacca atttaaagt 5100
acggaatcta ccatttttaa gtttaattgct tgtcaagcta taaccacaaa aataatgat 5160
ttgtagaaaa tacaatgaag aggcaatgct catctcaaaa tactgctttt ccaaagccag 5220
aataaaaagc aaaagaaatg aaaatgttac actacattaa tcctggaata aaagaagccg 5280
aaataaatga gagatgagtt gggatcaagt ggattgagga ggctgtgctg tgtgccaatg 5340
tttcgtttgc ctacagacagg tatctctctg ttatcagaag agttgcttca tttcatctgg 5400
gagcagaaaa cagcaggcag ctgttaacag ataagtttaa cttgcatctg cagtattgca 5460
tgttagggat aagtgcctat ttttaagagc tgtggagttc ttaaatatca accatggcac 5520
tttctcctga ccccttccct aggggatttc aggattgaga aatttttcca tcgagccttt 5580
ttaaattgt aggacttgtt cctgtgggct tcagtgatgg gatagtacac ttcactcaga 5640
ggcatttgca tctttaaata atttctaaa agcctctaaa gtgatcagtg ccttgatgcc 5700
  
```

	aactaaggaa	atgtgtttag	cattgaatct	ctgaaggctc	tatgaaagga	atagcatgat	5760
	gtgctgtag	aatcagatgt	tactgctaaa	atctacatgt	tgtgatgtaa	attgtgtaga	5820
	aaaccattaa	atcattcaaa	ataataaact	atctttatta	gagaatgtat	acttttagaa	5880
5	agctgtctcc	ttatttaaat	aaaatagtgt	ttgtctgtag	ttcagtgttg	gggcaatctt	5940
	gggggggatt	cttctccta	ctttcagaaa	ctttgtctgc	gaacactctt	taatggacca	6000
	gatcaggatt	tgagcggag	aacgaatgta	actttaaggc	aggaaagaca	aatcttattc	6060
	ttcataaagt	gatgagcata	taataattcc	aggcacatgg	caatagaggc	cctctaaata	6120
	aggaataaat	aacctcttag	acaggtggga	gattatgatc	agagtaaaag	gtaattacac	6180
10	atctttattc	cagaaagtca	ggggtctata	aattgacagt	gattagagta	atactttttc	6240
	acatttccaa	agttttgatg	ttacttttaa	atgcttaca	tcttagagtg	gtaggcaatg	6300
	ttttacacta	ttgaccttat	atagggaaag	gaggggggtc	ctgtggggtt	ttaaagaatt	6360
	ttcctttgca	gaggcatttc	atccttcatg	aagccattca	ggattttgaa	ttgcatatga	6420
	gtgcttggct	cttctctctg	ttctagttag	tgtatgagac	cttgcaagtga	gtttatcagc	6480
15	atactcaaaa	tttttttctt	ggaatcttga	gggatgggag	gaggggggtg	ggcttacttg	6540
	ttgtagcttt	tttttttttt	acagacttca	cagagaatgc	agttgtcttg	acttcaggctc	6600
	tgtctgttct	gttggcaagt	aatgacagta	ctgttctgat	cccgtctgta	ttagaatgca	6660
	ttgtgaaacg	actggagtat	gattaaaagt	tgtgttcccc	aatgcttggg	gtagtgattg	6720
20	ttgaaggaaa	aaatccagct	gagtataaaa	ggctgagtgt	tgaggaaatt	tctgcagttt	6780
	taagcagctg	tattttgtgat	tgaagctgag	tacattttgc	tggtgtattt	ttaggtaaaa	6840
	tgctttttgt	tcatttctgg	tggtgggagg	ggactgaagc	ctttagtctt	ttccagatgc	6900
	aaccttaaaa	tcagtgacaa	gaaacattcc	aaacaagcaa	cagtcttcaa	gaaattaaac	6960
	tggcaagtgg	aaatgtttaa	acagttcagt	gatctttagt	gcattgttta	tgtgtggggtt	7020
25	tctctctccc	ctcccttggg	cttaattctt	acatgcagga	acactcagca	gacacacgta	7080
	tgcgaagggc	cagagaagcc	agaccagta	agaaaaata	gcctatttac	tttaaatata	7140
	ccaaacattc	catttttaaat	gtggggattg	ggaaccacta	gttctttcag	atgggtattct	7200
	tcagactata	gaaggagctt	ccagttgaat	tcaccagtgg	acaaaatgag	gaaaacaggt	7260
	gaacaagctt	tttctgtatt	tacatacaaa	gtcagatcag	ttatgggaca	atagtattga	7320
30	atagatttca	gctttatgct	ggagtaactg	gcatgtgagc	aaactgtggt	ggcgtggggg	7380
	tggaggggtg	aggtgggctg	taagcctttt	tttaagattt	ttcaggtacc	cctcactaaa	7440
	ggcaccgaag	gcttaaagta	ggacaaccat	ggagccttcc	tgtggcagga	gagacaacaa	7500
	agcgcattta	tcctaaggct	aagagaagtg	tcagcctcac	ctgattttta	ttagtaaatga	7560
35	ggacttgcct	caactccctc	tttctggagt	gaagcatccg	aaggaatgct	tgaagtacc	7620
	ctgggcttct	cttaacattt	aagcaagctg	tttttatagc	agctcttaat	aataaaagccc	7680
	aaatctcaag	cggtgcttga	aggggagggg	aagggggaaa	gcgggcaacc	acttttccct	7740
	agcttttcca	gaagcctggt	aaaagcaagg	tctccccaca	agcaacttct	ctgccacatc	7800
	gccacccctg	gccttttgat	ctagcacaga	cccttcaccc	ctcacctcga	tgcagccagt	7860
40	agcttggatc	cttgtgggca	tgatccataa	tcggtttcaa	ggtaacgatg	gtgtcgaggt	7920
	ctttgggtgg	ttgaactatg	ttagaaaagg	ccattaattt	gcctgcaaat	tgttaacaga	7980
	aggggtattaa	aaccacagct	aagttagctc	attataatac	ttatccagtg	actaaaacca	8040
	acttaaacca	gtaagtggag	aaataacatg	ttcaagaact	gtaatgctgg	gtgggaacat	8100
	gtaacttgta	gactggagaa	gataggcatt	tgagtggctg	agagggcttt	tgggtgggaa	8160
45	tgcaaaaatt	ctctgctaag	actttttcag	gtgaacataa	cagacttggc	caagctagca	8220
	tcttagcggg	agctgatctc	caatgctctt	cagtagggct	atgaagggtt	ttcttttctt	8280
	gagaaaacaa	cacgtattgt	tttctcaggt	tttgcctttt	ggcctttttc	tagcttaaaa	8340
	aaaaaaaaag	caaaagatgc	tggtggttgg	cactcctggt	ttccaggacg	gggttcaaat	8400
	ccctgcccgc	tctttgcttt	gactactaat	ctgtcttcag	gactctttct	gtatttctcc	8460
50	ttttctctgc	aggtgctagt	tcttggagtt	ttggggaggt	gggaggtaac	agcacaatat	8520
	ctttgaacta	tatacatcct	tgatgtataa	tttgtcagga	gcttgacttg	attgtatatt	8580
	catatttaca	cgagaacctc	atataactgc	cttgtctttt	tcaggtataa	gcctgcagct	8640
	ggtgttttga	gaagccctac	tgctgaaaac	ttaacaattt	tgtgtaataa	aaatggagaa	8700
55	gctctaaa						8708

<210> 2
 <211> 8110
 <212> ADN
 <213> Homo sapien

 <400> 2

ES 2 673 960 T3

gatcagagtg ggccactgcc agccaacggc ccccggggct caggcgggga gcagctctgt 60
ggtgtgggat tgaggcgttt tccaagagtg ggttttcacg tttctaagat ttccaagca 120
gacagcccgt gctgctccga tttctcgaac aaaaagcaa aacgtgtggc tgtcttggga 180
5 gcaagtcgca ggactgcaag cagttggggg agaaagtccg ccattttgcc acttctcaac 240
cgtccctgca aggctggggc tcagttgcgt aatggaaagt aaagccctga actatcacac 300

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

	tttaatcttc	cttcaaaagg	tggtaaacta	tacctactgt	ccctcaagag	aacacaagaa	360
	gtgctttaag	aggcggcgga	agggtgatcga	attccgggtga	tgcgagttgt	tctccgtcta	420
	taaatacggc	tcgccccgagc	tggtgcggtag	gcattgagggc	agccagcgca	ggggcttctg	480
	ctgagggggc	aggcgggagct	tgaggaaacc	gcagataagt	ttttttctct	ttgaaagata	540
5	gagattaata	caactactta	aaaaatatag	tcaataggtt	actaagatat	tgcttagcgt	600
	taagttttta	acgtaatfff	aatagcttaa	gattttaaga	gaaaatatga	agacttagaa	660
	gagtagcatg	aggaaggaaa	agataaaagg	tttctaaaac	atgacggagg	ttgagatgaa	720
	gcttcttcat	ggagtaaaaa	atgtatftaa	aagaaaattg	agagaaaagga	ctacagagcc	780
	ccgaattaat	accaatagaa	gggcaatgct	tttagattaa	aatgaagggtg	acttaaacag	840
10	cttaaagttt	agtttaaaaag	ttgtaggtga	ttaaaataat	ttgaaggcga	tcttttaaaa	900
	agagattaaa	ccgaagggtga	ttaaaagacc	ttgaaatcca	tgacgcaggg	agaattgctg	960
	catttaaagc	ctagftaacg	catttactaa	acgcagacga	aatgggaaag	attaattggg	1020
	agtggtagga	tgaacaatt	tggagaagat	agaagtttga	agtggaaaac	tggaaagacag	1080
	aagtacggga	aggcgaagaa	agaatagag	aagatagggg	aattagaaga	taaaaacata	1140
15	cttttagaag	aaaaagata	aatttaaac	tgaaaagttag	gaagcagaag	agaaaagaca	1200
	agctaaggaaa	caaaaagcta	aggcaaaat	gtacaaactt	agaagaaaat	tggaagatag	1260
	aaacaagata	gaaaatgaaa	atattgtcaa	gagtttcaga	tagaaaatga	aaaacaagct	1320
	aagacaagta	ttggagaagt	atagaagata	gaaaaatata	aagccaaaaa	ttggataaaa	1380
	tagcactgaa	aaaatgagga	aattattggt	aaccaattta	ttttaaaagc	ccatcaattt	1440
20	aatttctggt	ggtgcagaag	ttagaaggtg	aagcttgaga	agatgagggt	gtttacgtag	1500
	accagaacca	atftagaaga	atacttgaag	ctagaagggg	aagttggtta	aaaatcacat	1560
	caaaaagcta	ctaaaaggac	tggtgtaatt	taaaaaaaac	taaggcagaa	ggcttttggg	1620
	agagttagaa	gaatttggaa	ggcfttaaat	atagtagctt	agtttgaaaa	atgtgaagga	1680
	cttctgtaac	ggaagtaatt	caagatcaag	agtaattacc	aacttaattg	ttttgcttgg	1740
25	gactttgagt	taagattatt	ttttaaacc	tgaggactag	cattaattga	cagctgaccc	1800
	agggtgctaca	cagaagtgga	ttcagtgat	ctaggaagac	agcagcagac	aggattccag	1860
	gaaccagtgt	ttgatgaagc	taggactgag	gagcaagcga	gcaagcagca	gttctgtggtg	1920
	aagataggaa	aagagtccag	gagccagtgc	gatttgggtg	aggaagctag	gaagaaggaa	1980
	ggagcgttaa	cgatttgggtg	gtgaagctag	gaaaaaggat	tccaggaagg	agcaggtgca	2040
30	atftgggtgat	gaaggttagca	ggcggcttgg	cttggcaacc	acacggagga	ggcagcagca	2100
	cgftgtgctg	agaggatcct	agaccagcat	gccagtgtgc	caaggccaca	gggaaagcga	2160
	gtggttggta	aaaatccgtg	aggtcggcaa	tatgftgftt	ttctggaact	tacttatggt	2220
	aaccttttat	ttatfttcta	atataatggg	ggagtttctg	actgaggtgt	aaagggattt	2280
35	atatggggac	gtaggccgat	ttccgggtgt	tgtaggtttc	tctttttcag	gcttatactc	2340
	atgaatcttg	tctgaagctt	ttgagggcag	actgccaaagt	cctggagaaa	tagtagatgg	2400
	caagtttggtg	ggfttttttt	ttttacacga	atftgaggaa	aaccaaata	atftgatagc	2460
	caaattgaga	caatttcagc	aaatctgtaa	gcagtttgta	tgfttagttg	gggtaatgaa	2520
	gtatftcagt	tttgtgaata	gatgacctgt	ttttacttcc	tcaccctgaa	ttcgttttgg	2580
40	aaattgtagag	tttggatgtg	taactgaggg	gggggggag	tttcagat	tttctgtg	2640
	gggtggggg	caaaaatagt	tttcagttct	ttttccctta	ggtctgtcta	gaatcctaaa	2700
	ggcaaatgac	tcaaggtgta	acagaaaaca	agaaaatcca	atatcaggat	aatcagacca	2760
	ccacaggttt	acagtttata	gaaactagag	cagttctcac	gftgaggtct	gtggaagaga	2820
	tgtccattgg	agaaatggct	ggtagttact	ctfttttccc	cccacccct	taatcagact	2880
45	ttaaaagtgc	ttaacccctt	aaactgtta	ttftttactt	gaagcatttt	gggatggtct	2940
	taacagggaa	gagagaggg	gggggagaaa	atgtfttttt	ctaagatttt	ccacagatgc	3000
	tatagtaacta	ttgacaaact	gggttagaga	aggagtgtac	cgctgtgctg	ttggcacgaa	3060
	caccttcagc	gactggagct	gctfttatcc	ttggaaagag	attcccagtt	gaagctgaaa	3120
	agtacagcac	agtgacagctt	tggttcatat	tcagtcactct	caggagaact	tcagaagagc	3180
50	ttgagtaggc	caaatgttga	agftaagttt	tccaataatg	tgacttctta	aaagttttat	3240
	taaaggggag	gggcaaatat	tggcaattag	ttggcagttg	cgtgttacgg	tgggattggt	3300
	gggtgggtt	taggtaattg	tttagtttat	gattgcagat	aaactcatgc	cagagaactt	3360
	aaagtcttag	aatggaaaaa	gtaaagaaat	atcaacttcc	aagttggcaa	gtaactccca	3420
	atgatttagt	ttftttcccc	ccagtttgaa	ttgggaagct	gggggaagtt	aaatatgagc	3480
55	actgggtgtg	accagtgcat	taatttgggc	aaggaaaagt	tcataatttg	atactgtatc	3540
	tgttttctt	caagtatag	agctfttggg	gaagaaagag	attgaactgg	gggtggtct	3600
	ggcctactgg	gctgacatta	actacaatta	tgggaaatgc	aaaagttgft	tggatattggt	3660
	agtggtggt	tctctftttg	aattfttttc	agggtattta	ataataattt	aaaactacta	3720
	tagaaactgc	agagcaaaag	aagtggctta	atgatcctga	agggatttct	tctgatggta	3780
60	gctfttgtat	tatcaaaactt	ttttcagata	acatcttctg	agtcataacc	agcctggcag	3840
	tatgatggcc	tagatgcaga	gaaaacagct	ccttgggtgaa	ttgataagta	aaggcagaaa	3900
	agattatatg	tcatacctcc	attggggaat	aagcataacc	ctgagattct	tactactgat	3960
	gagaacatta	tctgcatatg	ccaaaaaatt	ttaagcaaat	gaaagctacc	aatftaaagt	4020
65	tacggaactc	accattfttaa	agftaattgc	ttgtcaagct	ataaccacaa	aaataatgaa	4080

	ttgatgagaa	atacaatgaa	gaggcaatgt	ccatctcaaa	atactgcttt	tacaaaagca	4140
	gaataaaaagc	gaaaagaat	gaaaatgta	cactacatta	atcctggaat	aaaagaagcc	4200
	gaaataaatg	agagatgagt	tgggatcaag	tggattgagg	aggctgtgct	gtgtgccaat	4260
5	gttctgtttg	cctcagacag	gtatctcttc	gttatcagaa	gagttgcttc	atctcatctg	4320
	ggagcagaaa	acagcaggca	gctgttaaca	gataagttta	acttgcacat	gcagtattgc	4380
	atgttaggga	taagtgctta	tttttaagag	ctgtggagtt	cttaaataatc	aacctaggca	4440
	ctttctcctg	acccttccc	taggggattt	caggattgag	aaatttttcc	atcgagcctt	4500
	tttaaaattg	taggacttgt	tcctgtgggc	ttcagtgatg	ggatagtaca	cttcactcag	4560
	aggcatttgc	atctttaaat	aatttcttaa	aagcctctaa	agtgatcagt	gccttgatgc	4620
10	caactaagga	aatttgttta	gcattgaatc	tctgaaggct	ctatgaaagg	aatagcatga	4680
	tgtgctgtta	gaatcagatg	ttactgctaa	aatttacatg	ttgtgatgta	aattgtgtag	4740
	aaaaccatta	aatcattcaa	aataataaac	tatttttatt	agagaatgta	tactttttaga	4800
	aagctgtctc	cttattttaa	taaaatagtg	tttgtctgta	gttcagtgtt	ggggcaatct	4860
	tgggggggat	tcttctctaa	tctttcagaa	actttgtctg	cgaacactct	ttaatggacc	4920
15	agatcaggat	ttgagcggaa	gaacgaatgt	aactttaagg	caggaaagac	aaatttttatt	4980
	cttcataaag	tgatgagcat	ataataattc	caggcacatg	gcaatagagg	ccctctaata	5040
	aaggaataaa	taacctctta	gacaggtggg	agattatgat	cagagtaaaa	ggtaattaca	5100
	catttttattt	ccagaaagtc	aggggtctat	aaattgacag	tgattagagt	aatacttttt	5160
	cacatttcca	aagtttgcac	gttaacttta	aatgcttaca	atcttagagt	ggtaggcaat	5220
20	gttttacact	attgacctta	tatagggaa	ggaggggggtg	cctgtgggggt	tttaagaat	5280
	ttcctttg	agaggcattt	catcctcat	gaagccattc	aggattttga	attgcatatg	5340
	agtgcttggc	tcttccttct	gttctagtga	gtgatgaga	ccttgcagtg	agtttatact	5400
	catactcaaa	atTTTTTTTCC	tggatttgg	agggatggga	ggaggggggtg	gggcttactt	5460
25	gtttagctt	TTTTTTTTT	tacagacttc	acagagaatg	cagttgtctt	gacttcagggt	5520
	ctgtctgttc	tgttggaag	taaatgcagt	actgttctga	tcccgtgct	attagaatgc	5580
	attgtgaaac	gactggagta	tgattaaaag	ttgtgttccc	caatgcttgg	agtagtgatt	5640
	gttgaaggaa	aaaatccagc	tgagtataaa	aggctgagtg	ttgaggaaat	ttctgcagtt	5700
	ttaaagcagtc	gtatttgtga	ttgaagctga	gtacattttg	ctggtgtatt	tttaggtaaa	5760
30	atgctttttg	ttcatttctg	gtggtgggag	gggactgaag	cctttagtct	tttccagatg	5820
	caaccttaaa	atcagtgaca	agaaacattc	caaacaagca	acagctctca	agaaattaaa	5880
	ctggcaagtg	gaaatgttta	aacagttcag	tgacttttag	tgcatgttgg	atgtgtgggt	5940
	ttctctctcc	cctcccttgg	tcttaattct	tacatgcagg	aacactcagc	agacacacgt	6000
	atgcgaagg	ccagagaagc	cagaccaggt	aagaaaaaat	agcctattta	ctttaaataa	6060
35	accaaacatt	ccatttttaa	tgtggggatt	gggaaccact	agttctttca	gatgggtattc	6120
	ttcagactat	agaaggagct	tccagttgaa	ttcaccagtg	gacaaaatga	ggaaaacagg	6180
	tgaacaagct	ttttctgtat	ttacatacaa	agtcagatca	gttatgggac	aatagtattg	6240
	aatagatttc	agctttatgc	tggagtaact	ggcatgtgag	caaactgtgt	tggcgtgggg	6300
	gtggaggggtg	gaggtgggcg	ctaagccttt	ttttaagatt	tttcaggtac	ccctcactaa	6360
40	aggcacccgaa	ggcttaaagt	agacaacca	tggagccttc	ctgtggcagg	agagacaaca	6420
	aagcgtctatt	atcctaaggt	caagagaagt	gtcagcctca	cctgattttt	attagtaatg	6480
	aggacttgcc	tcaactccct	ctttctggag	tgaagcatcc	gaaggaatgc	ttgaagtacc	6540
	cctgggcttc	tcttaacatt	taagcaagct	gtttttatag	cagctcttaa	taataaagcc	6600
	caaatctcaa	gcggtgcttg	aaggggagg	aaagggggaa	agcgggcaac	cacttttccc	6660
45	tagcttttcc	agaagcctgt	taaaagcaag	gtctccccac	aagcaacttc	tctgccacat	6720
	cgccaccccg	tgccttttga	tctagcacag	acccttcacc	cctcacctcg	atgcagccag	6780
	tagcttggat	ccttgtgggc	atgatccata	atcggtttca	aggtaacgat	ggtgtcgagg	6840
	tctttggtgg	gttgaactat	gttagaaaag	gccattaatt	tgccctgcaa	ttgttaacag	6900
	aagggattta	aaaccacagc	taagttagctc	tattataata	cttatccagt	gactaaaacc	6960
50	aacttaaac	agtaagtgga	gaaataacat	gttcaagaac	tgtaatgctg	ggtgggaaca	7020
	tgtaacttgt	agactggaga	agataggcat	ttgagtggct	gagagggctt	ttgggtggga	7080
	atgcaaaaat	tctctgctaa	gactttttca	ggtgaacata	acagacttgg	ccaagctagc	7140
	atcttagcgg	aagctgatct	ccaatgctct	tcagtaggggt	catgaagggt	tttcttttcc	7200
	tgagaaaaca	acacgtattg	ttttctcagg	ttttgctttt	tggccttttt	ctagcttaaa	7260
55	aaaaaaaaaa	gcaaaagatg	ctggtgggtg	gcactcctgg	tttccaggac	ggggttcaaa	7320
	tccctgcggt	gtctttgctt	tgactactaa	tctgtcttca	ggactctttc	tgtatttctc	7380
	cttttctctg	caggtgctag	ttcttggagt	tttggggagg	tgggaggtaa	cagcacaata	7440
	tctttgaaact	atatacatcc	ttgatgtata	atthgtcagg	agcttgactt	gattgtatat	7500
	tcatatttac	acgagaacct	aatataactg	ccttgtcttt	ttcaggtaat	agcctgcagc	7560
60	tgggtttttg	agaagcccta	ctgctgaaaa	cttaacaatt	ttgtgtaata	aaaatggaga	7620
	agctctaaat	tgttgtggtt	cttttggaa	aaaaaatct	tgattgggaa	aaaagatggg	7680
	tgttctgtgg	gcttgttctg	ttaaatctgt	ggtctataaa	cacagcacc	ataattacag	7740
	cataacttctc	aagtagggta	cggactttgg	gggattgggtg	cgagggtagt	gggtgagtg	7800
65	cctactaaaa	agcccagtaa	ccccacagg	aaaataggga	acttcttttt	aagtacgctc	7860

ES 2 673 960 T3

	ctttccacta	tttagtaatt	ggctgtgagc	tgggctgggg	gagaaatggg	gcggggtgtg	7920
	tgtgtcattg	gaaagctctc	ttttttgttt	ttttgagaca	gtctcacttt	gtcccccagg	7980
	ctggagtgta	gtggcatgat	ctctgcaaac	tgcaacctcc	acttgtgggg	tccaagtggg	8040
5	tgtcctgctt	caccctccct	gtagctggga	ctacaggtgc	acaccaccac	gcctgggctaa	8100
	tttttgtatt						8110
	<210> 3						
	<211> 836						
	<212> ADN						
10	<213> Homo sapien						
	<220>						
	<221> característica miscelánea						
	<222> 271, 291, 319						
15	<223> n = A,T,C o G						
	<400> 3						
20	gggaggactg	gggccccgca	actggcctct	cctgccctct	taagcgcagc	gccatthttag	60
	caacgcagaa	gccccgccc	gggaagcctc	agctcgcctg	aaggtggtaa	actataccta	120
	ctgtccctca	agagaacaca	agaagtgctt	taagaggcgg	cggaagggtga	tcgaattccg	180
	gtgatgcgag	ttgttctccg	tctataaata	cgctcgcgcc	gagctgtgcg	gtaggcattg	240
	aggcagccag	cgcaggggct	tctgctgagg	nggcaggcgg	agcttgagga	naccgcagat	300
25	aagtthtttt	ctctttgana	gatagagatt	aatacaacta	cttaaaaaat	atagtcata	360
	ggttactaag	atattgcttt	agcgtaaagt	tttaacgtaa	ttttaatagc	ttaggattct	420
	aagagaaaaat	atggagactt	agaagagtag	catgagggag	gaaaagataa	aagggttcta	480
	aaacatgacg	ggaggttgag	atgaagcttt	cttcatggag	taaaaaatgt	atctaaaaag	540
	aaatthgaga	gaaaggacta	ccgagcccc	gaaattaata	ccaataggaa	gggccaatgc	600
30	thtttagaat	taaaatgaaa	ggtggacctt	aaaacaactt	taaaagthta	gthttaaaag	660
	ttggaagggt	gattaaaaat	aatthggaag	ggcgatcttt	thtaaaaaga	ggattaaacc	720
	cgaaagggaa	ttaaaagaac	ccttgaatc	cttgaacca	gggaaaaaat	tgcgtccatt	780
	ttaaagccct	aagthaacgc	atthttctaa	aaccceaaca	aaaaagtgga	aaaatt	836
35	<210> 4						
	<211> 1082						
	<212> ADN						
	<213> Homo sapien						
40	<220>						
	<221> característica miscelánea						
	<222> 797, 1082						
	<223> n = A,T,C o G						
45	<400> 4						
50							
55							
60							
65							

ES 2 673 960 T3

```

5      gggcagcctg cagcccgaga cttctgtaaa ggactggggc cccgcaactg gcctctcctg 60
      ccctcttaag cgcagcgcca ttttagcaac gcagaagccc ggcgccggga agcctcagct 120
      cgcctgaagg cggcggaagg tgatogaatt ccggtgatgc gagttgttct cctctataa 180
      atacgcctcg cccgagctgt gcggtaggca ttgaggcagc cagcgcaggg gcttctgctg 240
      agggggcagg cggagcttga ggaaaccgca cataagtttt tttctctttg aaagatagag 300
      attaatacaa cctacttaaa aatataagc cactaggcta ctaacaaaat tggcttaacc 360
      gctaaggttt ttttaaccgaa atttttaata agccttaaga atttttaaga agaaaaatat 420
      ggaagaaact tgggaaacaa gtcaccctgt ggcggaaggg gaaaaacgga tttaataggg 480
10     ggttttcttt aaaaaacaat tgaaccggca cgggctgaga aaaaatatga aaaaaccttt 540
      cccttcccac ttggggaagc tcaacaacaa ccacgcgggg aacgttgttt aaacaaatag 600
      gaaaaaaaaa aatttgttgg cgacaaagag aaaacagggg ggaaccttag aaccggaag 660
      agccccgccc ccggcaggaa ttttctacct cccccccct agatatagaa aaaagggggg 720
      gccacaacaa ggggcatttc tttttaaga gaatctctaa tccaccttgg ggagaggggg 780
15     gtggacacct ctataanaaa aaccaggcgt gtttagaaaa gcgttttctt atgatttttt 840
      catacacaaa agatttgggt ataaaggag gtcgaccatc tacacacata aaaagaattt 900
      ttttctcaaa aaccgcgcag taaacctctt cttttttacc cccaggagca ggcatattt 960
      tatatacccc cgccgaggcg tgggggttat ttaaacacac cgagcctcat tctgttaata 1020
20     gatttcccca ctggagcgcc cccggtgggg ggagcactaa ctggtgtccg cgccttcttt 1080
      tn

```

```

      <210> 5
      <211> 13001
      <212> ADN
25     <213> Homo sapien

      <400> 5

```

30

35

40

45

50

55

60

65

	attactccct	cattaataca	atataaaaat	tatttacggt	gtattaggta	ttataagcaa	60
	actagagatg	athtaagga	tatgggagga	tatctgtagg	ttacataaag	aacttgagca	120
	tcttcagatt	ttagcatccg	aggagaggtt	ttagaaccaa	ggcccatg	ataccaaggg	180
5	atgactgtac	aacattctgg	cggtgggca	cagtggctca	agcctgtaat	cccagcactt	240
	tgggaggccg	aggcgggcg	atcacgaggt	caggagatcc	agaccatcct	ggttaacacg	300
	gtgaaaccct	gtctctgcta	aaactacaaa	aaattagtcg	ggcgtggtg	cgggcgctg	360
	tagtaccagc	tactcgggag	gctgaggcaa	gtgaattgct	tgaaccaggg	aggcggaggt	420
	tacggtgagc	cgagatcccg	ccactgcact	ccagcctcag	cgatagagtg	agacttcgtc	480
10	tcaaaaaaaaa	aaaaaaaaagaa	acattctgta	atctgtcaag	gtaatggaaa	ttaatgcagt	540
	gacactgaca	ataattttaa	gcatttttagg	gctcttaacg	ttcatctcac	tcgctctaga	600
	gtgaaggaga	gagcagagag	tacagagcag	gtcctaggtc	ctccccaga	tatagaaaa	660
	ccgcagttgg	agagactgac	agaagtgctg	gagaggaagg	gaggcagcag	gacgtggaaa	720
	atctgggatt	caagaacagc	ttctgctatt	aattagctgt	gtgtcatttc	aggcaaatca	780
15	caaaatctcc	aggcccccaa	atccccattt	gcgaaacgag	gtgacctgcc	tcagttttcc	840
	ttcatccagc	gataaaattc	tactaaaaaa	tttccaacc	cagagcaagc	atcaggactg	900
	tgcctgaagg	gatccggctg	catctcagta	atattccact	cttacaggct	taaaaataaa	960
	aaagaaaaga	aaagaaaaca	agaacagttt	caccagcgtc	aattgagaac	agctgcttca	1020
20	acaggccctg	ctttatgtgg	gcaggtgggg	acagggagtt	ggcccagaaa	acaggaccct	1080
	catttcctgg	agcccccagg	gcagctcccc	aacaccgtac	acaacctgca	tcatttacag	1140
	gagccaaagg	agtttttagaa	atcaacttca	tagagttgct	gtatcattgt	gttagttttg	1200
	ccatcctaac	ctatacagcg	tcactaatct	ctcccctcgg	agttgactgc	ctaaaaacaa	1260
	gccatggata	caggttccaa	agaccgggg	gtgagggagc	ggagagggtg	ggtgtcacca	1320
25	ccccgtccag	ctccaagctt	tgtgtgcctt	ggaactctcc	attttaggtc	attgcttcag	1380
	tttcttttct	aaaaaattag	gctgctgcaa	ggtcagcctg	agaccacttc	tgccccgaga	1440
	attctagact	agtaagacct	ggtgacatac	aaacgacgaa	gatattttac	aataatgcca	1500
	tggcccttga	tagctacacg	aggtttgtgt	tctgatttta	aattaatgga	tgacgtcgag	1560
	actatatgga	ggaaatgaca	aaggacagga	gagaggtggg	aaaggaagac	ctagactgaa	1620
30	aatggaagtt	gggcagcagc	tccacgaaag	aaagaccagc	ccccagtg	agtgcagcg	1680
	cagagtagcg	accgagaagt	tcccaggcca	gctgccacc	cgccccatg	ccattcccc	1740
	gaacaggcac	aggcgtagg	gcggggcgcg	cgtgcgcagt	cacgcgctgc	gccaaccgcc	1800
	acagctccgg	gaaggcggcc	aggaccggct	agagccgggt	agaaccagtg	gcgcccgcc	1860
35	acgagccagc	gcctcacaaa	gggagggcgg	ctcacggccc	tcgcgtatcc	ctgcgcggcg	1920
	ctcgcgagcc	gccccctccc	cggcgtttgt	ccctgacgca	gccccaccgg	ttgcgcagtc	1980
	cctccccgcc	cccgcctccc	cctccgcagc	ctgcagccc	agacttctgt	aaaggactgg	2040
	ggccccgcaa	ctggcctctc	ctgccctctt	aagcgcagcg	ccattttagc	aacgcagaag	2100
	cccggcgccg	ggaagcctca	gctcgcctga	aggcaggtcc	cctctgacgc	ctccgggagc	2160
40	ccaggtttcc	cagagtcctt	gggacgcagc	gacgagttgt	gctgctatct	tagctgtcct	2220
	tataggctgg	ccattccagg	tgggtggtatt	tagataaaac	cactcaaact	ctgcagtttg	2280
	gtcttgggg	ttggaggaaa	gcttttattt	ttcttcctgc	tccggttcag	aaggtctgaa	2340
	gctcatacct	aaccaggcat	aacacagaat	ctgcaaaaaca	aaaacccta	aaaaagcaga	2400
	cccagagcag	tgtaaacact	tctgggtgtg	tcctgactg	gctgccaag	gtctctgtgt	2460
45	cttcggagac	aaagccattc	gcttagttgg	tctactttaa	aaggccactt	gaactcgctt	2520
	tccatggcga	tttgccttgt	gagcactttc	aggagagcct	ggaagctgaa	aaacggtaga	2580
	aaaatttccg	tgcgggccgt	ggggggctgg	cggcaactgg	ggggccgcag	atcagagtgg	2640
	gccactggca	gccaacggcc	cccggggctc	aggcggggag	cagctctgtg	gtgtgggatt	2700
50	gaggcgtttt	ccaagagtgg	gttttcacgt	ttctaagatt	tccaagcag	acagcccgtg	2760
	ctgctccgat	ttctcgaaca	aaaaagcaaa	acgtgtggct	gtcttgggag	caagtgcag	2820
	gactgcaagc	agttggggga	gaaagtccgc	cattttgcca	cttctcaacc	gtccctgcaa	2880
	ggctggggct	cagttgctga	atggaaagta	aagccctgaa	ctatcacact	ttaatcttcc	2940
	ttcaaaaggt	ggtaaactat	acctactgtc	cctcaagaga	acacaagaag	tgctttaaga	3000
55	ggtattttaa	aagttccggg	ggttttgtga	ggtgtttgat	gacccttta	aaatagatt	3060
	tccatgtttc	ttttgtctaa	agtttgcagc	tcaaatcttt	ccacacgcta	gtaatttaag	3120
	tatttctgca	tgtgtagttt	gcattcaagt	tccataagct	gtaagaaaa	atctagaaaa	3180
	gtaaaactag	aacctatfff	taaccgaaga	actacttttt	gcctccctca	caaaggcggc	3240
	ggaaggtgat	cgaattccgg	tgatgcgagt	tgttctccgt	ctataaatac	gcctcgccc	3300
60	agctgtgctg	taggcattga	ggcagccagc	gcaggggctt	ctgctgaggg	ggcagggcga	3360
	gcttgaggaa	accgcagata	agtttttttc	tctttgaaag	atagagatta	atacaactac	3420

ttaaaaaata tagtcaatag gttactaaga tattgcttag cgttaagttt ttaacgtaat 3480
 ttaaatagct taagatttta agagaaaata tgaagactta gaagagtagc atgaggaagg 3540
 aaaagataaa aggttttctaa aacatgacgg aggttgagat gaagcttctt catggagtaa 3600
 5 aaaatgtatt taaaagaaaa ttgagagaaa ggactacaga gccccgaatt aataccaata 3660
 gaagggcaat gcttttagat taaaatgaag gtgacttaaa cagcttaaag tttagtttaa 3720
 aagttgtagg tgattaaaaat aatttgaagg cgatctttta aaaagagatt aaaccgaagg 3780
 tgattaaaag accttgaaat ccatgacgca gggagaattg cgtcatttaa agcctagtta 3840
 acgcatttac taaacgcaga cgaaaatgga aagattaatt gggagtggta ccaatttaga 3900
 10 atttgagaaa gatagaagtt tgaagtggaa aactggaaga cagaagtacg ggaaggcгаа 3960
 gaaaagaata gagaagatag ggaaattaga agataaaaac atacttttag aagaaaaaag 4020
 ataaatttaa acctgaaaag taggaagcag aagaaaaaag acaagctagg aaacaaaaag 4080
 ctaagggcaa aatgtacaaa cttagaagaa aattggaaga tagaaacaag atagaaaatg 4140
 aaaatattgt caagagtttc agatagaaaa tgaaaaacaa gctaagacaa gtattggaga 4200
 15 agtatagaag atagaaaaat ataaagccaa aaattggata aaatagcact gaaaaaatga 4260
 ggaattattt ggtaaccaat ttatttttaa agcccataca ttttaattct ggtggtgcag 4320
 aagttagaag tgcaagcttg agaagtgag ggtgtttacg ttgaccagaa ccaatttaga 4380
 agaatacttg aagctagaag gggagttgg ttaaaaatca catcaaaaag ctactaaaag 4440
 gactggtgta atttaaaaaa aactaaggca gaaggctttt ggaagagtta gaagaatttg 4500
 20 gaaggcctta aatatagttag cttagtttga aaaatgtgaa ggactttcgt aacggaagta 4560
 atcaagatc aagagtaatt accaacttaa tgtttttgca ttggactttg agttaagatt 4620
 attttttaa tcctgaggac tagcattaat tgacagctga cccaggtgct acacagaagt 4680
 ggattcagtg aatctaggaa gacagcagca gacaggattc caggaaccag tgtttgatga 4740
 agctaggact gaggagcaag cgaaagca gcaagctcgt gtgaagatag gaaaagagtc 4800
 25 caggagccag tgcgatttgg tgaaggaagc taggaagaag gaaggagcgc taacgatttg 4860
 gtggtgaagc taggaaaaag gattccagga aggagcaggt gcaatttggg gatgaaggta 4920
 gcaggcggct tggcttggca accacacgga ggaggcagc aggcgttgtg cgtagaggat 4980
 cctagaccag catgccagtg tgccaaggcc acagggaaag cgagtggttg gtaaaaatcc 5040
 gtgaggtcgg caatatgttg ttttctgga acttacttat ggtaaccttt tatttatttt 5100
 30 ctaatataat gggggagttt cgtactgagg tgtaaagggg tttatatggg gacgtaggcc 5160
 gatttccggg tgttgtaggt ttctcttttt caggcttata ctcatgaatc ttgtctgaag 5220
 cttttgaggy cagactgcca agtctggag aaatagtaga tggcaagttt tggggttttt 5280
 tttttttaca cgaatttgag gaaaaccaaa tgaatttgat agccaaattg agcaatttc 5340
 agcaaatctg taagcagttt gtatgtttag ttggggtaat gaagtatttc agttttgtga 5400
 35 atagatgacc tgtttttact tcctcaccct gaattcgttt tgtaaatgta gaggttggat 5460
 gtgtaactga ggcggggggg agttttcagt attttttttt gtgggggtgg gggcaaaata 5520
 tgttttcagt tctttttccc ttaggtctgt ctagaatcct aaaggcaaat gactcaaggt 5580
 gtaacagaaa acaagaaaat ccaatatcag gataatcaga ccaccacagg tttacagttt 5640
 atagaaaact gagcagttct cacgttgagg tctgtggaag agatgtccat tggagaaatg 5700
 40 cctggtagtt actctttttt cccccacc cctttacag actttaaag tgctaaacc 5760
 ctaaaacttg ttatttttta cttgaagcat tttgggatgg tcttaacagg gaagagagag 5820
 ggtgggggag aaaatgtttt tttctaagat tttccacaga tgctatagta ctattgacaa 5880
 actgggttag agaaggagtg taccgctgtg ctggtggcac gaacacctc agggactgga 5940
 gctgctttta tccttggaag agtattccca gttgaagctg aaaagtacag cacagtgcag 6000
 45 ctttggttca tattcagtca tctcaggaga acttcagaag agcttgagta ggccaaatgt 6060
 tgaagttaag ttttccaata atgtgacttc ttaaaagttt tattaaaggg gaggggcaaa 6120
 tattggcaat tagttggcag tggcctgta atgccagaga acttaaagtc ttagaatgga 6180
 attgtttagt ttatgattgc agataaactc gcaagtaact cccaatgatt tagttttttt 6240
 50 aaaagttaag aatatcaac ttccaagttg gcaagtaact cccaatgatt tagttttttt 6300
 cccccagtt tgaattggga agctggggga agttaaatat gagccactgg gtgtaccagt 6360
 gcattaattt gggcaaggaa agtgtcataa tttgatactg tatctgtttt ccttcaaagt 6420
 atagagcttt tggggaagga aagtattgaa ctgggggttg gtctggccta ctgggctgac 6480
 attaactaca attatgggaa atgcaaaaag tgtttggata tggtagtgtg tggttctctt 6540
 ttggaatttt tttcaggtga tttaataata atttaaaact actatagaaa ctgcagagca 6600
 55 aaggaagtgg cttaatgatc ctgaagggat ttcttctgat ggtagctttt gattatcaa 6660
 gtaagattct attttcagtt gtgtgaagc aagttttttt ttagttagg agaaaactct 6720
 ttccattggt taactgcaaa acaagatggt aaggtatgct tcaaaaattt tgtaaattgt 6780
 ttatttttaa cttatctgtt tgtaaattgt aactgattaa gaattgtgat agttcagctt 6840
 gaatgtctct tagaggggtg gcttttgtt atgagggagg ggaaactttt tttttttcta 6900
 60 tagacttttt tcagataaca tcttctgagt cataaccagc ctggcagtat gatggcctag 6960
 atgcagagaa aacagctcct tgggtgaattg ataagtaag gcagaaaaga ttatatgtca 7020
 tacctccatt ggggaataag cataaccctg agattcttac tactgatgag aacattatct 7080
 gcatatgcca aaaaatttta agcaaatgaa agctaccaat ttaaagttac ggaatctacc 7140
 65 attttaaagt taattgcttg tcaagctata accacaaaaa taatgaattg atgagaaata 7200

	caatgaagag	gcaatgtcca	tctcaaaaata	ctgcttttac	aaaagcagaa	taaaagcgaa	7260
	aagaaatgaa	aatgttacac	tacattaatc	ctggaataaa	agaagccgaa	ataaatgaga	7320
	gatgagttgg	gatcaagtgg	attgaggagg	ctgtgctgtg	tgccaatggt	tcgtttgcc	7380
	cagacaggta	tctcttcggt	atcagaagag	ttgcttcatt	tcatctggga	gcagaaaaca	7440
5	gcaggcagct	gttaacagat	aagtttaact	tgcatctgca	gtattgcatg	ttagggataa	7500
	gtgcttattt	ttaagagctg	tggagttcct	aaatatcaac	catggcactt	tctcctgacc	7560
	ccttccctag	gggatttcag	gattgagaaa	ttttccatc	gagccttttt	aaaattgtag	7620
	gacttggtcc	tgtgggcttc	agtgatggga	tagtacactt	cactcagagg	catttgcatc	7680
	tttaaaataat	ttcttaaaaag	cctctaaagt	gatcagtgcc	ttgatgccaa	ctaaggaaat	7740
10	ttgttttagca	ttgaatctct	gaaggctcta	tgaaggaat	agcatgatgt	gctgttagaa	7800
	tcagatgtta	ctgctaaaat	ttacatgttg	tgatgtaaat	tgtgtagaaa	accattaat	7860
	cattcaaaat	aataaactat	ttttattaga	gaatgtatac	ttttagaaag	ctgtctcctt	7920
	atthaaataa	aatagtgttt	gtctgtagtt	cagtgttggg	gcaatcttgg	gggggattct	7980
	tctctaactc	ttcagaaaact	ttgtctgcca	acactcttta	atggaccaga	tcaggatttg	8040
15	agcggaagaa	cgaatgtaac	tttaaggcag	gaaagacaaa	ttttattcct	cataaagtga	8100
	tgagcatata	ataattccag	gcacatggca	atagaggccc	tctaataaag	gaataaataa	8160
	cctcttagac	aggtgggaga	ttatgatcag	agtaaaaggt	aattacacat	tttatttcca	8220
	gaaagtcagg	ggtctataaa	ttgacagtga	ttagagtaat	actttttcac	atthccaaag	8280
	tttgcatggt	aactttaaat	gcttacaatc	ttagagtggg	aggcaatggt	ttacactatt	8340
20	gaccttatat	agggaaagga	gggggtgcct	gtggggtttt	aaagaattht	cctttgcaga	8400
	ggcatttcat	ccttcatgaa	gccattcagg	atthtgaatt	gcatatgagt	gcttggctct	8460
	tccttctggt	ctagtgagtg	tatgagacct	tgcatgagt	ttatcagcat	actcaaaat	8520
	tttttctggt	aatthggagg	gatgggagga	gggggtgggg	cttacttgtt	gtagcttht	8580
	ttttttttac	agacttcaca	gagaatgcag	ttgtcttgac	ttcaggtctg	tctgttctgt	8640
25	tggaagtaa	atgcagtact	gttctgatcc	cgctgctatt	agaatgcatt	gtgaaacgac	8700
	tggaagtatga	ttaaaagttg	tgttcccaa	tgcttggagt	agtgattggt	gaaggaaaaa	8760
	atccagctga	gtgataaagg	ctgagtgttg	aggaaatthc	tgcatgtttt	agcagtcgta	8820
	tttgtgattg	aagctgagta	cattttgctg	gtgtattht	aggtaaaatg	cthtttgttc	8880
	atthctgggtg	gtgggagggg	actgaagcct	ttagtcttht	ccagatgcaa	ccttaaaatc	8940
30	agtgaacaaga	aacattccaa	acaagcaaca	gtcttcaaga	aattaaactg	gcaagtggaa	9000
	atgthtaaac	agthcagtga	tctthtagtgc	atthttagt	tgtgggtthc	tctctcccct	9060
	cccttggtct	taattcttac	atgcaggaac	actcagcaga	cacacgtatg	cgaagggcca	9120
	gagaagccag	accagtaag	aaaaaatagc	ctatthactt	taataaacc	aaacattcca	9180
35	ttthaaatgt	ggggattggg	aaccactagt	tctthcagat	ggtattcttc	agactataga	9240
	aggagctthc	agthgaattc	accagtggac	aaaatgagga	aaacaggtga	acaagcttht	9300
	tctgtattht	catacaaagt	cagatcagtt	atgggacaat	agtattgaat	agatthcagc	9360
	tttatgctgg	agtaactggc	atgtgagcaa	actgtgttgg	cgthgggggtg	gaggggtgag	9420
	gtgggctgta	agcctthttht	taagattht	caggtacccc	tcaactaaagg	caccgaaggc	9480
40	ttaaagttag	acaaccatgg	agccttccctg	tggcaggaga	gacaacaaag	cgctattatc	9540
	ctaaggtcaa	gagaagtgtc	agcctcacct	gthttthatt	agtaatgagg	acttgcctca	9600
	actccctctt	tctggagtga	agcatccgaa	ggaatgcttg	aagtaccct	gggcttctct	9660
	taacatthta	gcaagctggt	tttatagcag	ctcttaataa	taaagcccaa	atctcaagcg	9720
	gtgcttgaag	gggagggaaa	gggggaaagc	gggcaaccac	ttthccctag	cthttccaga	9780
45	agcctgttaa	aagcaaggtc	tccccacaag	caacttctct	gccacatcgc	caccctcgtc	9840
	cthttgatct	agcacagacc	cttcccccct	cacctcgatg	cagccagtag	cctggatcct	9900
	tgtgggcatg	atccataatc	ggtthcaagg	taacgatggt	gtcgaggtct	ttggtggggt	9960
	gaactatgth	agaaaaggcc	attaatthtc	ctgcaaatg	ttaacagaag	ggtatthaaa	10020
50	ccacagctaa	gtagctctat	tataataact	atccagtgac	taaaaccaac	ttaaaccagt	10080
	aagtggagaa	ataacatggt	caagaactgt	aatgctgggt	gggaacatgt	aacttgtaga	10140
	ctggagaaga	taggcatttg	agtggctgag	agggtcttht	ggtgggaatg	caaaaattct	10200
	ctgctaagac	ttthtcaggt	gaacataaca	gacttggcca	agctagcatc	ttagcggag	10260
	ctgatctcca	atgctcttca	gtagggcat	gaaggttht	cthttctctga	gaaaacaaca	10320
	cgtattgtht	tctcaggtth	tgtthtttg	cthtttctta	gcttaaaaaa	aaaaaaagca	10380
55	aaagatgctg	gtggttggca	ctcctggtht	ccaggacggg	gthcaaatcc	ctgctggctc	10440
	tttgccttga	ctactaatc	gtcttcagga	ctcttctgt	atthctcctt	ttctctcag	10500
	gtgctagthc	ttggagttht	ggggaggtgg	gaggtaacag	cacaatatct	ttgaactata	10560
	tacatccttg	atgtataatt	tgtcaggagc	ttgacttgat	tgtatattca	tatttacacg	10620
	agaacctaat	ataactgcct	tgtctthtthc	aggtaatagc	ctgcagctgg	tgtthttgaga	10680
60	agccctactg	ctgaaaactt	aacaattht	tgtaataaaa	atggagaagc	tctaattgt	10740
	tgtggttctt	ttgtgaataa	aaaaatcttg	atthgggaaa	aaagatgggt	gthctgtggg	10800
	cthgttctgt	taaatctgtg	gtctataaac	acagcaccca	taattacagc	ataatcttca	10860
	agtagggtac	ggactthtgg	ggattggtgc	gaggttagtg	ggtgagtgcc	ctactaaaaa	10920
	gcccagtaac	ccccacagga	aaatagggaa	cttctthttht	agtagcctcc	ttthcactat	10980

ES 2 673 960 T3

ctctcccctc cgcagcctgc agcccgagac ttctgtaaag gactggggcc ccgcaactgg 60
 cctctcctgc cctcttaagc gcagcgccat tttagcaacg cagaagcccg gcgcccggaa 120
 gcctcagctc gcctgaaggc aggtcccctc tgacgcctcc gggagcccag gtttcccaga 180
 5 gtccttgggga cgcagcgcagc agttgtgctg ctatccttagc tgtccttata ggctggccat 240
 tccaggtggg ggtatthaga taaaaccact caaactctgc agtttgggtct tggggtttgg 300
 aggaaagctt ttatthttct tcctgctccg gttcagaagg tctgaagctc atacctaacc 360
 aggcataaca cagaatctgc aaaacaaaaa cccctaaaaa agcagaccca gagcagtgtg 420
 aacacttctg ggtgtgtccc tgactggctg cccaaggtct ctgtgtcttc ggagacaaaag 480
 10 ccattcgctt agttgggtcta cthtaaaagg ccacttgaac tcgctthcca tggcgatttg 540
 ccttgtgagc actthtcagga gagcctggaa gctgaaaaac ggtagaaaaa thtccgtgcg 600
 ggccgtgggg ggctggcggc aactgggggg ccgcagatca gactgggcca ctggcagcca 660
 acggcccccg gggctcaggc ggggagcagc tctgtgggtg gggattgagg cgtthtccaa 720
 gactgggttt tcacgtthct aagattthcc aagcagacag cccgtgctgc tccgattthct 780
 15 cgaacaaaaa agcaaaacgt gtggctgtct tgggagcaag tcgcaggact gcaagcagtt 840
 gggggagaaa gtccgccatt ttgccacttc tcaaccgtcc ctgcaaggct ggggctcagt 900
 tgcgtaatgg aaagtaaacg cctgaactat cacactthaa tcttccttca aaagtggtgta 960
 aactatacct actgtccctc aagagaacac aagaagtgt ttaagaggcg gcggaaggtg 1020
 20 atcgaattcc ggtgatgcga gttgttctcc gtctataaat acgcctcgcc cgagctgtgc 1080
 ggtaggcatt gaggcagcca gcgcaggggc ttctgctgag ggggcaggcg gagcttgagg 1140
 aaaccgcaga taagthtttt tctctthgaa agatagagat taatacaact actthaaaaa 1200
 tatagtcaat aggttactaa gatattgctt agcgttaagt thtthaacgta atththaatag 1260
 cthaaagatt taagagaaaa tatgaagact tagaagagta gcatgaggaa gthaaaagata 1320
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

aaaggtttct aaaacatgac ggaggttgag atgaagcttc ttcattggagt aaaaaatgta 1380
 tttaaaagaa aattgagaga aaggactaca gagccccgaa ttaataccaa tagaagggca 1440
 atgcttttag attaaaatga aggtgactta aacagcttaa agtttagttt aaaagttgta 1500
 5 ggtgattaaa ataatttgaa ggcgatcttt taaaagaga ttaaaccgaa ggtgattaaa 1560
 agaccttgaa atccatgacg cagggagaat tgcgctcatt aaagcctagt taacgcattt 1620
 actaaacgca gacgaaaatg gaaagattaa ttgggagtgg taggatgaaa caatttggag 1680
 aagatagaag tttgaagtgg aaaactggaa gacagaagta cgggaaggcg aagaaaagaa 1740
 tagagaagat agggaaatta gaagataaaa acatactttt agaagaaaaa agataaattt 1800
 aaacctgaaa agtaggaagc agaagaaaaa agacaagcta ggaacaaaaa agctaagggc 1860
 10 aaaatgtaca aacttagaag aaaattggaa gatagaaaca agatagaaaa tgaaaatatt 1920
 gtcaagagtt tcagatagaa aatgaaaaac aagctaagac aagtattgga gaagtataga 1980
 agatagaaaa atataaagcc aaaaattgga taaaatagca ctgaaaaaat gaggaaatta 2040
 ttggtaaacca atttatttta aaagcccatt aatttaattt ctggtggtgc agaagttaga 2100
 aggtaaaagct tgagaagatg aggggtgtta cgtagaccag aaccaattta gaagaatact 2160
 15 tgaagctaga aggggaagtt ggtaaaaaa cacatcaaaa agctactaaa aggactggtg 2220
 taatttaaaa aaaactaagg cagaaggctt ttggaagagt tagaagaatt tggaggcct 2280
 taaatatagt agcttagttt gaaaaatgtg aaggactttc gtaacggaag taattcaaga 2340
 tcaagagtaa ttaccaactt aatgtttttg cattggactt tgagttaaga ttatttttta 2400
 aatcctgagg actagcatta attgacagct gaccaggtg ctacacagaa gtggattcag 2460
 20 tgaatctagg aagacagcag cagacaggat tccaggaacc agtgtttgat gaagctagga 2520
 ctgaggagca agcagcaag cagcagttcg tggatgaagat aggaaaagag tccaggagcc 2580
 agtgcgattt ggtgaaggaa gctaggaaga aggaaggagc gctaacgatt tgggtggtgaa 2640
 gctaggaaaa aggattccag gaaggagcga gtgcaatttg gtgatgaagg tagcaggcgg 2700
 25 cttggcttgg caaccacacg gaggagcga gcaggcgttg tgcgtagagg atcctagacc 2760
 agcatgccag tgtgccaaag ccacagggaa agcgagtggg ttgtaaaaaat ccgtgaggtc 2820
 ggcaatatgt tgtttttctg gaacttactt atggtaacct tttatttttatt ttctaataata 2880
 atgggggagt ttcgtactga ggtgtaaagg gatttatatg gggacgtagg ccgatttccg 2940
 ggtgtgttag gtttctcttt ttcaggctta tactcatgaa tcttgtctga agcttttgag 3000
 30 ggcagactgc caagtccctgg agaaatagta gatggcaagt ttgtggggtt ttttttttta 3060
 cacgaatttg aggaaaacca aatgaatttg atagccaaat tgagacaatt tcagcaaatc 3120
 tctaagcagt ttgtatgttt agttggggtg atgaagtatt tcagttttgt gaatagatga 3180
 cctgttttta ttttctcacc ctgaattcgt tttgtaaatg tagagtttgg atgtgtaact 3240
 gaggcggggg ggagttttca gtattttttt ttgtgggggt gggggcaaaa tatgttttca 3300
 35 gttctttttc ccttaggtct gtctagaatc ctaaaggcaa atgactcaag gtgtaacaga 3360
 aaacaagaaa atccaatatc aggataatca gaccaccaca ggtttacagt ttatagaaac 3420
 tagagcagtt ctcacgttga ggtctgtgga agagatgtcc attggagaaa tggctggtag 3480
 ttactctttt tccccccac ccccttaatc agactttaaa agtgcttaac cccttaaaact 3540
 tghtattttt tacttgaagc attttggggt ggtcttaaca ggggaagagag agggtggggg 3600
 40 agaaaatggt ttttctaaag ttttccaca gatgcataag tactattgac aactgggtt 3660
 agagaaggag tgtaccgctg tgctgttggc acgaacacct tcagggactg gagctgcttt 3720
 tatccttggga agagtattcc cagttgaagc tgaaaagtac agcacagtgc agctttgggt 3780
 catattcagt catctcagga gaacttcaga agagcttgag taggccaaat gttgaagtta 3840
 agttttccaa taatgtgact tcttaaaagt tttattaaag gggaggggca aatattggca 3900
 45 atagtgggc agtggcctgt tacggttggg attggtgggg tgggtttagg taattgttta 3960
 gtttatgatt gcagataaac tcatgccaga gaacttaaaag tcttagaatg gaaaaagtaa 4020
 agaaaatatca acttccaagt tggcaagtaa ctcccaatga ttttagtttt ttccccccag 4080
 tttgaattgg gaagctgggg gaagttaaat atgagccact ggggttacca gtgcattaat 4140
 50 ttggcaagg aaagtgtcat aatttgatac tgtatctggt ttccttcaaa gtatagagct 4200
 tttggggaag gaaagtattg aactgggggt tggctctggcc tactgggctg acattaacta 4260
 caattatggg aaatgcaaaa gttgtttgga tatggtagtg tgtggttctc ttttggatt 4320
 ttttcaggt gatttaataa taatttaaaa ctactataga aactgcagag caaaggaagt 4380
 ggcttaaatga tcctgaaggg atttcttctg atggtagctt ttgtattatc aagtaagatt 4440
 ctattttcag ttgtgtgtaa gcaagttttt ttttttagtgt agggaaaata cttttccatt 4500
 55 gtttaactgc aaaacaagat gtttaaggtat gttcaaaaaa ttttgtaaat tgtttatttt 4560
 aaacttatct ttttgaatgt tgtaactgat taagaattgt gatagttcag cttgaagtgc 4620
 tcttagaggg tgggcttttt ttgatgaggg aggggaaact tttttttttt ctatagactt 4680
 ttttcagata acatcttctg agtcataacc agcctggcag tatgatggcc tagatgcaga 4740
 gaaaacagct ccttggtgaa ttgataagta aaggcagaaa agatttatag tcataacctc 4800
 60 atgggggaat aagcataacc ctgagattct tactactgat gagaacatta tctgcatatg 4860
 ccaaaaaatt ttaagcaaat gaaagctacc aatttaaaagt tacggaatct accattttta 4920
 agttaattgc ttgtcaagct ataaccacaa aaataatgaa ttgatgagaa atacaatgaa 4980
 gaggaatgt ccatctcaaa atactgcttt taaaaagca gaataaaagc gaaaagaaat 5040
 65 gaaaatgtta cactacatta atcctggaat aaaagaagcc gaaataaatg agagatgagt 5100

	tgggatcaag	tggattgagg	aggctgtgct	gtgtgccaat	gtttcgtttg	cctcagacag	5160
	gtatctcttc	gttatcagaa	gagttgcttc	atttcatctg	ggagcagaaa	acagcaggca	5220
	gctgttaaca	gataagttta	acttgcattc	gcagttatgc	atgtaggga	taagtgttta	5280
	tttttaagag	ctgtggagtt	cttaaatac	aaccatggca	ctttctcctg	accccttccc	5340
5	taggggattt	caggattgag	aaatTTTTCC	atcgagcctt	tttaaaattg	taggacttgt	5400
	tctgtggggc	ttcagtgatg	ggatagtaca	cttcaactcag	aggcatttgc	atctttaaat	5460
	aatttcttaa	aagcctctaa	agtgatcagt	gccttgatgc	caactaagga	aatTTgttta	5520
	gcattgaatc	tctgaaggct	ctatgaaag	aatagcatga	tgtgctgtta	gaatcagatg	5580
	ttactgctaa	aatTTacatg	ttgtgatgta	aattgtgtag	aaaaccatta	aatcattcaa	5640
10	aataataaac	tatttttatt	agagaatgta	tactttttaga	aagctgtctc	cttattttaa	5700
	taaaatagtg	tttTgtctgta	gttcagtgtt	ggggcaatct	tgggggggat	tcttctctaa	5760
	tctttcagaa	actttTgtctg	cgaacactct	ttaatggacc	agatcaggat	ttgagcggaa	5820
	gaacgaatgt	aactTTaagg	caggaaagac	aaatTTtatt	cttcataaag	tgatgagcat	5880
	ataataattc	caggcacatg	gcaatagagg	ccctctaaat	aaggaataaa	taacctctta	5940
15	gacagtgagg	agattatgat	caagataaa	ggtaattaca	cattttattt	ccagaaagtc	6000
	aggggtctat	aaattgacag	tgattagagt	aatactTTTT	cacatttcca	aagTTTgcat	6060
	gttaacttta	aatgcttaca	atcttagagt	ggtaggcaat	gttttact	attgacctta	6120
	tatagggag	ggagggggTg	cctgtggggT	tttaaagaat	tttcctttgc	agaggcattt	6180
	catccttcat	gaagccattc	aggattttga	attgcatatg	agtgcttggc	tcttctctct	6240
20	gttctagtga	gtgtatgaga	cctTgcagtg	agtttatcag	catactcaa	atttttttcc	6300
	tggaaatttg	agggatggga	ggagggggTg	gggcttactt	gttTtagctt	ttttttttt	6360
	tacagacttc	acagagaatg	cagttgtctt	gacttcaggt	ctgtctgttc	tgttggcaag	6420
	taaatgcagt	actgttctga	tcccgtctg	attagaatgc	attgtgaaac	gactggagta	6480
25	tgattaaaag	ttgtgttccc	caatgcttgg	agttagtgatt	gTTgaaaggaa	aaaatccagc	6540
	tgagtgataa	aggctgagtg	ttgaggaaat	ttctgcagtt	ttaaagcagtc	gtattTgtga	6600
	ttgaagctga	gtacattttg	ctgggtgatt	tttaggtaaa	atgctttttg	ttcattttctg	6660
	gtggtgggag	gggactgaag	cctttagTct	ttccagatg	caaccttaaa	atcagtgaca	6720
	agaacattc	caaacaagca	acagtcttca	agaaattaaa	ctggcaagtg	gaaatgttta	6780
30	aacagttcag	tgatcttttag	tgcatTgttt	atgtgtgggt	ttctctctcc	cctcccttgg	6840
	tcttaattct	tacatgcagg	aacactcagc	agacacacgt	atgccaaggg	ccagagagaag	6900
	cgagccagT	aagaaaaaat	agcctattta	ctttaaataa	accaaacatt	ccatttttaa	6960
	tgtggggatt	gggaaccact	agttctttca	gatggTattc	ttcagactat	agaaggagct	7020
	tccagttgaa	ttcaccagtg	gacaaaatga	ggaaaacagg	tgaacaagct	ttttctgtat	7080
35	ttacatacaa	agtcagatca	gttatgggac	aatagTattg	aatagatttc	agctttatgc	7140
	tggagtaact	ggcatgtgag	caaactgtgt	tggcgtgggg	gtggaggggt	gaggtgggcg	7200
	ctaagccttt	ttttaagatt	tttcaggtac	ccctcactaa	aggcaccgaa	ggcttaaagt	7260
	aggacaacca	tggagccttc	ctgtggcagg	agagacaaca	aagcgcTatt	atcctaaggt	7320
	caagagaagt	gtcagcctca	cctgattttt	attagTaatg	aggacttgcc	tcaactccct	7380
40	tttctggag	tgaagcatcc	aaggaatgc	ttgaagtacc	cctgggcttc	tcttaacct	7440
	taagcaagct	gtttttatag	cagctcttaa	taataaagcc	caaactctcaa	cggtgtcttg	7500
	aaggggaggg	aaagggggaa	agcgggcaac	cacttttccc	tagcttttcc	agaagcctgt	7560
	taaaagcaag	gtctccccac	aagcaacttc	tctgccacat	cgccaccccg	tgcttttTga	7620
	tctagcacag	acccttcacc	cctcacctcg	atgcagccag	tagcttggat	cctTgtgggc	7680
45	atgatccata	atcggtttca	aggtaacgat	ggTgtcgagg	tctttggTgg	gttgaactat	7740
	gttagaaaag	gccattaatt	tgcttgcaaa	ttgttaacag	aagggTatta	aaaccacagc	7800
	taagtagctc	tattataata	cttatccagt	gactaaaacc	aacttaaac	agtaagtTga	7860
	gaataacat	gttcaagaac	tgtaatgctg	ggTgggaaca	tgtaactTgt	agactggaga	7920
50	agataggcat	ttgagTggct	gagagggctt	ttgggtggga	atgcaaaaat	tctctgctaa	7980
	gactttttca	ggTgaacata	acagactTgg	ccaagctagc	atcttagcgg	aagctgatct	8040
	ccaatgctct	tcagtagggT	catgaaggTt	tttcttttcc	tgagaaaaca	acacgtattg	8100
	tttctcagg	ttttgctttt	tggcctttt	ctagcttaaa	aaaaaaaaaa	gcaaaagatg	8160
	ctggTggTtg	gcactcctgg	tttccaggac	ggggTtcaaa	tccctgcggc	gtctttgctt	8220
	tgactactaa	tctgtcttca	ggactctttc	tgtattttctc	cttttctctg	caggtgctag	8280
55	ttcttggagt	tttggggagg	tgggagTtaa	cagcacaata	tctttgaact	atatacatcc	8340
	ttgatgtata	atTTgtcagg	agcttgactt	gattgtatat	tcatatttac	acgagaacct	8400
	aatataactg	cctTgtcttt	ttcagTtaat	agcctgcagc	tggTgttttg	agaagcccta	8460
	ctgctgaaaa	cttaacaatt	ttgtgtaata	aaaatggaga	agctctaaat	tgtTgtggTt	8520
	cttttTgtgaa	taaaaaaatc	ttgattgggg	aaaaaagatg	ggTgttctgt	gggctTgttc	8580
60	TgtTaaatct	gtggTctata	aacacagcac	ccataattac	agcataatct	tcaagtaggg	8640
	tacggacttt	gggggattgg	tgcgagggta	gtgggtgagT	ggcctactaa	aaagccagT	8700
	aacccccaca	ggaaaatagg	gaacttcttt	ttaaTtagcc	tcttttccac	tatttagTaa	8760
	ttggctgtga	gctgggctgg	gggagaaatg	gggcggggTg	tgtgtgtcat	tggaaagctc	8820
65	tctttttTgt	ttttttgaga	cagTctcact	ttgtccccca	ggctggagTg	tagTggcagT	8880

ES 2 673 960 T3

atctctgcaa actgcaacct ccacttctgg ggtccaagtg gttgtcctgc ttcaccctcc 8940
ctgtagctgg gactacaggt gcacaccacc acgcctggct aatttt 8986

5 <210> 7
<211> 8708
<212> ADN
<213> Homo sapien

10 <400> 7

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 673 960 T3

5 gtaaaggact ggggccccgc aactggcctc tcctgccctc ttaagcgcag cgccatttta 60
 gcaacgcaga agccccggcg cgggaagcct cagctcgcct gaaggcaggt cccctctgac 120
 gcctccggga gccccaggtt cccagagtcc ttgggacgca gcgacgagtt gtgctgctat 180
 cttagctgtc cttataggct ggccattcca ggtggtggtt tttagataaa accactcaaa 240
 ctctgcagtt tggctctggg gtttgaggga aagcttttat ttttcttctt gctccggttc 300
 agaaggtctg aagctcatac ctaaccaggc ataacacaga atctgcaaaa caaaaacccc 360
 taaaaaagca gaccagagc agtgtaaaca cttctgggtg tgtccctgac tggctgcca 420
 aggtctctgt gtcttcggag acaaagccat tcgcttagtt ggtctacttt aaaaggccac 480
 10 ttgaactcgc tttccatggc gatttgccct gtgagcactt tcaggagagc ctggaagctg 540
 aaaaacggta gaaaaatttc cgtgcggggc gtggggggct ggcggaact ggggggccgc 600
 agatcagagt gggccactgg cagccaacgg cccccggggc tcaggcgggc agcagctctg 660
 tgggtgggga ttgaggcgtt ttccaagagt gggttttcac gtttctaaga tttccaagc 720
 agacagcccg tgctgctccg atttctcgaa caaaaaagca aaacgtgtgg ctgtcttggg 780
 15 agcaagtgcg aggactgcaa gcagttgggg gagaaagtcc gccattttgc cacttctcaa 840
 ccgtccctgc aaggctgggg ctcagttgcg taatggaaag taaagccctg aactatcaca 900
 ctttaactct ctttcaaaag gtggtaaact atacctactg tccctcaaga gaacacaaga 960
 agtgctttta gaggtatfff aaaagttccg ggggttttgt gaggtgtttg atgacccgtt 1020
 20 taaaatatga tttccatggt tcttttgtct aaagtttgca gctcaaatct ttccacacgc 1080
 tagtaattta agtatttctg catgtgtagt ttgcattcaa gttccataag ctgttaagaa 1140
 aatctagaa aagtaaaact agaacctatt ttaaccgaa gaactacttt ttgcctccct 1200
 cacaaaggcg gcggaagggt atcgaattcc ggtgatgcga gttgttctcc gtctataaat 1260
 acgcctcgcc cgagctgtgc ggtaggcatt gaggcagcca gcgcaggggc ttctgctgag 1320
 25 ggggcaggcg gagcttgagg aaaccgcaga taagtttttt tctctttgaa agatagagat 1380
 taatacaact acttaaaaaa tatagtcaat aggttactaa gatattgctt agcgttaagt 1440
 ttttaacgta attttaatat cttaagattt taagagaaaa tatgaagact tagaagagta 1500
 gcatgaggaa ggaaaagata aaaggtttct aaaacatgac ggaggttgag atgaagcttc 1560
 ttcatggagt aaaaaatgta tttaaaagaa aattgagaga aaggactaca gagccccgaa 1620
 30 ttaataccaa tagaagggca atgcttttag attaaaatga aggtgactta aacagcttaa 1680
 agtttagttt aaaagttgta ggtgattaaa ataatttgaa ggcgatcttt taaaaagaga 1740
 ttaaaccgaa ggtgattaaa agacctgaa atccatgacg cagggagaat tgcgtcattt 1800
 aaagcctagt taacgcattt actaaacgca gacgaaaatg gaaagattaa ttgggagtg 1860
 taggatgaaa caatttggag aagatagaag tttgaagtgg aaaactggaa gacagaagta 1920
 35 cggaaggcg aagaaaagaa tagagaagat agggaaatta gaagataaaa acatactttt 1980
 agaagaaaaa agataaattt aaacctgaaa agtaggaagc agaagaaaaa agacaagcta 2040
 ggaacaaaaa agctaagggc aaaatgtaca aacttagaag aaaattggaa gatagaaca 2100
 agatagaaaa tgaatatatt gtcaagagtt tcagatagaa aatgaaaaac aagctaaagc 2160
 40 aagtattgga gaagtataga agatagaaaa atataaagcc aaaaattgga taaaatagca 2220
 ctgaaaaaat gaggaaatta ttggtaacca atttatftta aaagcccatc aatttaattt 2280
 ctggtggtgc agaagttaga aggtaaagct tgagaagatg aggtgtttta cgtagaccag 2340
 aaccaattta gaagaatact tgaagctaga aggggaagtt ggttaaaaaat cacatcaaaa 2400
 agctactaaa aggactggtg taatttaaaa aaaactaagg cagaaggctt ttggaagagt 2460
 45 tagaagaatt tggaaggcct taatatagt agcttagttt gaaaaatgtg aaggactttc 2520
 gtaacggaag taattcaaga tcaagagtaa ttaccaactt aatgtttttg cattggactt 2580
 tgagttaaga ttatftttta aatcctgagg actagcatta attgacagct gaccaggtg 2640
 ctacacagaa gtggattcag tgaatctagg aagacagcag cagacaggat tccaggaacc 2700
 agtgtttgat gaagctagga ctgaggagca agcgagcaag cagcagttcg tggtaagat 2760
 50 aggaaaagag tccaggagcc agtgcgattt ggtgaaggaa gctaggaaga aggaaggagc 2820
 gctaacgatt tgggtggtgaa gctaggaaaa aggatccag gaaggagcga gtgcaatttg 2880
 gtgatgaagg tagcaggcgg cttggcttgg caaccacacg gaggagcga gcaggcgttg 2940
 tgcgtagagg atcctagacc agcatgccag tgtgccaaag ccacagggaa agcgagtgg 3000
 55 tggtaaaaaat ccgtgaggtc ggcaatatgt tgtttttctg gaacttactt atggtaacct 3060
 tttatfttatt ttctaataa atgggggagt ttcgtactga ggtgtaaagg gatttatatg 3120
 gggacgtagg ccgatttccg ggtgtttag gtttctcttt ttcaggctta tactcatgaa 3180
 tcttgtctga agcttttgag ggcagactgc caagtcctgg agaaatagta gatggcaagt 3240

60

65

	ttgtggggtt	ttttttttta	cacgaatttg	aggaaaacca	aatgaatttg	atagccaaat	3300
	tgagacaatt	tcagcaaatc	tgtaagcagt	ttgtatgttt	agttggggta	atgaagtatt	3360
	tcagttttgt	gaatagatga	cctgttttta	cttcctcacc	ctgaattcgt	tttgtaaatg	3420
	tagagtttgg	atgtgtaact	gaggcggggg	ggagttttca	gtattttttt	ttgtgggggt	3480
5	gggggcaaaa	tatgttttca	gttctttttc	ccttaggtct	gtctagaatc	ctaaaggcaa	3540
	atgactcaag	gtgtaacaga	aaacaagaaa	atccaatata	aggataatca	gaccaccaca	3600
	ggtttacagt	ttatagaaac	tagagcagtt	ctcacgttga	ggtctgtgga	agagatgtcc	3660
	attggagaaa	tggctggtag	ttactctttt	ttccccccac	ccccttaatc	agacttttaa	3720
	agtgcctaac	cccttaaac	tgttattttt	tacttgaagc	atthttgggat	ggtcttaaca	3780
10	gggaagagag	agggtggggg	agaaaatggt	tttttctaag	atthttccaca	gatgctatag	3840
	tactattgac	aaactggggt	agagaaggag	tgtaccgctg	tgctgttggc	acgaacacct	3900
	tcaggactg	gagctgcttt	tatccttggg	agagtattcc	cagttgaagc	tgaaaagtac	3960
	agcacagtgc	agctttgggt	catattcagt	catctcagga	gaacttcaga	agagcttgag	4020
	taggccaaat	gttgaagtta	agttttccaa	taatgtgact	tcttaaaagt	tttattaaag	4080
15	gggaggggca	aatattggca	attagttggc	agtggcctgt	tacggttggg	attggtgggg	4140
	tgggtttagg	taattgttta	gtttatgatt	gcagataaac	tcatgccaga	gaacttaag	4200
	tcttagaatg	gaaaaagtaa	agaaatatca	acttccaagt	tggcaagtaa	ctcccaatga	4260
	tttagttttt	ttccccccag	tttgaattgg	gaagctgggg	gaagttaa	atgagccact	4320
	gggtgtacca	gtgcattaat	ttgggcaagg	aaagtgtcat	aatttgatac	tgtatctgtt	4380
20	ttccttcaaa	gtatagagct	tttggggaag	gaaagtattg	aactgggggt	tggtctggcc	4440
	tactgggctg	acattaacta	caattatggg	aaatgcaaaa	gttgtttgga	tatggtagtg	4500
	tgtggttctc	tttttgaatt	tttttcaggt	gatttaataa	taatttaaaa	ctactataga	4560
	aactgcagag	caaaggaagt	ggcttaatga	tcctgaaggg	atthttctctg	attgtagctt	4620
25	ttgattatc	aagtaagatt	ctatthtcag	ttgtgtgtaa	gcaagttttt	tttttagtga	4680
	ggagaaatac	ttttccattg	tttaactgca	aaacaagatg	ttaaggtatg	cttcaaaaat	4740
	tttgtaaatt	gtttatthtt	aacttatctg	tttgtaaatt	gtaactgatt	aagaattgtg	4800
	atagttcagc	ttgaatgtct	cttagagggt	gggctthttg	tgatgaggga	ggggaaactt	4860
	tttttttttc	tatagacttt	tttcagataa	catcttctga	gtcataacca	gcctggcagt	4920
30	atgatggcct	agatgcagag	aaaacagctc	cttgggtgaat	tgataagtaa	aggcagaaaa	4980
	gattatattg	catacctcca	ttggggaata	agcataacct	tgagattcct	actactagtg	5040
	agaacattat	ctgcatatgc	caaaaaattt	taagcaaatg	aaagctacca	atthtaagtt	5100
	acggaatcta	ccatthttaa	gttaattgct	tgtcaagcta	taaccacaaa	aataatgaat	5160
	tgatgagaaa	tacaatgaag	aggcaatgct	catctcaaaa	tactgctttt	acaaaagcag	5220
35	aataaaaagc	aaaagaaatg	aaaatgttac	actacattaa	tcctggaata	aaagaagccg	5280
	aaataaatga	gagatgagtt	gggatcaagt	ggattgagga	ggctgtgctg	tgtgccaatg	5340
	tttcgtttgc	ctcagacag	tatctctctg	ttatcagaag	agttgcttca	tttcatctgg	5400
	gagcagaaaa	cagcaggcag	ctgttaacag	ataagtttaa	cttgcatctg	cagtattgca	5460
	tgttagggat	aagtgccttat	tttaagagc	tgtggagttc	ttaaataatca	acatgggacc	5520
40	tttctcctga	ccccttcctc	aggggatttc	aggattgaga	aatthttcca	tcgagccttt	5580
	ttaaaattgt	aggacttggt	cctgtgggct	ctcagtgtgg	gatagtacac	ttcactcaga	5640
	ggcatttgca	tctthtaata	atthctthaa	agcctctaaa	gtgatcagtg	ccttgatgcc	5700
	aactaaggaa	atthgttttag	cattgaaatc	ctgaaggctc	tatgaaagga	atagcatgat	5760
	gtgctgttag	aatcagatgt	tactgctaaa	atthcatatg	tgtgatgtaa	attgtgtaga	5820
45	aaaccattaa	atcattcaaa	ataataaact	atthtttatta	gagaatgtat	actthtagaa	5880
	agctgtctcc	ttatthtaaat	aaaatagtgt	ttgtctgtag	ttcagtgttg	gggcaatctt	5940
	gggggggatt	cttctctaat	ctthtcagaaa	ctthgtctgc	gaacactctt	taatggacca	6000
	gatcaggatt	tgagcgggaag	aacgaatgta	actthtaaggc	aggaaagaca	aatthttattc	6060
50	ttcataaaagt	gatgagcata	taataattcc	aggcacatgg	caatagaggc	cctctaaata	6120
	aggaataaat	aacctcttag	acaggtggga	gattatgatc	agagtaaaag	gtaattacac	6180
	atthttatthc	cagaaagtca	ggggtctata	aattgacagt	gattagagta	atactthtttc	6240
	acatthccaa	agthttgcatg	ttaactthaa	atgcttcaaa	tcttagagtg	gtaggcaatg	6300
	ttthacacta	ttgaccttat	ataggggaag	gaggggggtc	ctgtgggggt	ttaaagaatt	6360
55	ttcctthtgca	gaggcatttc	atccttcatg	aagccattca	ggatthttgaa	ttgcatatga	6420
	gtgcttggct	cttctctctg	ttctagttag	tgtatgagac	cttgacgtga	gtttatcagc	6480
	atctcaaaaa	ttthtttcct	ggaatttggg	gggaggggag	gaggggggtg	ggcttacttg	6540
	ttgtagcttt	ttthtttttt	acagacttca	cagagaatgc	agttgtcttg	acttcaggtc	6600
	tgtctgttct	gttggcaagt	aaatgcagta	ctgttctgat	cccgtctgta	ttagaatgca	6660
	ttgtgaaacg	actggagtat	gattaaaagt	tgtgttcccc	aatgcttggg	gtagtgattg	6720
60	ttgaaaggaaa	aaatccagct	gagtgataaa	ggctgagtgt	tgaggaaatt	tctgcagttt	6780
	taagcagtcg	tatthgtgat	tgaagctgag	tacatthttg	tggtgtatth	ttaggtaaaa	6840
	tgcctthttgt	tcatttctgg	tgggtggagg	ggactgaagc	ctthtagtctt	ttccagatgc	6900
	aaccttaaaa	tcagtgacaa	gaaacattcc	aaacaagcaa	cagtcttcaa	gaaattaaac	6960
65	tggcaagtgg	aaatgtthta	acagttcagt	gatctthtagt	gcattgtthta	tgtgtggggt	7020

ES 2 673 960 T3

	tctctctccc	ctcccttggg	cttaattctt	acatgcagga	acactcagca	gacacacgta	7080
	tgcgaagggc	cagagaagcc	agaccagta	agaaaaata	gcctatttac	tttaaataaa	7140
	ccaaacattc	catttttaaa	gtggggattg	ggaaccacta	gttctttcag	atgggtattct	7200
5	tcagactata	gaaggagctt	ccagttgaat	tcaccagtgg	acaaaatgag	gaaaacaggt	7260
	gaacaagctt	tttctgtatt	tacatacaaa	gtcagatcag	ttatgggaca	atagtattga	7320
	atagatttca	gctttatgct	ggagtaactg	gcatgtgagc	aaactgtggt	ggcgtggggg	7380
	tggaggggtg	aggtgggagc	taagcctttt	tttaagattt	ttcaggtacc	cctcactaaa	7440
	ggcaccgaag	gcttaaagta	ggacaacat	ggagccttcc	tgtggcagga	gagacaacaa	7500
10	agcgctatta	tcctaaggtc	aagagaagtg	tcagcctcac	ctgattttta	ttagtaatga	7560
	ggacttgcct	caactccctc	tttctggagt	gaagcatccg	aaggaatgct	tgaagtacct	7620
	ctgggcttct	cttaacattt	aagcaagctg	ttttatagc	agctcttaat	aataaagccc	7680
	aaatctcaag	cggtgcttga	aggggagggg	aagggggaaa	gcgggcaacc	acttttccct	7740
	agcttttcca	gaagcctggt	aaaagcaagg	tctccccaca	agcaacttct	ctgccacatc	7800
15	gccaccccg	gccttttgat	ctagcacaga	cccttcaccc	ctcacctcga	tgcagccagt	7860
	agcttggatc	cttgtgggca	tgatccataa	tcggtttcaa	ggtaacgatg	gtgtcgaggt	7920
	ctttgggtggg	ttgaactatg	ttagaaaagg	ccattaattt	gcctgcaaat	tgttaacaga	7980
	agggtattaa	aaccacagct	aagtagctct	attataatac	ttatccagtg	actaaaacca	8040
20	acttaacca	gtaagtggag	aaataacatg	ttcaagaact	gtaatgctgg	gtgggaacat	8100
	gtaacttgta	gactggagaa	gataggcatt	tgagtggctg	agagggcttt	tgggtgggaa	8160
	tgcaaaaatt	ctctgctaag	actttttcag	gtgaacataa	cagacttggc	caagctagca	8220
	tcttagcggg	agctgatctc	caatgctctt	cagtagggctc	atgaaggttt	ttcttttccct	8280
	gagaaaacaa	cacgtattgt	tttctcaggt	tttgcttttt	ggcctttttc	tagcttaaaa	8340
25	aaaaaaaaag	caaaagatgc	tggtgggttg	cactcctggg	ttccaggacg	gggttcaaat	8400
	ccctgcggcg	tctttgcttt	gactactaat	ctgtcttcag	gactctttct	gtatttctcc	8460
	ttttctctgc	aggtgctagt	tcttggagtt	ttggggaggt	gggaggtaac	agcacaatat	8520
	ctttgaacta	tatacatcct	tgatgtataa	tttgtcagga	gcttgacttg	attgtatatt	8580
	catatttaca	cgagaaccta	atataactgc	cttgtctttt	tcaggtaata	gcctgcagct	8640
30	ggtgttttga	gaagccctac	tgctgaaaac	ttaacaattt	tgtgtaataa	aaatggagaa	8700
	gctctaaa						8708

35 <210> 8
 <211> 8708
 <212> ADN
 <213> Homo sapien

40 <400> 8

45

50

55

60

65

ES 2 673 960 T3

	gtaaaggact	ggggccccgc	aactggcctc	tcctgccctc	ttaagcgag	cgccatttta	60
	gcaacgcaga	agccccggcg	cgggaagcct	cagctcgctc	gaaggcaggt	cccctctgac	120
	gcctccggga	gcccagggtt	cccagagtcc	ttgggacgca	gcgacgagtt	gtgctgctat	180
5	cttagctgtc	cttataggct	ggccattcca	ggtggtggta	tttagataaa	accactcaaa	240
	ctctgcagtt	tggtcttggg	gtttggagga	aagcttttat	ttttcttcct	gctccggttc	300
	agaaggtctg	aagctcatac	ctaaccaggc	ataacacaga	atctgcaaaa	caaaaacccc	360
	taaaaaagca	gaccagagc	agtgtaaaca	cttctgggtg	tgtccctgac	tggtgcca	420
	aggtctctgt	gtcttcggag	acaaagccat	tcgcttagtt	ggtctacttt	aaaaggccac	480
10	ttgaactcgc	tttccatggc	gatttgcctt	gtgagcactt	tcaggagagc	ctggaagctg	540
	aaaaacggta	gaaaaatttc	cgtgcggggc	gtggggggct	ggcggcaact	ggggggccgc	600
	agatcagagt	gggccactgg	cagccaacgg	ccccggggc	tcaggcgggg	agcagctctg	660
	tggtgtggga	ttgagggcgt	ttccaagagt	gggttttcac	gtttctaaga	tttcccaagc	720
	agacagcccg	tgctgctccg	atctctcgaa	caaaaaagca	aaacgtgtgg	ctgtcttggg	780
15	agcaagtctg	aggactgcaa	gcagttgggg	gagaaagtcc	gccattttgc	cacttctcaa	840
	ccgtccctgc	aaggctgggg	ctcagttgcg	taatggaaag	taaagccctg	aactatcaca	900
	ctttaatctt	ccttcaaaag	gtggtaaact	atacctactg	tccctcaaga	gaacacaaga	960
	agtgctttta	gaggtatfff	aaaagttccg	ggggttttgt	gaggtgtttg	atgacccgtt	1020
20	taaaatatga	tttccatggt	tcttttgtct	aaagtttgca	gctcaaactc	ttccacacgc	1080
	tagtaattta	agtatfffctg	catgtgtagt	ttgcattcaa	gttccataag	ctgttaagaa	1140
	aatctagaa	aagtaaaact	agaacctatt	tttaaccgaa	gaactacttt	ttgcctccct	1200
	cacaaaggcg	gcggaaggtg	atcgaattcc	ggtgatgcga	gttgttctcc	gtctataaat	1260
	acgcctcgcc	cgagctgtgc	ggtaggcatt	gaggcagcca	gcgcaggggc	ttctgctgag	1320
25	ggggcagggc	gagcttgagg	aaaccgcaga	taagtttttt	tctctttgaa	agatagagat	1380
	taatacaact	acttaaaaaa	tatagtcaat	aggttactaa	gatattgctt	agcgttaagt	1440
	ttttaacgta	atfttaaatag	cttaagattt	taagagaaaa	tatgaagact	tagaagagta	1500
	gcatgaggaa	ggaaaagata	aaaggtttct	aaaacatgac	ggaggttgag	atgaagcttc	1560
30	ttcatggagt	aaaaaatgta	tttaaaaagaa	aattgagaga	aaggactaca	gagccccgaa	1620

35
40
45
50
55
60
65

5 ttaataccaa tagaaggcca atgcttttag attaaaatga aggtgactta aacagcttaa 1680
 agtttagttt aaaagttgta ggtgattaaa ataatttgaa ggcgatcttt taaaaagaga 1740
 ttaaaccgaa ggtgattaaa agaccttgaa atccatgacg cagggagaat tgcgtcattt 1800
 aaagcctagt taacgcattt actaaacgca gacgaaaatg gaaagattaa ttgggagtgg 1860
 taggatgaaa caatttggag aagatagaag tttgaagtgg aaaactggaa gacagaagta 1920
 cgggaaggcg aagaaaagaa tagagaagat agggaaatta gaagataaaa acatactttt 1980
 agaagaaaa agataaattt aaacctgaaa agtaggaagc agaagaaaa agacaagcta 2040
 ggaacaaaa agctaaggcc aaaatgtaca aacttagaag aaaattggaa gatagaaaca 2100
 agatagaaaa tgaaaatatt gtcaagagtt tcagatagaa aatgaaaaac aagctaagac 2160
 10 aagtattgga gaagtataga agatagaaaa atataaagcc aaaaattgga taaaatagca 2220
 ctgaaaaaat gaggaaatta ttggtaacca atttatttta aaagcccatc aatttaattt 2280
 ctggtggtgc agaagttaga aggtaaagct tgagaagatg aggggtgtta cgtagaccag 2340
 aaccaattta gaagaatact tgaagctaga aggggaagtt ggttaaaaaat cacatcaaaa 2400
 agctactaaa aggactggtg taatttaaaa aaaactaagg cagaaggctt ttggaagagt 2460
 15 tagaagaatt tggaaggcct taatatagtt agcttagttt gaaaaatgtg aaggactttc 2520
 gtaacggaag taattcaaga tcaagagtaa ttaccaactt aatgtttttg cattggactt 2580
 tgagttaaga ttatttttta aatcctgagg actagcatta attgacagct gaccagagt 2640
 ctacacagaa gtggattcag tgaatctagg aagacagcag cagacaggat tccaggaacc 2700
 agtgtttgat gaagctagga ctgaggagca agcgagcaag cagcagttcg ttgtgaagat 2760
 20 aggaaaagag tccaggagcc agtgcgattt ggtgaaggaa gctaggaaga aggaaggagc 2820
 gctaacgatt tgggtggtgaa gctaggaaaa aggattccag gaaggagcga gtgcaatttg 2880
 gtgatgaagg tagcaggcgg ctggccttg caaccacacg gaggaggcga gcaggcgttg 2940
 tgcgtagagg atcctagacc agcatgccag tgtgccaagg ccacagggaa agcgagtggg 3000
 25 tggtaaaaaat ccgtgaggtc ggcaatatgt gtttttctg gaacttactt atggtaacct 3060
 tttatttatt ttctaataata atgggggagt ttctgactga ggtgtaaagg gatttatatg 3120
 gggacgtagg ccgatttccg ggtgtttag gtttctcttt ttcaggctta tactcatgaa 3180
 tcttgtctga agcttttgag ggcagactgc caagtctgg agaaatagta gatggcaagt 3240
 ttgtgggttt ttttttttta cacgaatttg aggaaaacca aatgaatttg atagccaaat 3300
 30 tgagacaatt tcagcaaatc tgtaagcagt ttgtatgttt agttggggta atgaagtatt 3360
 tcagttttgt gaatagatga cctgttttta ctctctcacc ctgaattcgt tttgtaaatg 3420
 tagagttttg atgtgtaact gaggcggggg ggagttttca gtattttttt ttgtgggggt 3480
 gggggcaaaa tatgttttca gttcttttct ccttaggtct gtctagaatc ctaaaggcaa 3540
 atgactcaag gtgtaacaga aaacaagaaa atccaatatc aggataatca gaccaccaca 3600
 35 ggtttacagt ttatagaaac tagagcagtt ctcacgttga ggtctgtgga agagatgtcc 3660
 attggagaaa tggctggttag ttactctttt ttccccccac ccccttaatc agactttaa 3720
 agtgcctaac cccttaact tgttattttt tacttgaagc attttgggat ggtcttaaca 3780
 gggaaagag aggggtgggg agaaaatgtt tttttctaag attttccaca gatgctatag 3840
 tactattgac aaactgggtt agagaaggag tgtaccgctg tgctgttggc acgaacacct 3900
 40 tcagggactg gagctgcttt tacccttga agagtattcc cagttgaagc gtgaaagtac 3960
 agcacagtg agctttggtt catattcagt catctcagga gaacttcaga agagcttgag 4020
 taggccaaat gttgaagtta agttttccaa taatgtgact tcttaaaaagt tttattaaag 4080
 gggaggggca aatattggca attagttggc agtggcctgt tacggttggg attggtgggg 4140
 tgggttagg taattgttta gtttatgatt gcagataaac tcatgccaga gaacttaaag 4200
 45 tcttagaatg gaaaaagtaa agaaatca acttccaagt tggcaagtaa ctccaatga 4260
 ttagtttttt ttccccccag tttgaattgg gaagctgggg gaagttaaat atgagccact 4320
 ggggtacca gtgcattaat ttgggcaagg aaagtgtcat aatttgatac tgtatctgtt 4380
 ttccctcaaa gtatagagct ttgggggaa gaaagtattg aactgggggt tggctggcc 4440
 tactgggctg acattaacta caattatgg caaatgcaaaa gttgtttga tatggtagtg 4500
 50 tgtggttctc ttttggaatt ttttccaggt gatttaataa taatttaaaa ctactataga 4560
 aactgcagag caaaggaagt ggcttaatga tcttgaaggg atttcttctg atggtagctt 4620
 ttgtattatc aagtaagatt ctattttcag ttgtgtgtaa gcaagttttt ttttagtgta 4680
 ggagaaatc ttttccattg tttactgca aaacaagatg ttaaggtatg cttcaaaaaat 4740
 tttgtaaatt gtttatttta aacttatctg tttgtaaatt gtaactgatt aagaattgtg 4800
 55 atagttcagc ttgaatgtct cttagagggt gggcttttgt tgatgagga ggggaaactt 4860
 ttttttttct tatagacttt tttcagataa catcttctga gtcataacca gctcagcagt 4920
 atgatggcct agatgcagag aaaacagctc cttggtgaaat tgataagtaa aggcgaaaa 4980
 gattatatgt catacctcca ttggggaata agcataaacc tgagattctt actactgatg 5040
 agaacattat ctgcatatgc caaaaaattt taagcaaatg aaagctacca atttaaagtt 5100
 60 acggaatcta ccatttttaa gttaattgct tgtcaagcta taaccacaaa aataatgaat 5160
 tgatgagaaa tacaatgaag aggcaatgtc catctcaaaa tactgctttt acaaaaagcag 5220
 aataaaaagc aaaagaaatg aaaatgttac actacattaa tcctggaata aaagaagccg 5280
 aaataaatga gagatgagtt gggatcaagt ggattgagga ggctgtgctg tgtgccaatg 5340
 65 tttcgtttgc ctcagacagg tatctctctg ttatcagaag agttgcttca tttcatctgg 5400

ES 2 673 960 T3

	gagcagaaaa	cagcaggcag	ctgttaacag	ataagtttaa	cttgcacatcg	cagtattgca	5460
	tgttagggat	aagtgcttat	ttttaagagc	tgtggagttc	ttaaatatca	accatggcac	5520
	tttctcctga	ccccttccct	aggggatttc	aggattgaga	aatttttcca	tcgagccttt	5580
5	ttaaaattgt	aggacttggt	cctgtgggct	tcagtgatgg	gatagtacac	ttcactcaga	5640
	ggcatttgca	tctttaaata	atcttctaaa	agcctctaaa	gtgatcagtg	ccttgatgcc	5700
	aactaaggaa	atcttgcttag	cattgaatct	ctgaaggctc	tatgaaagga	atagcatgat	5760
	gtgctgcttag	aatcagatgt	tactgctaaa	atcttcatgt	tgtgatgtaa	attgctgtaga	5820
	aaaccattaa	atcattcaaa	ataataaact	atcttttatta	gagaatgtat	acttttagaa	5880
10	agctgtctcc	ttatcttaaat	aaaatagtg	ttgtctgtag	ttcagtgctg	gggcaatctt	5940
	gggggggatt	cttctctaat	ctttcagaaa	ctttgtctgc	gaacactctt	taatggacca	6000
	gatcaggatt	tgagcgggaa	aacgaatgta	actttaaggc	aggaaagaca	aattttattc	6060
	ttcataaagt	gatgagcata	taataattcc	aggcacatgg	caatagaggc	cctctaataa	6120
	aggaataaat	aacctcttag	acaggtggga	gattatgatc	agagtaaaaag	gtaattacac	6180
15	atctttattc	cagaaagtca	ggggcttata	aattgacagt	gattagagta	atactttttc	6240
	acatttccaa	agtttgcatg	ttacttttaa	atgcttaca	tcttagagtg	gtaggcaatg	6300
	ttttactacta	ttgaccttat	ataggggaag	gagggggctg	ctgtggggtt	ttaaagaatt	6360
	ttccttttgca	gaggcatttc	atccttcatg	aagccattca	ggattttgaa	ttgcatatga	6420
20	gtgcttggtc	cttccttctg	ttctagttag	tgtatgagac	cttgcagtg	gtttatcagc	6480
	atactcaaaa	tttttttctt	ggaatcttga	gggatgggag	gaggggggtg	ggcttacttg	6540
	ttgtagcttt	tttttttttt	acagacttca	cagagaatgc	agttgtcttg	acttcaggctc	6600
	tgtctgttct	gttggcaagt	aatgacagta	ctgttctgat	cccgtctgta	ttagaatgca	6660
	ttgtgaaacg	actggagat	gattaaaagt	tgtgttcccc	aatgcttggg	gtagtgtatt	6720
25	ttgaaggaaa	aaatccagct	gagtgataaa	ggctgagtg	tgaggaaatt	ctcgcagttt	6780
	taagcagctg	tatttctgat	tgaagctgag	tacattttgc	tggtgtattt	ttagtaaaaa	6840
	tgctttttgt	tcatttctgg	tggtgggagg	ggactgaagc	ctttagtctt	ttccagatgc	6900
	aaccttaaaa	tcagtgacaa	gaaacattcc	aaacaagcaa	cagtcttcaa	gaaattaaac	6960
	tggaagctgg	aaatgtttaa	acagttcag	gatcttttag	gcattgttta	tgtgtggggt	7020
30	tctctctccc	ctcccttgg	cttaattctt	acatgcagga	acactcagca	gacacacgta	7080
	tgcgaaaggg	cagagaagcc	agaccagta	agaaaaata	gcctatttac	tttaataaaa	7140
	ccaaacattc	catttttaaat	gtggggattg	ggaaccacta	gttctttcag	atggtattct	7200
	tcagactata	gaaggagctt	ccagttgaat	tcaccagtg	acaaaatgag	gaaaacaggt	7260
35	gaacaagctt	tttctgtatt	tacatacaaa	gtcagatcag	ttatgggaca	atagtattga	7320
	atagatttca	gctttatgct	ggagtaactg	gcatgtgagc	aaactgtgtt	ggcgtggggg	7380
	tggaagggatg	aggtgggctg	taagcctttt	tttaagattt	ttcaggtacc	cctcactaaa	7440
	ggcaccggaag	gcttaagata	ggacaaccat	ggagccttcc	tgtggcagga	gagacaacaa	7500
	agcgctatta	tcctaaggct	aagagaagtg	tcagcctcac	ctgattttta	ttagttaatga	7560
40	ggacttgctt	caactccctc	tttctggagt	gaagcatccg	aaggaatgct	tgaagtacct	7620
	ctgggcttct	cttaacattt	aagcaagctg	tttttatagc	agctcttaat	aataaagccc	7680
	aaatctcaag	cggtgcttga	aggggagggg	aagggggaaa	gcgggcaacc	acttttccct	7740
	agctttttcca	gaagcctggt	aaaagcaagg	tctccccaca	agcaacttct	ctgccacatc	7800
	gccaccccg	gccttttgat	ctagcacaga	cccttcaccc	ctcacctcga	tgcagccagt	7860
45	agcttgatc	cttgtgggca	tgatccataa	tcggtttcaa	ggtaacgatg	gtgtcgaggt	7920
	ctttggtggg	ttgaactatg	ttagaaaagg	ccattaattt	gcctgcaaat	tgttaacaga	7980
	agggtattaa	aaccacagct	aagttagctc	attataatac	ttatccagtg	actaaaacca	8040
	acttaaacca	gtaagtggag	aaataacatg	ttcaagaact	gtaatgctgg	gtgggaacat	8100
	gtaacttgta	gactggagaa	gataggcatt	tgagtgctg	agagggcttt	tgggtgggaa	8160
50	tgcaaaaatt	ctctgctaag	actttttcag	gtgaacataa	cagacttggc	caagctagca	8220
	tcttagcgga	agctgatctc	caatgctctt	cagtaggggtc	atgaagggtt	ttcttttctt	8280
	gagaaaaaaa	cacgtattgt	tttctcaggt	tttgcttttt	ggcctttttc	tagcttaaaa	8340
	aaaaaaaaag	caaaagatgc	tggtggttgg	cactcctggt	ttccaggacg	gggttcaaat	8400
55	ccctgctggc	tctttgcttt	gactactaat	ctgtcttcag	gactctttct	gtatttctcc	8460
	ttttctctgc	aggtgctagt	tcttgaggtt	ttggggaggt	gggaggtaac	agcacaatat	8520
	ctttgaacta	tatacatcct	tgatgtataa	tttgtcagga	gcttgacttg	attgtatatt	8580
	catatttaca	cgagaacctc	atataactgc	cttgtctttt	tcaggtaata	gcctgcagct	8640
	ggtgttttga	gaagccctac	tgctgaaaa	ttaacaattt	tgtgtaataa	aaatggagaa	8700
60	gctctaaa						8708

<210> 9
 <211> 8708
 <212> ADN
 <213> Homo sapien

65

ES 2 673 960 T3

<400> 9

gtaaaggact ggggccccgc aactggcctc tcctgccctc ttaagcgcag cgccatttta 60

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

5 gcaacgcaga agcccggcgc cgggaagcct cagctcgcct gaaggcaggt cccctctgac 120
 gcctccggga gccaggttt cccagagtcc ttgggacgca gcgacgagtt gtgctgctat 180
 cttagctgtc cttataggct ggccattcca ggtggtggtta tttagataaa accactcaa 240
 ctctgcagtt tggctctggg gtttgagga aagcttttat ttttcttcct gctccggttc 300
 agaaggtctg aagctcatac ctaaccaggc ataacacaga atctgcaaaa caaaaacccc 360
 taaaaaagca gaccagagc agtgtaaaaca cttctgggtg tgtccctgac tggctgcca 420
 aggtctctgt gtcttcggag acaaagccat tcgcttagtt ggtctacttt aaaaggccac 480
 ttgaactcgc tttccatggc gatttgcctt gtgagcactt tcaggagagc ctggaagctg 540
 10 aaaaaacggta gaaaaatttc cgtgcgggcc gtggggggct ggcggcaact ggggggcccgc 600
 agatcagagt gggccactgg cagccaacgg cccccggggc tcaggcgggg agcagctctg 660
 tgggtgtgga ttgagggcgtt ttccaagagt gggttttcac gtttctaaga tttcccaagc 720
 agacagcccg tgctgctccg atttctcga caaaaagca aaacgtgtgg ctgtcttggg 780
 agcaagtccg aggactgcaa gcagttgggg gagaaagtc gccatthttgc cacttctcaa 840
 cctgcccctgc aaggctgggg ctcagttgcg taatggaaag taaagccctg aactatcaca 900
 15 ctttaactctt ccttcaaaag gtggtaaact atacctactg tccctcaaga gaacacaaga 960
 agtgctttta gaggatthttt aaaagtccg ggggttttgt gaggtgtttg atgaccctgt 1020
 taaaaataga tttccatggt tcttttgtct aaagtttgca gctcaaatct ttccacacgc 1080
 tagtaattta agtatttctg catgtgtagt ttgcattcaa gttccataag ctgtaagaa 1140
 20 aaatctagaa aagtaaaact agaacctatt tttaaccgaa gaactacttt ttgcctccct 1200
 cacaaaggcg gcggaaggtg atcgaattcc ggtgatgcga gttgttctcc gtctataaat 1260
 acgctcgcgc cgagctgtgc ggtaggcatt gaggcagcca gcgaggggc ttctgctgag 1320
 gggcagggcg gagcttgagg aaaccgcaga taagtttttt tctctttgaa agatagagat 1380
 taatacaact acttaaaaaa tatagtcaat aggttactaa gatattgctt agcgttaagt 1440
 25 ttttaacgta attttaatag cttaagattt taagagaaaa tatgaagact tagaagagta 1500
 gcatgaggaa ggaaaagata aaagtttctt aaacatgac ggaggttgag atgaagcttc 1560
 ttcatggagt aaaaaatgta tttaaaagaa aattgagaga aaggactaca gagccccgaa 1620
 ttaataccaa tagaagggca atgcttttag attaaaatga aggtgactta aacagcttaa 1680
 agtttagttt aaaagttgta ggtgattaaa ataatttgaa ggcgatcttt taaaaagaga 1740
 30 ttaaacggaa ggtgattaaa agaccttgaa atccatgacg cagggagaat tgctcattt 1800
 aaagcctagt taacgcattt actaaacgca gacgaaaatg gaaagattaa ttgggagtgg 1860
 taggataaaa caatttgag aagatagaag tttgaaagtg aaaactggaa gacagaagta 1920
 cggaaagggc agaaaaagaa tagaagagat agggaaatta gaagataaaa acatactttt 1980
 agaagaaaaa agataaattt aaacctgaaa agtaggaagc agaagaaaaa agacaagcta 2040
 35 ggaacaaaaa agctaagggc aaaatgtaca aacttagaag aaaattggaa gatagaaaca 2100
 agatagaaaa tgaaaatatt gtcaagagtt tcagatagaa aatgaaaaac aagctaagac 2160
 aagtattgga gaagtataga agatagaaaa atataaagcc aaaaattgga taaaatagca 2220
 ctgaaaaaat gaggaaatta ttgtaacca atttatthttt aaagcccatc aatthtaattt 2280
 ctggtggtgc agaagttaga aggtaaagct tgagaagatg aggggtgttt cgtagaccag 2340
 40 aaccaattta gaagaatact tgaagctaga agggaaagtt ggttaaaaaa gctcaaaaaa 2400
 agctactaaa aggactggtg taatttaaaa aaaactaagg cagaaggctt ttggaagagt 2460
 tagaagaatt tgggaaggcct taatatagtt agcttagttt gaaaaatgtg aaggactttc 2520
 gtaacggaag taattcaaga tcaagagtaa ttaccaactt aatgtthttg cattggactt 2580
 tgagttaaga ttatthttta aatcctgagg actagcatta attgacagct gaccaggtg 2640
 45 ctacacagaa gtggattcag tgaatctagg aagacagcag cagacaggat tccaggaacc 2700
 agtgtttgat gaagctagga ctgaggagca agcgagcaag cagcagttcg tggatgaagat 2760
 aggaaaagag tccaggagcc agtgcgattt ggtgaaggaa gctaggaaga aggaaggagc 2820
 gctaacgatt tgggtggtgaa ctaggaaaaa aggattccag gaaggagcga gtgcaatttg 2880
 50 gtgatgaagg tagcaggcg cttggcttgg caaccacag gaggaggcga gcaggcgttg 2940
 tgcgtagagg atcctagacc agcatgccag tgtgccaaagg ccacagggaa agcagtggt 3000
 tggtaaaaaat ccgtgaggtc ggcaatatgt tgtthttctg gaacttactt atggtaacct 3060
 tttatthtatt ttctaataa atgggggagt ttcgtactga ggtgtaaagg gatttatatg 3120
 gggacgtagg ccgattthccg ggtgtttag gtttctcttt ttcaggctta tactcatgaa 3180
 55 tcttgtctga agctthttgag ggcagactgc caagtccctgg agaaatagta gatggcaagt 3240
 ttgtgggttt tthttthttta cacgaatttg aggaaaacca aatgaatttg atagccaaat 3300
 tgagacaatt tcagcaaatc tgaagcagt ttgtatgtht agttggggta agttgggtatt 3360
 tcagthttgt gaatagatga cctgtthttt cttctcacc ctgaattcgt tttgtaaatg 3420
 tagagthttg atgtgtaact gaggcggggg ggagthttca gtatthtttt ttgtgggggt 3480
 gggggcaaaa tatgtthttca gttctthttc ccttaggtct gtctagaatc cttaaaggcaa 3540
 60 atgactcaag gtgtaacaga aaacaagaaa atccaatatc aggataatca gaccaccaca 3600
 ggtttacagt ttatagaaac tagagcagtt ctcacgttga ggtctgtgga agagatgtcc 3660
 attggagaaa tggctggtag ttactcttht ttccccccac ccccttaatc agactthtaa 3720
 agtgcttaac cccttaaac tgthatttht tacttgaagc atthttggat ggtcttaaca 3780
 65 gggaaagagag aggggtggggg agaaaatgth tthttctaaag atthttccaca gatgctatag 3840

ES 2 673 960 T3

	tactattgac	aaactggggtt	agagaaggag	tgtaccgctg	tgctggtggc	acgaacacct	3900
	tcagggactg	gagctgcttt	tatccttgga	agagtattcc	cagttgaagc	tgaaaagtac	3960
	agcacagtgc	agctttgggtt	catattcagt	catctcagga	gaacttcaga	agagcttgag	4020
5	taggcctaat	gttgaagtta	agttttccaa	taatgtgact	tcttaaaagt	tttattaaag	4080
	gggaggggca	aatattggca	attagttggc	agtggcctgt	tacggttggg	attgggtgggg	4140
	tgggtttagg	taattgttta	gtttatgatt	gcagataaac	tcatgccaga	gaacttaaag	4200
	tcttagaatg	gaaaaagtaa	agaaatatca	acttccaagt	tggaagtaa	ctcccaatga	4260
	tttagttttt	ttccccccag	tttgaattgg	gaagctgggg	gaagttaaat	atgagccact	4320
10	gggtgtacca	gtgcattaat	ttgggcaagg	aaagtgtcat	aatttgatac	tgtatctggt	4380
	ttccttcaaa	gtatagagct	tttggggaag	gaaagtattg	aactgggggt	tggctctggcc	4440
	tactgggctg	acattaacta	caattatggg	aaatgcaaaa	gttgtttgga	tatggtagtg	4500
	tgtggttctc	ttttggaatt	tttttcaggt	gatttaataa	taatttaaaa	ctactataga	4560
	aactgcagag	caaaggaagt	ggcttaatga	tcctgaaggg	atctctctctg	atggtagctt	4620
15	ttgtattatc	aagtaagatt	ctatcttcag	ttgtgtgtaa	gcaagttttt	tttttagtgt	4680
	aggagaaata	cttttcatt	gtttaactgc	aaaacaagat	gtaaggtat	gcttcaaaaa	4740
	ttttgtaaat	tgtttatttt	aaacttatct	gtttgtaaat	tgtaactgat	taagaattgt	4800
	gatagttcag	cttgaatgtc	tcttagaggg	tgggcttttg	ttgatgaggg	aggggaaact	4860
	tttttttttc	tatagacttt	tttcagataa	catcttctga	gtcataacca	gcctggcagt	4920
20	atgatggcct	agatgcagag	aaaacagctc	cttgggtgaat	tgataagtaa	aggcagaaaa	4980
	gattatatgt	catacctcca	ttggggaata	agcataaccc	tgagattcct	actactgatg	5040
	agaacattat	ctgcatatgc	caaaaaattt	taagcaaatg	aaagctacca	atftaaagtt	5100
	acggaatcta	ccatttttaa	gttaattgct	tgtcaagcta	taaccacaaa	aataatgat	5160
	tgatgagaaa	tacaatgaag	aggcaatgct	catctcaaaa	tactgctttt	acaaaagcag	5220
25	aataaaaagcg	aaaagaaatg	aaaatgttac	actacattaa	tcctggaata	aaagaagccg	5280
	aaataaatga	gagatgagtt	gggatcaagt	ggattgagga	ggctgtgctg	tgtgccaatg	5340
	tttcgtttgc	ctcagacagg	tatctctctg	ttatcagaag	agttgcttca	tttcatctgg	5400
	gagcagaaaa	cagcaggcag	ctgttaacag	ataagtttaa	cttgcactctg	cagtattgca	5460
	tgttagggat	aagtgcattat	ttttaagagc	tgtggagttc	ttaaatatca	accatggcac	5520
30	tttctcctga	ccccttccct	aggggatttc	aggattgaga	aatftttcca	tcgagccttt	5580
	ttaaaattgt	aggacttggt	cctgtgggct	tcagtgatgg	gatagtacac	ttcactcaga	5640
	ggcatttgca	tctttaaata	atftcttaa	agcctctaaa	gtgatcagtg	ccttgatgcc	5700
	aactaaggaa	atftgtttag	cattgaaatc	ctgaaggctc	tatgaaagga	atagcatgat	5760
	gtgctgttag	aatcagatgt	tactgctaaa	atftacatgt	tgtgatgtaa	attgtgtaga	5820
35	aaaccattaa	atcattcaaa	ataataaact	atftttatta	gagaatgtat	actftttagaa	5880
	agctgtctcc	ttatftaaat	aaaatagtgt	ttgtctgtag	ttcagtgttg	gggcaatctt	5940
	gggggggatt	cttctcta	ctttcagaaa	ctttgtctgc	gaacactctt	taatggacca	6000
	gatcaggatt	tgagcgggaag	aacgaatgta	actfttaaggc	aggaaagaca	aatftttattc	6060
40	ttcataaagt	gatgagcata	taataattcc	aggcacatgg	caatagaggc	cctctaaata	6120
	aggaataaat	aacctcttag	acagtgggga	gattatgatc	agagtaaaag	gtaattacac	6180
	atfttatttc	cagaaagtca	gggtctata	aattgacagt	gattagagta	atactfttttc	6240
	acatttccaa	agtttgcatg	ttactfttaa	atgcttacia	tcttagagtg	gtaggcaatg	6300
	ttttacacta	ttgaccttat	ataggggaag	gaggggggtgc	ctgtgggggt	ttaaagaatt	6360
45	ttcctttgca	gaggcatttc	atccttcatg	aagccattca	ggattfttgaa	ttgcatatga	6420
	gtgcttggct	cttctctctg	ttctagttag	tgtatgagac	cttgcagtga	gtttatcagc	6480
	atactcaaaa	ttfttttccct	ggaatttga	gggatgggag	gaggggggtgg	ggcttacttg	6540
	ttgtagcttt	ttftttttttt	acagacttca	cagagaatgc	agttgtcttg	acttcagggt	6600
	tgtctgttct	gttggcaagt	aatgcaagta	ctgttctgat	cccgcctgta	ttagaatgca	6660
50	ttgtgaaaacg	actggagtat	gattaaaagt	tgtgttcccc	aatgcttggga	gtagtatttg	6720
	ttgaaggaaa	aaatccagct	gagtgataaa	ggctgagttg	tgaggaaatt	tctgcagttt	6780
	taagcagtcg	tatttgtgat	tgaagctgag	tacattfttgc	tgggtgtatt	ttaggtaaaa	6840
	tgctftttgt	tcatttctgg	tgggtgggag	ggactgaagc	ctfttagtctt	ttccagatgc	6900
	aaccttaaaa	tcagtgacaa	gaaacattcc	aaacaagcaa	cagtcttcaa	gaaattaaac	6960
55	tggcaagtgg	aaatgtftaa	acagttcagt	gatctfttagt	gcattgtftta	tgtgtgggtt	7020
	tctctctccc	ctcccttggg	cttaattctt	acatgcagga	acactcagca	gacacacgta	7080
	tgcgaagggc	cagagaagcc	agaccagta	agaaaaaata	gcctatttac	tttaaaataa	7140
	ccaaacattc	cattfttaaat	gtggggattg	ggaaccacta	gttctfttcag	atggttattct	7200
	tcagactata	gaaggagctt	ccagttgaa	tcaccagttg	acaaaatgag	gaaaacaggt	7260
	gaacaagctt	tttctgtatt	tacatacaaa	gtcagatcag	ttatgggaca	atagtattga	7320
60	atagatttca	gctfttatgct	ggagtaactg	gcatgtgagc	aaactgtgtt	ggcgtggggg	7380
	tggaggggtg	aggtgggcgc	taagcctftt	tttaagattt	ttcaggtacc	cctcactaaa	7440
	ggcaccgaag	gctftaaagta	ggacaacat	ggagccttcc	tgtggcagga	gagacaacaa	7500
	agcgtatta	tcctaaggtc	aagagaagtg	tcagcctcac	ctgattfttta	ttagtattga	7560
65	ggacttgcct	caactccctc	tttctggagt	gaagcatccg	aaggaatgct	tgaagtacct	7620

ES 2 673 960 T3

	ctgggcttct	cttaacattt	aagcaagctg	tttttatagc	agctcttaat	aataaagccc	7680
	aaatctcaag	cggtgcttga	aggggagggg	aagggggaaa	gcgggcaacc	acttttccct	7740
	agcttttcca	gaagcctggt	aaaagcaagg	tctccccaca	agcaacttct	ctgccacatc	7800
5	gccaccccgt	gccttttgat	ctagcacaga	cccttcaccc	ctcacctcga	tgcagccagt	7860
	agcttggatc	cttgtgggca	tgatccataa	tcggtttcaa	ggtaacgatg	gtgtcgaggt	7920
	ctttgggtggg	ttgaactatg	ttagaaaagg	ccattaattt	gcctgcaaat	tgttaacaga	7980
	agggtattaa	aaccacagct	aagtagctct	attataatac	ttatccagtg	actaaaacca	8040
	acttaaacca	gtaagtggag	aaataacatg	ttcaagaact	gtaatgctgg	gtgggaacat	8100
10	gtaacttgta	gactggagaa	gataggcatt	tgagtggctg	agagggcttt	tgggtgggaa	8160
	tgcaaaaatt	ctctgctaag	actttttcag	gtgaacataa	cagacttggc	caagctagca	8220
	tcttagcgga	agctgatctc	caatgctctt	cagtagggtc	atgaaggttt	ttcttttccct	8280
	gagaaaacaa	cacgtattgt	tttctcaggt	tttgcttttt	ggcctttttc	tagcttaaaa	8340
	aaaaaaaaag	caaaagatgc	tggtggttgg	cactcctggt	ttccaggacg	gggttcaaat	8400
15	ccctgcggcg	tctttgcttt	gactactaat	ctgtcttcag	gactctttct	gtattttctcc	8460
	ttttctctgc	aggtgctagt	tcttggagtt	ttggggaggt	gggaggtaac	agcacaatat	8520
	ctttgaacta	tatacatcct	tgatgtataa	tttgtcagga	gcttgacttg	attgtatatt	8580
	catatttaca	cgagaaccta	atataactgc	cttgtctttt	tcaggtaata	gcctgcagct	8640
20	gggtgtttga	gaagccctac	tgctgaaaac	ttaacaattt	tgtgtaataa	aatggagaa	8700
	gctctaaa						8708

<210> 10
 <211> 6982
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 10

25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

ES 2 673 960 T3

	aggcattcag	gcagcgagag	cagagcagcg	tagagcagca	cagctgagct	cgtgaggcag	60
	gagactcagc	ccgaggaaat	cgagataag	tttttaatta	aaaagattga	gcagtaaaaa	120
	gaattagaac	tctaaactta	agctaataga	gtagcttatc	gaaatattac	ttagtcttaa	180
5	taatctaaga	agatcttaag	agataacatg	aaggcttatt	taaacagttt	gaaaaaggaa	240
	atgaggagaa	aagtattttgt	actgtataat	ggaggctgac	cagagcagtt	taggagattg	300
	taaagggagg	ttttgtgaag	ttctaaaagg	ttctagtttg	aaggtcggcc	ttgtagatta	360
	aaacgaaggt	tacctaataa	gaatctaagt	ggcatttaaa	acagtaaaat	tgtagagaaat	420
	agtttgaaaa	tgaggtgtag	ttttaaaaga	ttgagaaaag	taggttaagt	tgacggccgt	480
10	tataaaaaatc	cttcgactgg	cgcatgtacg	tttgaaggca	tgagttggaa	acagggaaga	540
	tggaagtgtt	aggctagccg	ggcgatggtg	gcgcacgcct	ttaatcctag	cacttgggag	600
	gcagagggcag	gcggatttct	gagttcgagg	ccagcctggt	ctacagagtg	agttccagga	660
	cagccagggc	tacacagaga	aaccctgtct	tgaaaaaaca	aaaaggttag	gctagtattt	720
	ggagaaaagaa	gattagaaaa	tggaagtgaa	agacgaagaa	gacatacag	aaggtgaaga	780
15	aaaagctggt	agagaagata	ggaaaataga	agacaaagca	tctttagaag	acagaaaagg	840
	tacttaaaagg	cacaggtagt	aggaagccga	agaatagaag	atagaaaagaa	gcaagataga	900
	aaaacaaaaat	ggaagttaag	acaacttttg	atgccagcat	tcaagatagg	caaagaagat	960
	aagattgagg	ccaaaaggtt	ggataagata	taaagtcaga	aggaaattat	ctttaaagcc	1020
20	ataagttcaa	atctctgatg	gagcgagcag	tttagaagag	tctttagaca	gccacataca	1080
	agattgaagc	tagcaatcaa	agctactagg	actgaagtaa	aaagttaagg	cagaatgcct	1140
	ttgaagagtt	agaagaatat	taaaagcctt	aacttgtagc	ttaattttgc	ttgatgacaa	1200
	aaggactttt	gataacagtt	tcaagattgt	cagcattttg	cattggactt	gagctgaggt	1260
	gcttttaaaa	tcctaacgac	tagcattggc	agctgaccca	ggtctacaca	gaagtgcatt	1320
25	cagtgaacta	ggaagacag	agcggcagac	aggagtccc	aagccagttt	ggtgaagcta	1380
	ggaaggactg	aggagccagc	agcagcagtg	catggtgaag	atagcccag	aaagagtgcg	1440
	gttcggtgga	ggaagctagg	aagaaggagc	catacggatg	tggtggtgaa	gctgggaaag	1500
	ggttccagga	tggtggagcg	agagcgagtt	ggtgatgaag	ctagctggcg	gcttggcttg	1560
	tcaactgcmc	ggaggaggcg	agcaggcatt	gtggagagga	tagatagcgg	ctcctagacc	1620
30	agcatgccag	tgtgcaagaa	aggctgcagg	gagagcatgc	ggtgcggtaa	cattccttga	1680
	ggtcggcaac	atggtggtgg	ttttctgtaa	cttggatggt	aacttgttta	ctttgtctta	1740
	atagttatgg	gggagttgta	ggcttctgtg	taaagagata	tatctggggc	tgtatgtagg	1800
	cctttgcggg	tgttgtaggt	ttttctttt	cagggttatg	tcctcttgca	tcttgtcaga	1860
	agcttttgag	ggctgactgc	caaggcccag	aaagaagaat	ggtagatggc	aagttgtctt	1920
35	taaccgctca	gaggggaatg	aatggtagag	ccagcacaac	ctcccagttt	tgtaagacgt	1980
	tgtagtttga	acagatgacc	taccacaagc	ctcactcctg	tgtaggggag	gtaattgggc	2040
	aaagtgcctt	tgggggaatg	ggggcaaat	atattttgag	ttcttttccc	cttaggtctg	2100
	tctagaatcc	taaaggcaga	tgactcaagg	gaaccagaaa	aaaggaaatc	cactctcag	2160
40	ataagcagag	ctcgcaggtt	ttacagtttg	taggaagtag	aggatggatg	ctagctttca	2220

45

50

55

60

65

ES 2 673 960 T3

5 cactgagtgt ggaggagctg gccatggcgg aattgctggt agtttactct ttccccctcc 2280
 cttaatgaga tttgtaaaat cctaacaact tttacttgaa atatttgga gtggtcttaa 2340
 cagggaggag tgggtggggg aaacgttttt tttctaagat tttccacaga tgctatagtt 2400
 gtgttgacac actgggttag agaaggcgtg tactgctatg ctggtggcac gacaccttca 2460
 gggactggag ctgccttttg tccttgggaag agttttccca gttgccgctg aagtcagcac 2520
 agtgccgctt tggttcacag tcacctcagg agaacctcag gagcttggct aggccagagg 2580
 ttgaagttaa gttttacagc accgtgattt aaaatatttc attaaagggg aggggtaaaa 2640
 cttagtggc tgtggccttg tgtttgggtg ggtgggggtg ttaggtaatt gtttagttta 2700
 tgatttcaga taatcatacc agagaactta aatatttggg aaaacaggaa atctcagctt 2760
 10 tcaagtggc aagtaactcc caatccagtt tttgcttctt ttttcctttt tctttttttg 2820
 aggccggcag ctaaggaagg ttggttcttc tgccgggtccc tcgaaagcgt agggcttggg 2880
 ggttggctct gtccactggg atgatgtgat gctacagtgg ggactcttct gaagctgttg 2940
 gatgaatata gattgtagtg tgtggtcttc ttttgaaatt tttttcaggt gacttaatgt 3000
 atcttaataa ctactatagg acaaaaggaa gtggctttaa tgaccctgaa ggaatttctt 3060
 15 ctggtgatag cttttatatt atcaagtaag agatactatc tcagtttgtg ataagcaagt 3120
 ctttttccta gtgtaggaga aatgatttcc cttgtgacta aacaagatgt aaaggatgc 3180
 tttttttctt cttgtgcatt gtatacttgt gtttatttgt aacttataat ttaagaatta 3240
 tgataattca gcctgaatgt cttttagagg gtgggctttt gttgatgagg gaggggaaac 3300
 cttttttttt ctgtagacct ttttcagata acaccatctg agtcataacc agcctggcag 3360
 20 tgtgatgacg tagatgcaga gggagcagct ccttgggtgaa tgagtgataa gtaaaggcag 3420
 aaaaaataat gtcattgtctc catggggaat gagcatgagc cagagattgt tcctactgat 3480
 gaaaagctgc atatgcaaaa atttaagcaa atgaaagcaa ccagtataaa gttatggcaa 3540
 tacctttaa agttatggct tatctacca gctttatcca caaaagtaa gaatgatga 3600
 25 aaaaacagtga agatcaaatg ttcattcaa aactgctttt acaaaagcag aatagaaatg 3660
 aagtgaanaat gctgcattaa gcctggagta aaaagaagct gagcttgttg agatgagtgg 3720
 gatcgagcgg ctgagaggcg gtgcagtgtg ccaatgtttc gtttgctca gacaggtttc 3780
 tcttcataag cagaagagtt gcttcattcc atctcggagc aggaaacagc agactgctgt 3840
 tgacagataa gtgtaacttg gatctgcaat attgcatggt agggatagat aagtgccttt 3900
 30 tttctctttt tccaaaaaga cctgtagagc tgttgaatgt ttgcagctgg cccctcttag 3960
 gcagttcaga attttgagta gttttcccat ccagcctctt aaaaattcct aagccttga 4020
 ccgatgggct ttcattgatg gatagtaaat aggttttgc atcgtaaac tcaacacaaa 4080
 agcctacatg ataatgcct actttaatta catgtcttac aagattaagg tctctttatc 4140
 ttgaagacc catgaaaggg atcattatgt gctgaaaatt agatgttcat attgctaaaa 4200
 35 tttaaatgtg ctccaatgta cttgtgctta aaatcattaa attatacaaa ttaataaaat 4260
 acttcactag agaatgtatg tatttagaag gctgtctcct tatttaata aagtcttgtt 4320
 tgttgtctgt agttagtgtg ggcaattttg gggggatggt cttctctaatt cttttcagaa 4380
 acttgacttc gaacacttaa gtggaccaga tcaggatttg agccagaaga ccgaaattaa 4440
 40 ctttaaggca ggaagacaa attttattct ccatgcagtg atgagcattt aataattgca 4500
 ggccctggcat agaggccgct taactaagga ctaagtacct taggcaggtg ggagatgatg 4560
 gtcagagtaa aaggtaacta catattttgt ttccagaaag tcaggggtct aatttgacca 4620
 tggctaaaca tctagggtaa gacacttttc cccacattt ccaaataatgc atgttgagtt 4680
 taaatgctta cgatcatctc atccacttta gccttttgtc acctcacttg agccacgagt 4740
 ggggtcaggc atgtgggttt aaagagtttt cctttgcaga gcctcatttc atccttcatg 4800
 45 gagctgctca ggactttgca tataagcgtc tgccctctgtc ttctgttctg ctagtgagtg 4860
 tgtgatgtga gaccttgacg tgagtttgtt tttcctggaa tgtggagggg gggggggatg 4920
 gggcttactt gttctagctt tttttttaca gaccacacag aatgcaggtg tcttgacttc 4980
 aggtcatgtc tgttcttttg caagtaatat gtgcagtact gttccaatct cctgctatta 5040
 50 gaatgcattg tgacgcgact ggagtatgat taaagaaagt tgtgtttccc caagtgtttg 5100
 gagtagtggg tgttggagga aaagccatga gtaacaggct gagtgttgag gaaatggctc 5160
 tctgcagctt taagtaacct gtgtttgtga ttggagccga gtccctttgc tgtgctgct 5220
 taggtaaatg tttttgttca tttctggtga ggggggttgg gagcactgaa gcctttagtc 5280
 tctccagat tcaacttaaa atctgacaag aaataaatca gacaagcaac attcttgaag 5340
 55 aaattttaac tggcaagtgg aaatgttttg aacagttccg tggcttttag tgcatatct 5400
 ttgtgtaggt gttctctctc cctcccttg gtcttaattc ttacatgcag gaacattgac 5460
 aacagcagac atctatctat tcaaggggcc agagaatcca gaccagtaa ggaanaaatg 5520
 cccatttact ttaaactgat aagtgaagca gacatgcat tttcagtgtg gggattggga 5580
 agccctagtt ctttcagatg tacttcagac tgtagaagga gcttccagtt gaattgaaat 5640
 tcaccagtgg acaaaatgag gacaacaggt gaacgagcct tttcttgttt aagattagct 5700
 60 actggtaatc tagtgttgaa tcctctccag cttcatgctg gagcagctag catgtgatgt 5760
 aatgttggcc ttgggtgga ggggtgaggt gggcgctaag ccttttttta agatttttca 5820
 ggtaccctc actaaaggca ctgaaggctt aatgtaggac agcggagcct tcctgtgtgg 5880
 caagaatcaa gcaagcagta ttgtatcgag accaaagtgg tatcatggtc ggttttgatt 5940
 65 agcagtgggg actaccctac cgtaacacct tgttggaaat gaagcatcca aagaaaatac 6000

ES 2 673 960 T3

```

5   ttgagaggcc ctgggcttgt tttaacatct ggaaaaaagg ctgtttttat agcagcggtt 6060
    accagcccaa acctcaagtt gtgcttgacag gggagggaaa agggggaaaag cgggcaacca 6120
    gtttccccag cttttccaga atcctgttac aaggtctccc cacaagtgat ttctctgcca 6180
    catcgccacc atgggccttt ggctaataca cagacccttc acccctcacc ttgatgcagc 6240
    cagtagctgg atccttgagg tcacggtgca tatcggtttc aaggtaacca tggtgccaag 6300
    gtcctgtggg ttgcaccaga aaaggccatc aattttcccc ttgcctgtaa tttaacatta 6360
    aaacatagc taagatgttt tatacatagc acctatgcag agtaaacaaa ccagtatggg 6420
    tatagtatgt ttgataaccag tgctgggtgg gaatgtagga agtcggatga aaagcaagcc 6480
10  tttgtaggaa gttgttgggg tgggattgca aaaattctct gctaagactt tttcaggtgg 6540
    acataacaga cttggccaag ctagcatctt agtggaaagca gattcgtcag tagggttga 6600
    aagggttttc ttttcctgag aaaacaacct tttgttttct caggttttgc tttttggcct 6660
    ttcctagct ttaaaaaaaaa aaaagcaaaa gacgctggtg gctggcactc ctggtttcca 6720
    ggacggggtt caagtccctg cgggtgtcttt gcttgactct tatatcatga ggccattaca 6780
15  tttttcttgg agggttctaa aggctctggg tatggtagct gatatcactg gaacactccc 6840
    cagcctcagt gttgaactct tgataattaa ctgcattgtc tttcaggtta tgcccaattc 6900
    gtcttattac ctctgagtcg acacacctcc tactatttat tgaatacttt gattttatga 6960
    aataaaaact aaatatctct ca                                     6982

```

```

20  <210> 11
    <211> 6689
    <212> ADN
    <213> Mus musculus

```

```

25  <400> 11

```

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 673 960 T3

5 aggcattcag gcagcgagag cagagcagcg tagagcagca cagctgagct cgtgaggcag 60
 gagactcagc ccgaggaaat ccgagataag tttttaatta aaaagattga gcagtaaaaa 120
 gaattagaac tctaaactta agctaataga gtagcttatg aaatattact tagtcttaat 180
 aatctaagaa gatcttaaga gataacatga aggcttattt aacagtttg aaaaaggaaa 240
 tgaggagaaa agtatttgta ctgtataatg gaggctgacc agagcagttt aggagattgt 300
 aaagggaggt tttgtgaagt tctaaaaggt tctagtttga aggtcggcct tgtagattaa 360
 aacgaagggt acctaaatag aatctaagtg gcatttaaaa cagtaaagtt gttagaata 420
 gtttgaaaaat gaggtgtagt tttaaaagat tgagaaaagt aggttaagtt gacggccgtt 480
 10 ataaaaatcc ttcgactggc gcatgtacgt ttgaaggcat gagttggaaa caggggaagat 540
 ggaagtgtta ggctagccgg gcgatggtgg cgcacgcctt taatcctagc acttgggagg 600
 cagagccagg cggatttctg agttcagggc cagcctggtc tacagagtga gttccaggac 660
 agccagggct acacagagaa accctgtctt gaaaaaacia aaaggttagc ctagtatttg 720
 gagaaagaag attagaaaat ggaagtgaaa gacgaagaag acatacagga aggtgaagaa 780
 15 aaagctgtta gagaagatag gaaaatagaa gacaaagcat ctttagaaga cagaaaaggt 840
 acttaaaggc acaggtagta ggaagccgaa gaatagaaga tagaaagaag caagatagaa 900
 aaacaaaatg gaagttaaga caactttgga tgccagcatt caagataggc aaagaagata 960
 agattgaggc caaaaggttg gataagatat aaagtcagaa ggaaattatc tttaaagcca 1020
 taagttcaaa tttctgatgg agcagcagct ttagaagagt ctttagacag ccacatacaa 1080
 20 gattgaagct agcaatcaaa gctactagga ctgaagtaaa aagttaaggc agaatgcctt 1140
 tgaagagtta gaagaatatt aaaagcctta acttgtagct taattttgct tgatgacaaa 1200
 aggacttttg ataacagttt caagattgtc agcattttgc attggacttg agctgaggtg 1260
 cttttaaaaat cctaacgact agcattggca gctgacccag gtctacacag aagtgcattc 1320
 25 agtgaactga gaagcagga gcggcagaca ggagctcccga agccagtttg gtgaagctag 1380
 gaaggactga ggagccagca gcagcagtc atggtgaaga tagcccagga aagagtgcgg 1440
 ttcggtggag gaagctagga agaaggagcc atacggatgt ggtggtgaag ctgggaaagg 1500
 gttccaggat ggtggagcga gagcgagttg gtgatgaagc tagctggcgg cttggcttgt 1560
 caactgcgcg gaggaggcga gcaggcattg tggagaggat agatagcggc tcctagacca 1620
 30 gcatgccagt gtgcaagaaa ggctgcaggg agagcatgcy gtgcygtaac attccttgag 1680
 gtcggcaaca tgggtggtggt tttctgtaac ttggatggtta acttgtttac tttgtcttaa 1740
 tagttatggg ggagttgtag gcttctgtgt aaagagatat atctggggct gtatgtaggc 1800
 ctttgccggg gttgtaggtt tttctttttc agggttatgt cctcttgcat cttgtcagaa 1860
 gcttttgagg gctgactgcc aaggcccaga aagaagaatg gtagatggca agttgtcttt 1920
 35 aaccgctcag aggggaatga atggtagagc cagcacaacc tcccagtttt gtaagacgtt 1980
 gtagtttgaa cagatgacct accacaagcc tccctctgt gtaggggagg taattgggca 2040
 aagtgccttt gggggaatgg gggcaaaata tattttgagt tcttttccc tttagtctgt 2100
 ctagaatcct aaaggcagat gactcaaggg aaccagaaaa aaggaaatcc actctcagga 2160
 40 taagcagagc tcgccaggtt tacagtttgt aggaagtaga ggatggatgc tagctttcac 2220
 actgagtggt gagggagctgg ccatggcggg attgctggta gtttactctt tccccctccc 2280
 ttaatgagat ttgtaaaatc ctaaacactt ttacttgaaa tatttgggag tggtcttaac 2340

45

50

55

60

65

ES 2 673 960 T3

5 agggaggagt ggggtggggga aacgtttttt ttctaagatt ttccacagat gctatagttg 2400
 tgttgacaca ctgggttaga gaaggcgtgt actgctatgc tgttggcacg acacctcag 2460
 ggactggagc tgccttttgt ccttgggaaga gttttccag ttgccgctga agtcagcaca 2520
 gtgcggcttt ggttcacagc cacctcagga gaacctcagg agcttggcta ggccagaggt 2580
 tgaagttaag ttttacagca ccgtgattta aaatatttca ttaaagggga ggggtaaaac 2640
 ttagttggct gtggccttgt gtttgggtgg gtgggggtgt taggtaattg ttttagttat 2700
 gatttcagat aatcatacca gagaacttaa atatttggaa aaacaggaaa tctcagcttt 2760
 caagttggca agtaactccc aatccagttt ttgcttcttt tttccttttt ctttttttga 2820
 10 ggcgggcagc taaggaaggt tggttcctct gccggtccct cgaaagcgtg gggcttgggg 2880
 gttggtctgg tccactggga tgatgtgatg ctacagtggg gactcttctg aagctgttgg 2940
 atgaatatag attgtagtgt gtggttctct tttgaaattt ttttcagggt acttaatgta 3000
 tcttaataac tactatagga acaaaggaag tggctttaat gaccctgaag gaatttcttc 3060
 tggatagatc ttttatatta tcaagtarga gatactatct cagttttgta taagcaagtc 3120
 15 tttttcctag tgtaggagaa atgattttcc ttgtgactaa acaagatgta aaggtatgct 3180
 ttttttcttc ttgtgcattg tatacttggg tttatttggta acttataatt taagaattat 3240
 gataattcag cctgaaatgtc ttttagaggg tgggcttttg ttgatgagg aggggaaacc 3300
 ttttttttct tgtagacctt tttcagataa caccatctga gtcataacca gcttggcagt 3360
 gtgatgacgt agatgcagag ggagcagctc cttggtgaat gagtgataag taaaggcaga 3420
 20 aaaaaataatg tcatgtctcc atggggaatg agcatgagcc agagattggt cctactgatg 3480
 aaaagctgca tatgcaaaaa ttttaagcaaa tgaaagcaac cagtataaag ttatggcaat 3540
 accttataaa gttatggctt atctaccaag ctttatccac aaaagtaaa aattgatgaa 3600
 aaacagtga gatcaaatgt tcatctcaaa actgctttta caaaagcaga atagaaatga 3660
 atgaaaaatg ctgcattaag cctggagtaa aaagaagctg agcttgttga gatgagtggg 3720
 25 atcgagcggc tgcgagcgg tgcagtgtgc caatgttctg tttgcctcag acaggttctc 3780
 cttcataagc agaagagttg cttcattcca tctcggagca ggaacagca gactgctgtt 3840
 gacagataag tgtaaacttg atctgcagta ttgcatgta gggatagata agtgcctttt 3900
 ttctcttttt ccaaaaagac ctgtagagct gttgaatggt tgcagctggc ccctcttagg 3960
 cagttcagaa ttttgagtag ttttccatc cagcctctta aaaattccta agccttgcac 4020
 30 cgatgggctt tcatgatggg atagctaata ggcttttgca tcgtaaactt caacacaaaa 4080
 gcctacatga ttaatgccta ctttaattac attgcttaca agattaagga atctttatct 4140
 tgaagacccc atgaaagga tcttatgtg ctgaaaatta gatgttcata ttgctaaaat 4200
 ttaaatgtgc tccaatgtac ttgtgcttaa aatcattaaa ttatacaaat taataaaata 4260
 cttcactaga gaatgtatgt atttagaagg ctgtctcctt atttaaataa agtcttgttt 4320
 35 gttgtctgta gttagtgtgg gcaattttgg ggggatgttc ttctctaadc ttttcagaaa 4380
 cttgacttgc aacacttaag tggaccagat caggatttga gccagaagac cgaatataac 4440
 ttaaggcag gaaagacaaa ttttattctc catgcagtga tgagcattta ataattgcag 4500
 gcctggcata gaggccgtct aactaaggac taagtacctt aggcaggtgg gagatgatgg 4560
 tcagagtaaa aggtaactac atattttgtt tccagaaagt caggggtcta atttgacct 4620
 40 ggctaacaat ctagggtaag acacttttcc cccacatttc caaatatgca tgttgacttt 4680
 aatgtcttac gatcatctca tccactttag ccttttgtca cctcacttga gccacgagtg 4740
 gggtcaggca tgtgggttta aagagttttc ctttgcagag cctcatttca tccttcatgg 4800
 agctgctcag gactttgcat ataagcgtt gcctctgtct tctgttctgc tagtgagtgt 4860
 gtgatgtgag accttgcagt gagtttgtt ttcttggaa gtggaggag ggggggatgg 4920
 45 ggcttacttg ttctagcttt tttttacag accacacaga atgcaggtgt cttgacttca 4980
 ggtcatgtct gttctttggc aagtaatatg tgcagtactg ttccaatctg ctgctattag 5040
 aatgcattgt gacgcgactg gagtatgatt aaagaaagt gtgtttcccc aagtgttgg 5100
 agtagtggtt gttggaggaa aagccatgag taacaggctg agtgttgagg aaatggctct 5160
 50 ctgcagcttt aagtaaccgg tgtttgtgat tggagccgag tcccttggct gtgctgcctt 5220
 aggtaaatgt ttttgttcat ttctggtgag gggggttggg agcactgaag cctttagtct 5280
 cttccagatt caacttaaaa tctgacaaga aataaatcag acaagcaaca ttcttgaaga 5340
 aattttaact ggcaagtgga aatgttttga acagttccgt ggtctttagt gcattatctt 5400
 tgtgtagggtg ttctctctcc cctcccttgg tcttaattct tacatgcagg aacattgaca 5460
 acagcagaca tctatctatt caagggcca gagaatccag acccagtaag gaaaaatagc 5520
 55 ccatttactt taaatcgata agtgaagcag acatgccatt ttcagtgtgg ggattgggaa 5580
 gccctagttc tttcagatgt acttcagact gtagaaggag cttccagttg atttgaaatt 5640
 caccagtggg caaaatgagg acaacaggtg aacgagcctt ttcttgttta agattagcta 5700
 ctggtaatct agtgttgaat cctctccagc ttcatgctgg agcagctagc atgtgatgta 5760
 atgttggcct tgggggtggag ggggtgaggt ggcgctaagc ctttttttaa gatttttcag 5820
 60 gtaccctca ctaaaggcac tgaaggctta atgtaggaca gcgagcctt cctgtgtggc 5880
 aagaatcaag caagcagtat tgtatcgaga ccaaagtggt atcatggtcg gttttgatta 5940
 gcagtgggga ctaccctacc gtaacacctt gttggaattg aagcatccaa agaaaatact 6000
 tgagaggccc tgggcttgtt ttaacatctg gaaaaagggc tgtttttata gcagcgggta 6060
 65 ccagcccaaa cctcaagttg tgcttgcagg ggagggaaaa gggggaaagc gggcaaccag 6120

ES 2 673 960 T3

	tttccccagc	ttttccagaa	tcctggtaca	aggctctccc	acaagtgatt	tctctgccac	6180
	atcgccacca	tgggcctttg	gcctaatac	agacccttca	cccctcacct	tgatgcagcc	6240
	agtagctgga	tccttgaggt	cacgttgc	atcggtttca	aggtaacat	ggtgccaagg	6300
5	tcctgtgggt	tgaccagaa	aaggccatca	atcttcccct	tgctgtaat	ttaacattaa	6360
	aaccatagct	aagatgtttt	atacatagca	cctatgcaga	gtaaacaaac	cagtatgggt	6420
	atagtatggt	tgataccagt	gctgggtggg	aatgtaggaa	gtcggatgaa	aagcaagcct	6480
	ttgtaggaag	ttggtgggt	gggattgcaa	aaattctctg	ctaagacttt	ttcaggtgga	6540
	cataacagac	ttggccaagc	tagcatotta	gtggaagcag	attcgtcagt	agggttgtaa	6600
10	aggtttttct	tttcctgaga	aaacaacctt	ttgttttctc	aggttttgct	ttttggcctt	6660
	tccttagctt	taaaaaaaaa	aaagcaaaa				6689

<210> 12
 <211> 10001
 15 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 12

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 673 960 T3

	tgactatcag	cctgtatggt	cattaagttc	tgtctaccct	gggaaagcct	ctgcccaaac	60
	ctccctattc	acaggtccta	gaacgtagag	gtggggagca	ggacggtgcc	gccaggccgt	120
	gtgcatcg	gagctctgga	tctcaatgcg	ccccggggcg	ctgtttccca	cgactccagc	180
5	agcttttcta	aaaatccagg	cagcctccag	tttacgggat	caacccgaga	ctcgttccc	240
	tttgaaaatt	ctagagtata	aagtaaactg	acgagcaaac	tatgtgtctt	aacacttaat	300
	ggatgacata	gagacaaaa	aagccatgtc	cgtgggcccc	gtaggccgca	ataaggggcg	360
	accaggaaac	tgcagcacag	ccccccgcag	ccgccctgct	cccacaccag	tcatccagc	420
	accgtggtga	aggcgcttgg	gggcgggggcg	gggcgcgctt	gcgagcagag	gctctgcagc	480
10	agaaactttg	cctagaccgg	ctggaaccgg	ttagaaccgg	tcgaaccggg	ccggctgcca	540
	gccctcgatt	cagcagctca	caaagggagg	cgggcgactca	cgaccccgct	atccttgccg	600
	ctctccccac	cccctttgtc	ctcgcgacgg	gttccgcggt	cctccccgcc	ctccctggcg	660
	cggccccccg	tttctgcgcc	cagtgaecgt	ttctccatgg	tcctgggaga	aagagaaaa	720
	catcctttcc	cctccgctcg	agttttagga	agcgatgaga	tagacctggg	gaccttgccg	780
15	ccacggggcg	ggctctgacg	gttattagcg	cagtgcgggt	ggtgctcggc	atggccgcca	840
	aggctcgccg	gccctcacct	gcagcgacca	tggccttgct	gggctgagac	cgcagcctaa	900
	catggcggac	gtaggcaagc	accaaagcgc	tcgtgtacc	gggctcggaa	aagtggcccc	960
	gagagcagcc	ggaggctgca	ggtcgtccct	acaggagcat	tcccagtata	aaccagtaca	1020
20	aagtgtcacc	acctcagaag	ccactcgcag	ggccggtcac	tttccgagag	acctccatct	1080
	tgtttcgc	gaaatggcag	ccgctcgggg	agttacaaaa	tgggaagtgg	aagctgaagc	1140
	tgtgggaaag	cctgttttaa	cacttgcaac	atacgctata	ccctctgtcc	tcccaggaaa	1200
	acgcaaaagg	tgttgaaaca	tctgaaaaac	ttggggctcc	cattttta	agctattagt	1260
	tcattgtttt	tctccttgtg	accagaaatt	ttaaaccctat	ttgtacctat	ttagctggta	1320
25	caagctaaac	atttctctgt	attagcaagg	tccaagaggc	ccacacgacg	tcaagaaaa	1380
	tctagaaaact	tggaagtcag	gatctatttt	taactctctg	aggaactatt	tttcttcctt	1440
	caccaaggtg	gtggagggtt	actaggttcc	ggtggagtga	cgtgtccctt	tgcaataaat	1500
	accggcgctc	cgggctctgc	gtcaggcatt	caggcagcga	gagcagagca	gcgtagagca	1560
	gcacagctga	gctcgtgagg	caggagactc	agcccagagga	aatcgcagat	aagtttttaa	1620
30	ttaaaaagat	tgagcagtaa	aaagaattag	aactctaaac	ttaagcta	agagtagctt	1680
	atcgaaatat	tacttagtct	taataatcta	agaagatctt	aagagataac	atgaaggctt	1740
	atftaaacag	tttgaaaaag	gaaatgagga	gaaaagtatt	tgtactgtat	aatggaggct	1800
	gaccagagca	gtttaggaga	ttgtaaaggg	aggttttgtg	aagttctaaa	aggttctagt	1860
35	ttgaaggtcg	gccttgtaga	ttaaaacgaa	ggttacctaa	atagaatcta	agtggcattt	1920
	aaaacagtaa	agttgtagag	aatagtttga	aatgaggtg	tagttttaaa	agattgagaa	1980
	aagtaggtta	agttgacggc	cgttataaaa	atccttcgac	tggcgcagat	acgtttgaag	2040
	gcatgagttg	gaaacagggg	agatggaagt	gttagggtag	ccgggcgatg	gtggcgacg	2100
	cctttaatcc	tagcacttgg	gaggcagagg	caggcggatt	tctgagttcg	aggccagcct	2160
40	ggtctacaga	gtgagttcca	ggacagccag	ggctacacag	agaaaccctg	tcttgaaaa	2220
	acaaaaaggt	taggctagta	tttggagaaa	gaagattaga	aatggaagt	gaaagacgaa	2280
	gaagacatac	aggaaggtga	agaaaaagct	gttagagaag	ataggaaaat	agaagacaaa	2340
	gcatctttag	aagacagaaa	aggtacttaa	aggcacaggt	agtaggaagc	cgaagaatag	2400
	aagatagaaa	gaagcaagat	agaaaaacaa	aatggaagt	aagacaactt	tggatgccag	2460
45	cattcaagat	aggcaagaa	gataagattg	aggccaaaag	gttgataag	atataaagtc	2520
	agaaggaaat	tatctttaaa	gccataagtt	caaatttctg	atggagcag	cagtttagaa	2580
	gagtctttag	acagccacat	acaagattga	agctagcaat	caaagctact	aggactgaag	2640
	taaaaagtta	aggcagaatg	cctttgaaga	gttagaagaa	tattaaaagc	cttaacttgt	2700
50	agcttaattt	tgcttgatga	caaaaggact	tttgataaca	gtttcaagat	tgtcagcatt	2760

	ttgcattgga	cttgagctga	ggtgctttaa	aaatcctaac	gactagcatt	ggcagctgac	2820
	ccaggtctac	acagaagtgc	atlcagtgaa	ctaggaagac	aggagcggca	gacaggagtc	2880
	ccgaagccag	tttggtgaag	ctaggaagga	ctgaggagcc	agcagcagca	gtgcatgggtg	2940
	aagatagccc	aggaaagagt	gcggttcgg	ggaggaagct	aggaagaagg	agccatacgg	3000
5	atgtgggtgt	gaagctggga	aagggtcca	ggatgggtgga	gcgagagcga	gttgggtgatg	3060
	aagctagctg	goggcttggc	ttgtcaactg	cgcgaggag	gcgagcaggc	attgtggaga	3120
	ggatagatag	cggtcctag	accagcatgc	cagtgtgcaa	gaaaggctgc	agggagagca	3180
	tgcggtgcgg	taacattcct	tgaggtcggc	aacatgggtg	tggtttctg	taacttggat	3240
	ggtaaactgt	ttactttgtc	ttaatagtta	tgggggagtt	gtaggcttct	gtgtaaagag	3300
10	atatactgg	ggctgtatgt	aggcctttgc	gggtgttgta	ggtttttctt	tttcagggtt	3360
	atgtcctctt	gcatcttgtc	agaagctttt	gagggctgac	tgccaaggcc	cagaaagaag	3420
	aatggtagat	ggcaagttgt	ctttaaccgc	tcagagggga	atgaatggtg	gagccagcac	3480
	aacctcccag	ttttgtaaga	cgttgtagtt	tgaacagatg	acctaccaca	agcctcactc	3540
	ctgtgtaggg	gaggttaattg	ggcaaagtgc	ttttggggga	atgggggcaa	aatatatttt	3600
15	gagttctttt	ccccttaggt	ctgtctagaa	tcctaaagcc	agatgactca	aggaaccag	3660
	aaaaaaggaa	atccactctc	aggataagca	gagctcgcca	ggtttacagt	ttgttaggaag	3720
	tagaggtagg	atgctagctt	tcacactgag	tgtggaggag	ctggccatgg	cggaattgct	3780
	ggtagtttac	tctttcccc	tcctttaatg	agatttgtaa	aatcctaaac	acttttactt	3840
	gaaatatttg	ggagtggctt	taacagggag	gagtgggtgg	gggaaacggt	ttttttctaa	3900
20	gattttccac	agatgctata	gttgtgtgta	cacactgggt	tagagaaggc	gtgtactgct	3960
	atgctgttgg	cacgacacct	tcagggactg	gagctgcctt	ttgtccttgg	aagagttttc	4020
	ccagttgccg	ctgaagtcat	cacagtgcgg	ctttggttca	cagtcacctc	aggagaacct	4080
	caggagcttg	gctaggccag	aggtgaagt	taagttttac	agcaccgtga	tttaaaatat	4140
25	ttcattaaag	gggaggggta	aaacttagtt	gctgtggcc	ttgtgtttgg	gtgggtgggg	4200
	gtgttaggta	attgtttagt	ttatgatttc	agataatcat	accagagAAC	ttaaatattt	4260
	ggaaaaacag	gaaatctcag	ctttcaagtt	ggcaagtaac	tcccaatcca	gtttttgctt	4320
	cttttttctt	ttttcttttt	ttgaggcggg	cagctaagga	aggttggttc	ctctgccggg	4380
	ccctcgaaag	cgtagggctt	gggggttgg	ctgggtccact	gggatgatgt	gatgctacag	4440
	tggggactct	tctgaagctg	ttggatgaat	atagattgta	gtgtgtgggt	ctcttttgaa	4500
30	atttttttca	ggtgacttaa	tgtatcttaa	taactactat	aggaacaaag	gaagtggctt	4560
	taatgacctt	gaaggaattt	cttctggtga	tagcttttat	attatcaagt	aagagatact	4620
	atctcagttt	tgtataagca	agtctttttc	ctagtgtagg	agaaatgatt	ttccttgtga	4680
	ctaaacaaga	tgtaaaggta	tgtctttttt	cttcttgtgc	attgtatact	tgtgtttatt	4740
35	tgtaaacttat	aatttaagaa	ttatgataat	tcagcctgaa	tgtcttttag	agggtgggct	4800
	tttgtgatg	agggagggga	aacctttttt	tttctgtaga	cctttttcag	ataacacccat	4860
	ctgagtcata	accagcctgg	cagtgtgatg	acgtagatgc	agagggagca	gctccttggg	4920
	gaatgagtga	taagttaaagg	cagaaaaaat	aatgtcatgt	ctccatgggg	aatgagcatg	4980
	agccagagat	tgttcctact	gatgaaaaag	tgcataatgca	aaaatttaag	caaatgaaag	5040
40	caaccagat	aaagttatgg	caataccttt	aaagttatg	gcttatctac	cttcttttat	5100
	ccacaaaagt	aaagaattga	tgaaaaacag	tgaagatcaa	atgttcatct	caaaaactgct	5160
	ttacaaaaag	cagaatagaa	atgaagtga	aatgctgcat	taagcctgga	gtaaaaagaa	5220
	gctgagcttg	ttgagatgag	tgggatcgag	cggtgcgag	gcggtgcagt	gtgccaatgt	5280
	ttcgtttgcc	tcagacaggt	ttctcttcat	aagcagaaga	ggtgcttcat	tccatctcgg	5340
45	agcaggaaac	agcagactgc	tgttgacaga	taagtgtaac	ttggatctgc	agtattgcat	5400
	gttagggata	gataagtgcc	tttttctct	ttttccaaaa	agacctgtag	agctgttgaa	5460
	tgtttgcagc	tggccccctt	taggcagttc	agaattttga	gtagttttcc	catccagcct	5520
	cttaaaaatt	cctaagcctt	gcaccgatgg	gctttcatga	tgggatagct	aataggcttt	5580
	tgcacgtaaa	acttcaacac	aaaagcctac	atgattaatg	cctactttaa	ttacattgct	5640
50	tacaagatta	aggaatcttt	atcttgaaga	ccccatgaaa	gggatcatta	tgtgctgaaa	5700
	attagatggt	catattgcta	aaatttaaat	gtgctccaat	gtacttgtgc	ttaaatcat	5760
	taaattatac	aaattaataa	aatactcac	tagagaatgt	atgtatttag	aaggctgtct	5820
	ccttatttaa	ataaagtctt	gtttgtgtc	tgtagttagt	gtgggcaatt	ttggggggat	5880
	gttcttctct	aatcttttca	gaaacttgac	ttcgaacact	taagtggacc	agatcaggat	5940
55	ttgagccaga	agaccgaaat	taactttaag	gcaggaaaga	caaattttat	tctccatgca	6000
	gtgatgagca	tttaataaatt	gcaggctgg	catagggcc	gtctaactaa	ggactaagta	6060
	ccttaggcag	gtgggagatg	atggctcagag	taaaaggtaa	ctacatattt	gttttccaga	6120
	aagtcagggg	tctaatttga	ccatggctaa	acatctaggg	taagacactt	ttccccaca	6180
	tttccaaata	tgcattgttga	gtttaaatgc	ttacgatcat	ctcatccact	ttagcctttt	6240
60	gtcacctcac	ttgagccacg	agtgggtca	ggcatgtggg	tttaagagt	tttcttttgc	6300
	agagcctcat	ttcatccttc	atggagctgc	tcaggacttt	gcatataagc	gcttgcctct	6360
	gtcttctggt	ctgctagtga	gtgtgtgatg	tgagaccttg	cagtgagttt	gtttttctctg	6420
	gaatgtggag	ggaggggggg	atggggctta	cttgttctag	cttttttttt	acagaccaca	6480
65	cagaatgcag	gtgtcttgac	ttcaggtcat	gtctgttctt	tggcaagtaa	tatgtgcagt	6540

	actgttccaa	tctgctgcta	ttagaatgca	ttgtgacgcg	actggagtat	gattaaagaa	6600
	agttgtgttt	ccccaaagtgt	ttggagtagt	ggttgttggg	ggaaaagcca	tgagtaacag	6660
	gctgagtggt	gaggaaatgg	ctctctgcag	ctttaagtaa	cccgtgtttg	tgattggagc	6720
5	cgagtccctt	tgctgtgctg	ccttaggtaa	atgtttttgt	tcatttctgg	tgaggggggt	6780
	tgggagcact	gaagccttta	gtctcttcca	gattcaactt	aaaatctgac	aagaaataaa	6840
	tcagacaagc	aacattcttg	aagaaatfff	aactggcaag	tggaaatggt	ttgaacagtt	6900
	ccgtggctct	tagtgcatta	tctttgtgta	ggtgttctct	ctccccctcc	ttggtcttaa	6960
	ttcttacatg	caggaacatt	gacaacagca	gacatctatc	tattcaaggg	gccagagaa	7020
10	ccagaccag	taaggaaaa	tagcccattt	actttaaatc	gataagtga	gcagacatgc	7080
	cattttcagt	gtggggattg	ggaagcceta	gttctttcag	atgtacttca	gactgtagaa	7140
	ggagcttcca	gttgaattga	aattcaccag	tggacaaaat	gaggacaaca	ggtgaacgag	7200
	ccttttcttg	tttaagatta	gctactggta	atctagtgtt	gaatcctctc	cagcttcatg	7260
	ctggagcagc	tagcatgtga	tgtaatggtg	gccttggggg	ggaggggtga	ggtgggcgct	7320
15	aagccttttt	ttaagatfff	tcaggtaccc	ctcactaaag	gcactgaagg	cttaatgtag	7380
	gacagcggag	ccttcctgtg	tggcaagaat	caagcaagca	gtattgtatc	gagaccaaag	7440
	tggatcatg	gtcgggtttg	attagcagtg	gggactaccc	taccgtaaca	ccttgttggg	7500
	attgaagcat	caaagaaaa	tacttgagag	gccctgggct	tgttttaaca	tctggaaaaa	7560
20	aggctgtttt	tatagcagcg	gttaccagcc	caaacctcaa	gttgtgcttg	caggggaggg	7620
	aaaaggggga	aagcgggcaa	ccagtttccc	cagcttttcc	agaatcctgt	tacaaggtct	7680
	ccccacaagt	gatttctctg	ccacatcgcc	accatgggcc	tttggcctaa	tcacagaccc	7740
	ttcaccctc	accttgatgc	agccagtagc	tggatccttg	aggtcacggt	gcatatcggg	7800
	ttcaaggtaa	ccatggtgcc	aaggtcctgt	gggttgacc	agaaaaggcc	atcaatfttc	7860
25	cccttgccctg	taatttaaca	ttaaaacctat	agctaagatg	ttttatacat	agcacctatg	7920
	cagagtaaac	aaaccagtat	gggtatagta	tgtttgatac	cagtgtctgg	tgggaatgta	7980
	ggaagtccga	tgaaaagcaa	gcctttgtag	gaagttggtg	gggtgggatt	gcaaaaattc	8040
	tctgctaaga	ctttttcagg	tggacataac	agacttggcc	aagctagcat	cttagtgtaa	8100
30	gcagattcgt	cagtaggggt	gtaaagggtt	ttcttttct	gagaaaacaa	ccttttgttt	8160
	tctcaggttt	tgctttttgg	cctttcccta	gctttaaaaa	aaaaaaagca	aaagacgctg	8220
	gtggctggca	ctcctgggtt	ccaggacggg	gttcaagtcc	ctgcgggtgc	tttgcttgac	8280
	tcttataatca	tgaggccatt	acatttttct	tggagggttc	taaaggctct	gggtatggta	8340
	gctgatataca	ctggaacact	ccccagcctc	agtgttgaac	tcttgataat	taactgcatt	8400
35	gtctttcagg	ttatgcccac	ttcgtcttat	tacctctgag	tcgacacacc	tcctactatt	8460
	tattgaatac	tttgatttta	tgaataaaaa	actaaatata	tctcattgtg	tgcttctttg	8520
	tgataaaaa	acaggcctat	tttaagccta	aagagaccaa	atgtctgata	tacctcagct	8580
	tctccgatta	gtgaggcctt	ccctgtttcc	tgggctgca	tggtcttttc	atgcagatgg	8640
	ctctaaagtt	gggttgggt	cctaggtggc	cactcttgca	cctcaggaac	acaaggcctt	8700
40	tcctgctgt	tcaggctctc	ctccctgaga	aaacattctg	gattgtctat	gaggaagttg	8760
	ggaaaagatg	gtgtcgaaaa	gaggtggtgt	gcattgctcc	tctgttcccta	acactggatg	8820
	gaagactagt	tttcatgtag	tttagggaaa	tagttataca	tggctctaaag	gccccaaaaac	8880
	attcccagag	tgtatgcaat	actgtgtgta	agtgtgcaat	gcgtgtgttt	ggaggtcaga	8940
	acttctctga	ggttctagag	atgaagcaag	tcctcagcca	tggcccaaga	atgggaagga	9000
45	actgggtcct	gctgtaccac	ttcccattcc	ttaaggaaca	gtttggcccg	gtgtgggtgca	9060
	agcatggtcg	gtcactgaaa	aaagaaaacc	cacttaggtt	tcacaggctt	gaagagctgc	9120
	atgtcatcca	gcaaattact	ggctgctgta	aggacaggcc	cctaggtccc	agtcccaggt	9180
	gcccttctg	ccactcaatc	aagcettaca	ccctgggcaa	aaacatcctg	cgttgaaggt	9240
	tcagctccca	gggctgaaa	cttgtgctgg	catctacccc	agttcaaagg	ggctcagcac	9300
50	attgacaact	aaaactaagc	cctcaggtga	gcaaaaatggt	ctccttaagg	caatcatggg	9360
	cattggtggt	cctgcagtaa	aggacagcat	cacagctgat	gtctgtgtac	tggctagttt	9420
	tgtatcaact	tgacacagct	ggaattatca	cagagaaagc	ttcagttggg	gaagtgcctc	9480
	caagagatcc	tccacgagat	cctgctctaa	ggcattttct	caattagtga	tcagggggga	9540
55	aagaccctt	gtgtgtggga	ccatctctgg	gctggtagtc	ttggttcagt	tctataagag	9600
	agcaggctga	gcaagccagg	ggaagcaagc	cagtaagaa	catccctcca	tggcctctgc	9660
	atcagctcct	gcttccctgac	ctgcttgagt	tccagtcctg	acttccctgg	tgatgaacag	9720
	cagtatggaa	gtgtaagccg	aataaacctt	gtcctcccca	acttgcttct	tggtcatggt	9780
	tgtgcaggaa	tagaaacctt	gactaagaca	gtctgagacc	tgacagatct	gtgctaaagt	9840
60	ctggtagcaa	ctgagctaga	ccctgccaca	cacctcagta	atggccatt	ctgaattcac	9900
	ccagagctga	ggctttgccg	aggtgaggca	caaagacttc	actggagagc	aggagatag	9960
	aacagaggtt	ggggctcaca	cttctgatt	gggggccagg	a		10001

<210> 13
 65 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 13
 ccaggctggt tatgactcag 20

 10 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 14
 20 gggtcagctg ccaatgctag 20

 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 15
 30 cggcgcaagg ctaggaatt 20

 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 16
 40 ccttcctga aggtcctcc 20

 <210> 17
 <211> 23
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador
 50
 <400> 17
 tgggttagag aaggcgtgta ctg 23

 <210> 18
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador
 60
 <400> 18
 tcagcggcaa ctggaaa 18
 65 <210> 19

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

5 <220>
 <223> Sonda

<400> 19
 cgttggcacg acaccttcag ggact 25

10 <210> 20
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Cebador

<400> 20
 tcgccgcttg ctgca 15

<210> 21
 <211> 17
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador

30 <400> 21
 atcggccgtg atgtcga 17

<210> 22
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sonda

40 <400> 22
 ccatggtcaa ccccaccgtg ttc 23

<210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 23
 tcttatgttt ccgaaccgtt 20

55 <210> 24
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador

<400> 24
 gtaggtaag ttgacggccg tta 23

65

<210> 25
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5
<220>
<223> Cebador

<400> 25
10 atcttcctg ttccaactc atg 23

<210> 26
<211> 27
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda
20
<400> 26
aaaaatcctt cgactggcgc atgtacg 27

<210> 27
<211> 21
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador
30 <400> 27
aaagcaaggt ctcccacaa g 21

<210> 28
<211> 24
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador
40
<400> 28
tgaagggtct gtgctagatc aaaa 24

<210> 29
<211> 19
45 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
50 <223> Sonda

<400> 29
tgccacatcg ccaccccg 19
55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un oligonucleótido antisentido para su uso en un método para tratar un animal que tiene cáncer, en donde el cáncer es un cáncer primario, y en donde el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados que tiene una secuencia de nucleobases por lo menos un 85% complementaria al ácido nucleico Transcrito-1 de Adenocarcinoma en Pulmón Asociado a Metástasis (MALAT-1) y en donde el compuesto antisentido reduce la expresión de MALAT-1.
- 10 **2.** El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico de MALAT-1 es un ácido nucleico de MALAT-1 humano.
- 3.** El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el ácido nucleico de MALAT-1 humano tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1.
- 15 **4.** El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el oligonucleótido modificado es un 100% complementario a un ácido nucleico de MALAT-1 humano.
- 5.** El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el oligonucleótido antisentido inhibe el crecimiento del cáncer primario.
- 20 **6.** El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el cáncer primario es cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, o cáncer intestinal.
- 7.** El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido de cadena sencilla.
- 25 **8.** El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el oligonucleótido modificado comprende por lo menos un enlace internucleosídico modificado, opcionalmente en el que el enlace internucleosídico modificado es un enlace internucleosídico de fosforotioato.
- 30 **9.** El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que por lo menos un nucleósido del oligonucleótido modificado comprende un azúcar modificado.
- 10.** El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el azúcar modificado es un azúcar bicíclico, opcionalmente en el que el azúcar bicíclico comprende un puente 4'-CHCH₃-O-2', 4'-(CH₂)-O-2', o 4'-(CH₂)₂-O-2'.
- 35 **11.** El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el azúcar modificado comprende un grupo 2'-O-metoxietilo.
- 40 **12.** El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que por lo menos un nucleósido comprende una nucleobase modificada.
- 13.** El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la nucleobase modificada es una 5-metilcitosina.
- 45 **14.** El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el oligonucleótido modificado comprende:
- 50 un segmento de hueco que consiste de desoxinucleósidos unidos;
un segmento de ala 5' que consiste de nucleósidos unidos; y
un segmento de ala 3' que consiste de nucleósidos unidos, en el que el segmento de hueco está situado inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3' y en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado.
- 55
- 60
- 65