(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 709 495**

(51) Int. CI.:

C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2012 PCT/US2012/031642**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12135736**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012 E 12763390 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2697243**

(54) Título: **Modulación de la expresión del transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3)**

(30) Prioridad:

01.04.2011 US 201161471001 P
01.04.2011 US 201161471045 P
01.04.2011 US 201161471035 P
01.04.2011 US 201161471015 P
10.11.2011 US 201161558308 P
10.11.2011 US 201161558316 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2019

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

SWAYZE, ERIC E.;
FREIER, SUSAN M.;
MACLEOD, ROBERT A. y
KIM, YOUNGSOO

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

DESCRIPCIÓN

Modulación de la expresión del transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT)

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud se presenta junto con un Listado de Secuencias en formato electrónico. El Listado de Secuencias se provee como un archivo con el nombre BIOL0142WOSEQ.txt creado el 29 de marzo, 2012, cuyo tamaño es de 672 Kb.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

En determinadas formas de realización se proveen métodos, compuestos y composiciones para inhibir la expresión de ARNm y de proteínas STAT3 en un animal. Dichos métodos, compuestos y composiciones son de utilidad para tratar, prevenir o aliviar enfermedades hiperproliferativas.

ANTECEDENTES

La familia de proteínas STAT (transductores de señal y activadores de la transcripción) son proteínas de unión a ADN que cumple una doble función en la transducción de señal y la activación de la transcripción. Actualmente se conocen seis miembros distintos de la familia STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 y STAT6) y varias isoformas (STAT1α, STAT1β, STAT3 α y STAT3β). Las actividades de proteínas STAT son moduladas por diversas citoquinas y estímulos mitogénicos. La unión de una citoquina a su receptor da como resultado la activación de las proteínas tirosina quinasas Janus (JAKs) asociadas con estos receptores. Esto fosforila a la proteína STAT, lo cual conduce a la traslocación en el núcleo y la activación transcripcional de los genes que responden a STAT. La fosforilación de un residuo tirosina específico en las STAT da como resultado su activación, lo cual conduce a la formación de homodímeros y/o heterodímeros de STAT que se unen a secuencias promotoras de genes específicos. Los eventos mediados por citoquinas a través de la activación de STAT incluyen la proliferación y la diferenciación celular y la prevención de la apoptosis.

La especificidad de la activación de STAT se debe a citoquinas específicas, es decir, cada STAT responde a una pequeña cantidad de citoquinas específicas. También se ha encontrado que otras moléculas de señalización que no son citoquinas, tales como los factores de crecimiento, activan a las STAT. La unión de estos factores a un receptor de la superficie celular asociado con una proteína tirosina quinasa también da como resultado la fosforilación de STAT.

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

STAT3 se expresa en la mayoría de los tipos celulares (Zhong, Z., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 4806-4810). Induce la expresión de los genes relacionados con la respuesta a lesiones e inflamación de los tejidos. También se ha demostrado que STAT3 previene la apoptosis por la expresión de bcl-2 (Fukada, T., et al., *Immunity*, 1996, 5, 449-460).

Recientemente, se detectó STAT3 en las mitocondrias de células transformadas, y se demostró que facilita las actividades de fosforilación glucolítica y oxidativa similares a las de las células cancerosas (Gough, D.J., et al., *Science*, 2009, 324, 1713-1716). La inhibición de STAT3 en las mitocondrias perjudicó la transformación maligna por el Ras activado. Los datos confirman la existencia de una función de transformación mediada por Ras para la STAT3 en las mitocondrias además de sus funciones nucleares.

La expresión aberrante o la expresión constitutiva de STAT3 está asociada con numerosos procesos de enfermedad.

La Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2005/0196781 enseña pequeñas moléculas de ácido nucleico, tales como moléculas de ARNip de doble cadena, que modulan la expresión del gen STAT3. El documento WO 2005/083124 enseña oligonucleótidos antisentido que modulan el gen STAT3.

RESUMEN

En la presente se proveen métodos, compuestos y composiciones para modular la expresión de ARNm y proteínas STAT3. En determinadas formas de realización, los compuestos que son de utilidad para modular la expresión de ARNm y proteínas STAT3 son compuestos antisentido. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido son oligonucleótidos antisentido.

En determinadas formas de realización, la modulación puede tener lugar en una célula o en un tejido. En

determinadas formas de realización, la célula o el tejido es de un animal. En determinadas realizaciones, el animal es un ser humano. En determinadas formas de realización, se reducen los niveles de ARNm de STAT3. En determinadas formas de realización, se reducen los niveles de proteína STAT3. Dicha reducción se puede producir de una manera dependiente del tiempo o de una manera dependiente de la dosis.

También se proveen métodos, compuestos y composiciones de utilidad para prevenir, tratar y aliviar enfermedades, trastornos y condiciones. En determinadas formas de realización, dichas enfermedades, trastornos y condiciones son enfermedades, trastornos y condiciones hiperproliferativas. En determinadas formas de realización dichas enfermedades, trastornos y condiciones hiperproliferativas incluyen cáncer, así como formas malignas asociadas y metástasis. En determinadas formas de realización, dichos cánceres incluyen cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, mieloma múltiple, carcinoma hepatocelular (HCC), glioblastoma, cáncer de ovario, osteosarcoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, carcinomas epidermoides, adenomas intestinales, cáncer de próstata y cáncer gástrico.

Dichas enfermedades, trastornos y condiciones pueden tener uno o más factores de riesgo, causas o resultados en común. Algunos factores de riesgo y causas del desarrollo de una enfermedad hiperproliferativa incluyen el envejecimiento; el uso de tabaco; la exposición a la luz solar y a la radiación ionizante; el contacto con determinadas sustancias químicas; la infección con determinados virus y bacterias; determinadas terapias hormonales; antecedentes familiares de cáncer; uso de alcohol; y determinadas elecciones de estilo de vida incluyendo una dieta pobre, falta de actividad física y/o el sobrepeso. Algunos de los síntomas y los resultados asociados con el desarrollo de una enfermedad hiperproliferativa incluyen un engrosamiento o bulto en la mama o en cualquier otra parte del cuerpo; un lunar nuevo o un cambio en un lunar existente; una llaga que no se cura; ronquera o una tos que persiste; cambios en los hábitos intestinales o de vejiga; malestar después de comer; dificultad para tratar; aumento o pérdida de peso sin explicación; sangrado o descarga inusual; fatiga; metástasis de uno o más tumores por todo el cuerpo; complicaciones cardiovasculares, incluyendo, paro cardíaco y accidente cerebrovascular; y muerte.

En determinadas formas de realización, los métodos de tratamiento incluyen administrar un compuesto antisentido STAT3 a un individuo que lo necesita. En determinadas formas de realización, los métodos de tratamiento incluyen administrar un Oligonucleótido antisentido STAT3 a un individuo que lo necesita.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se debe tener en cuenta que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada solamente se ofrecen a modo de ejemplo y a efectos de una mayor explicación y no restringe la invención reivindicada. En la presente, el uso del singular incluye al plural a menos que específicamente se determine de otra manera. Según se usa en la presente, el uso de “o” significa “y/o” a menos que se defina de otra manera. Aún más, el uso del término “incluyendo”, así como otras formas, tales como “incluye” e “incluido”, no es limitativo. Además, los términos tales como “elemento” o “componente” abarcan los elementos y los componentes que constituyen una unidad, y los elementos y los componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Los encabezados de sección utilizados en la presente solamente sirven a efectos de una mejor organización y no deben considerarse como limitativos del objeto descrito.

DEFINICIONES

A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura relativa utilizada y los procedimientos y las técnicas de laboratorio, química analítica, química orgánica de síntesis y química medicinal y farmacéutica descritos en la presente son bien conocidos y de uso común en el arte. Se pueden emplear técnicas estándar para las síntesis químicas y los análisis químicos.

A menos que se indique de otra manera, los siguientes términos tienen el significado que se indica a continuación:

Un “2’-desoxinucleósido” se refiere a un nucleósido que comprende un grupo de azúcar furanosilo 2’-H, como en los desoxirribonucleósidos (ADN) naturales. En determinadas formas de realización, un 2’-desoxinucleósido puede comprender una nucleobase modificada o puede comprender una nucleobase de ARN (por ejemplo, uracilo).

Un “2’-O-metoxietilo” (también denominado 2’-MOE y 2’-O$(CH_2)_2$-OCH_3) se refiere a una modificación O-metoxi-etilo de la posición 2’ de un anillo furosilo. Un azúcar modificado 2’-O-metoxietilo es un azúcar modificado.

Un “nucleósido 2’-MOE” (también denominado 2’-O-metoxinucleósido de etilo) se refiere a un nucleósido que comprende un grupo de azúcar modificado 2’-MOE.

Un “nucleósido 2’-sustituido” se refiere a un nucleósido que comprende un sustituyente en la posición 2’ distinto

de H u OH. A menos que se indique de otra manera, un nucleósido 2'-sustituido no es un nucleósido bicíclico.

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

"Aproximadamente" significa dentro de ±10% de un valor. Por ejemplo, si se establece que "los compuestos produjeron por lo menos un 70% aproximadamente de inhibición de STAT3", implica que los niveles de STAT3 son inhibidos en un rango de entre un 63% y un 77%.

Un "agente farmacéutico activo" se refiere a la sustancia o sustancias presentes en una composición farmacéutica que proveen un beneficio terapéutico cuando se administran a un individuo. Por ejemplo, en determinadas formas de realización un oligonucleótido antisentido dirigido a STAT3 es un agente farmacéutico activo.

Una "región blanco activa" o una "región blanco" se refiere a la región a la cual serán dirigidos uno o más compuestos antisentido activos. Los "compuestos antisentido activos" se refieren a los compuestos antisentido que reducen los niveles de ácido nucleico blanco o los niveles de proteína blanco.

"Administrado de manera concomitante" se refiere a la co-administración de dos agentes de cualquier manera que permita que se manifiesten los efectos farmacológicos de ambos en el paciente al mismo tiempo. La administración concomitante no requiere que ambos agentes sean administrados en una sola composición farmacéutica, en la misma forma de dosificación o por la misma ruta de administración. No es necesario que ambos agentes manifiesten sus efectos al mismo tiempo. Los efectos solamente deben solaparse por un período de tiempo y no es necesario que sean co-extensivos.

La "administración" se refiere a suministrar un agente farmacéutico a un individuo, e incluye, pero en un sentido no taxativo, una administración realizada por un profesional médico y una auto-administración.

Una "mejora" se refiere a la disminución de por lo menos un indicador, signo o síntoma de una enfermedad, trastorno o condición asociada. La severidad de los indicadores se puede determinar mediante medidas subjetivas u objetivas, que son conocidas por los especialistas en el arte.

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

Un "anticuerpo" se refiere a una molécula caracterizada porque reacciona de alguna manera específica con un antígeno, donde el anticuerpo y el antígeno se definen el uno en términos del otro. Un anticuerpo puede hacer referencia a una molécula de anticuerpo completa o a cualquier fragmento o región de la misma, tal como la cadena pesada, la cadena liviana, una región Fab y una región Fc.

La "actividad antisentido" se refiere a cualquier actividad detectable o mensurable que puede ser atribuible a la hibridación de un compuesto antisentido con su ácido nucleico blanco. En determinadas formas de realización, la actividad antisentido es una disminución en la cantidad o la expresión de un ácido nucleico blanco o de una proteína codificada por dicho ácido nucleico blanco.

Un "compuesto antisentido" se refiere a un compuesto oligomérico capaz de hibridizarse con un ácido nucleico blanco por puentes hidrógeno. Los ejemplos de compuestos antisentido incluyen compuestos de cadena simple y de cadena doble, tales como, oligonucleótidos antisentido, ARNsi, ARNsh, ARNsno, ARNmi y repeticiones de satélites.

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

Un "oligonucleótido antisentido" se refiere a un oligonucleótido de cadena simple que tiene una secuencia de nucleobases que permite la hibridación con una correspondiente región o segmento de un ácido nucleico blanco.

Un "azúcar bicíclico" se refiere a un anillo furosilo modificado por formación de un puente de dos átomos. Un azúcar bicíclico es un azúcar modificado.

Un "nucleósido bicíclico" (también denominado BNA) se refiere a un nucleósido que tiene un grupo de azúcar que comprende un puente que une a dos átomos de carbono del anillo de azúcar, formando de esa manera un sistema de anillos bicíclico. En determinadas formas de realización, el puente une el carbono 4' y el carbono 2' del anillo de azúcar.

La "estructura protectora" o el "grupo protector terminal" se refiere a modificaciones químicas que se han incorporado a cualquiera de los extremos de un compuesto antisentido.

Un “cEt” o “etilo restringido” se refiere a un nucleósido bicíclico que tiene un grupo de azúcar que comprende un puente que une al carbono 4’ y el carbono 2’, donde dicho puente presenta la fórmula: 4’-CH(CH_3)-O-2’.

Un “nucleósido de etilo restringido” (también denominado nucleósido cEt) se refiere a un nucleósido que comprende un grupo de azúcar bicíclico que comprende un puente 4’-CH(CH_3)-O-2’.

Una “región químicamente distinta” se refiere a una región de un compuesto antisentido que de alguna manera es químicamente diferente de otra región del mismo compuesto antisentido. Por ejemplo, una región que contiene nucleótidos 2’-O-metoxietilo es químicamente distinta de una región que contiene nucleótidos sin las modificaciones 2’-O-metoxietilo.

Un “compuesto antisentido quimérico” se refiere a un compuesto antisentido que presenta por lo menos dos regiones químicamente distintas.

Una “co-administración” se refiere a la administración de dos o más agentes farmacéuticos a un individuo. Dichos dos o más agentes farmacéuticos se pueden encontrar en una sola composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas. Cada uno de dichos dos o más agentes farmacéuticos se puede administrar por la misma ruta de administración o por rutas o diferentes. La co-administración abarca una administración paralela o sucesiva.

La “complementariedad” se refiere a la capacidad de apareamiento entre nucleobases de un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico.

Las “nucleobases contiguas” se refieren a las nucleobases que son inmediatamente adyacentes entre sí.

Un “diluyente” se refiere a un ingrediente en una composición que carece de actividad farmacológica, pero que resulta farmacéuticamente necesario o deseable. Por ejemplo, el diluyente en una composición inyectable puede ser un líquido, por ejemplo una solución salina.

Una “dosis” se refiere a una cantidad especificada de un agente farmacéutico suministrada en una sola administración o en período de tiempo específico. En determinadas formas de realización, la dosis se puede administrar en uno, dos, o más bolos, tabletas o inyecciones. Por ejemplo, en determinadas formas de realización donde se desea una administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen que no se consigue fácilmente con una sola inyección, por ello, se pueden emplear dos o más inyecciones para alcanzar la dosis deseada. En determinadas formas de realización, el agente farmacéutico se administra por infusión sobre un período de tiempo extendido o de manera continua. Las dosis se pueden establecer como la cantidad de agente farmacéutico por hora, día, semana o mes.

Una “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de agente farmacéutico activo que es suficiente para lograr un resultado fisiológico deseado en un individuo que necesita del agente. La cantidad eficaz puede variar entre individuos dependiendo de la salud y condición física del individuo que será tratado, del grupo taxonómico de los individuos que serán tratados, de la formulación de la composición, de la evaluación de la condición médica del individuo y otros factores relevantes.

“Completamente complementario” o “100% complementario” se refiere a que cada nucleobase de un primer ácido nucleico tiene una nucleobase complementaria en un segundo ácido nucleico. En determinadas formas de realización, el primer ácido nucleico es un compuesto antisentido y el ácido nucleico blanco es un segundo ácido nucleico.

Un “gápmero” se refiere a un compuesto antisentido quimérico en el cual hay una región interna que tiene una pluralidad de nucleósidos que soportan el clivaje con la RNasa H ubicada entre regiones externas que tienen uno o más nucleósidos, en donde los nucleósidos que comprenden a la región interna son químicamente distintos del nucleósido o de los nucleósidos que comprenden a las regiones externas. La región interna se denomina “hueco [*gap*]” y las regiones externas se denominan “extensiones [*wings*]”.

El término “de hueco ampliado [*gap-widened*]” se refiere a un compuesto antisentido quimérico que tiene un segmento hueco de 12 o más 2’-desoxirribonucleósidos contiguos ubicados entre y de manea inmediatamente adyacente a segmentos de extensión 5’ y 3’ que tienen entre uno y seis nucleósidos.

La “hibridación” se refiere al apareamiento de moléculas de ácido nucleico complementarias. En determinadas formas de realización, las moléculas de ácido nucleico complementarias incluyen un compuesto antisentido y un ácido nucleico blanco.

Una “enfermedad hiperproliferativa” se refiere a una enfermedad caracterizada por un crecimiento y una reproducción rápida o excesiva de células. Los ejemplos de enfermedades hiperproliferativas incluyen cáncer, por ejemplo, carcinomas, sarcomas, linfomas y leucemias, así como metástasis y formas malignas asociadas.

La “identificación de un animal con riesgo de sufrir una enfermedad hiperproliferativa” se refiere a la identificación de un animal que ha sido diagnosticado con una enfermedad hiperproliferativa o a la identificación de un animal

que tiene predisposición para desarrollar una enfermedad hiperproliferativa. Los individuos con predisposición para desarrollar una enfermedad hiperproliferativa incluyen aquellos que tienen uno o más factores de riesgo para dicha enfermedad hiperproliferativa incluyendo edad avanzada; antecedente de otras enfermedades hiperproliferativas; antecedente de tabaquismo; antecedente de exposición a la luz solar y/o a la radiación ionizante; contacto previo con determinados sustancias químicas, en especial un contacto continuo; infección previa o actual con determinados virus y bacterias; uso previo o actual de determinadas terapias hormonales; predisposición genética; uso de alcohol; y determinadas elecciones de estilo de vida incluyendo una dieta pobre, falta de actividad física y/o sobrepeso. Dicha identificación puede realizarse mediante cualquier método incluyendo la evaluación de la historia médica de un individuo y pruebas o evaluaciones clínicas estándar.

“Inmediatamente adyacente” se refiere a que no hay elementos intervinientes entre elementos inmediatamente adyacentes.

La “inhibición de STAT3” se refiere a una reducción en la expresión de los niveles de ARNm y/o de proteína STAT3 en la presencia de un compuesto antisentido de STAT3, incluyendo un oligonucleótido antisentido de STAT3, en comparación con la expresión de niveles de ARNm y/o de proteína STAT3 en la ausencia de un compuesto antisentido STAT3, tal como un oligonucleótido antisentido.

Un “individuo” se refiere a un animal humano o no humano seleccionado para un tratamiento o una terapia.

Un “enlace internucleosídico” se refiere a la unión química entre nucleósidos.

Los “nucleósidos unidos” se refieren a nucleósidos adyacentes que están unidos entre sí.

Una “coincidencia errónea” o una “nucleobase no complementaria” se refiere al caso cuando la nucleobase de un primer ácido nucleico no se puede aparear con la correspondiente nucleobase de un segundo ácido nucleico o ácido nucleico blanco.

Un “enlace internucleosídico modificado” se refiere a la sustitución o a cualquier cambio con respecto a un enlace internucleósido natural (es decir un enlace internucleósido fosfodiéster).

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

Un “nucleótido modificado” se refiere a un nucleótido que presenta, de manera independiente, un grupo de azúcar modificado, un enlace internucleosídico modificado o una nucleobase modificada. Un “nucleósido modificado” se refiere a un nucleósido que presenta, de manera independiente, un grupo de azúcar modificado o una nucleobase modificada.

Un “oligonucleótido modificado” se refiere a un oligonucleótido que comprende un enlace internucleosídico modificado, un azúcar modificado y/o una nucleobase modificada.

Un “azúcar modificado” se refiere a una sustitución o un cambio con respecto al azúcar natural.

Un “motivo” se refiere al patrón de regiones químicamente distintas en un compuesto antisentido.

Un “enlace internucleosídico natural” se refiere a un enlace fosfodiéster 3' a 5'.

Un “grupo de azúcar natural” se refiere a un azúcar presente en el ADN (2’-H) o en el ARN (2’-OH).

Un “ácido nucleico” se refiere a moléculas compuestas por nucleótidos monoméricos. Un ácido nucleico incluye ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos nucleicos de cadena simple, ácidos nucleicos de cadena doble, ácidos ribonucleicos de interferencia pequeños (ARNsi) y microARN (ARNmi).

Una “nucleobase” se refiere a un grupo heterocíclico capaz de aparearse con una base de otro ácido nucleico.

Una “secuencia de nucleobases” se refiere al orden de nucleobases contiguas independiente de cualquier modificación del azúcar, del enlace o de la nucleobase.

Un “nucleósido” se refiere a una nucleobase unida a un azúcar.

Un "nucleósido mimético" incluye aquellas estructuras usadas para reemplazar al azúcar o bien al azúcar y a la base y no necesariamente al enlace en una o más posiciones de un compuesto oligomérico tal como, por ejemplo, nucleósido miméticos que contienen miméticos del azúcar de morfolino, ciclohexenilo, ciclohexilo, tetrahidropiranilo, biciclo o triciclo, por ejemplo, unidades de azúcares no furanosa. Un nucleótido mimético incluye aquellas estructuras usadas para reemplazar el nucleósido y el enlace en una o más posiciones de un compuesto oligomérico tal como por ejemplo ácidos nucleicos peptídicos o morfolinos (morfolinos unidos por -N(H)-C(=O)-O- u otro enlace no fosfodiéster). Un sustito de azúcar se superpone con el término ligeramente más

amplio, nucleósido mimético, pero pretende indicar el reemplazo de la unidad de azúcar (anillo furanosa) solamente. Los anillos tetrahidropiranilo provistos en la presente son ilustrativos de ejemplos de sustitutos del azúcar en donde el grupo de azúcar furanosa ha sido reemplazado por un sistema de anillos de tetrahidropiranilo.

Un “nucleótido” se refiere a un nucleósido que tiene un grupo fosfato unido de manera covalente a la porción de azúcar del nucleósido.

Un “efecto fuera del blanco” se refiere a un efecto biológico indeseado o perjudicial asociado con la modulación de la expresión de ARN o de proteína de un gen distinto del ácido nucleico blanco pretendido.

Un “compuesto oligomérico” u “oligómero” se refiere a un polímero de subunidades monoméricas unidas que tiene la capacidad para hibridizarse con por lo menos una región de una molécula de ácido nucleico.

Un “oligonucleótido” se refiere a un polímero de nucleósidos unidos cada uno de los cuales puede estar modificado o no modificado, de manera independiente entre sí.

Una “administración parenteral” se refiere a una administración por inyección (por ejemplo, inyección de bolo) o por infusión. La administración parenteral incluye una administración subcutánea, una administración intravenosa, una administración intramuscular, una administración intraarterial, una administración intraperitoneal o una administración intracraneal, por ejemplo, una administración intratecal o intracerebroventricular.

Un “péptido” se refiere a una molécula formada por unión de al menos dos aminoácidos por medio de enlaces amida. Un péptido se refiere a polipéptidos y proteínas.

Una “composición farmacéutica” se refiere a una mezcla de sustancias adecuadas para su administración a un individuo. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender uno o más agentes farmacéuticos activos y una solución acuosa estéril. En determinadas formas de realización, la composición farmacéutica tiene actividad en un ensayo de captación libre en determinadas líneas celulares.

Un “derivado farmacéuticamente aceptable” abarca sales, conjugados, prodrogas o isómeros farmacéuticamente aceptables de los compuestos que se describen en la presente.

Las “sales farmacéuticamente aceptables” se refieren a sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de compuestos antisentido, es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del oligonucleótido parental y que no imparten efectos toxicológicos indeseados al mismo.

Un “enlace fosforotioato” se refiere a un enlace entre nucleósidos donde el enlace fosfodiéster está modificado por reemplazo de uno de los átomos de oxígeno que no forman puente con un átomo de azufre. Un enlace fosforotioato (P=S) es un enlace internucleosídico modificado.

Una “porción” se refiere a un número definido de nucleobases contiguos (es decir, unidos) de un ácido nucleico. En determinadas formas de realización, una porción es un número definido de nucleobases contiguas de un ácido nucleico blanco. En determinadas formas de realización, una porción es un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido.

El término “prevenir” se refiere a demorar o anticipar el comienzo o desarrollo de una enfermedad, trastorno o condición por un período de tiempo desde minutos hasta indefinidamente. Prevenir también se refiere a reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o condición.

Una “prodroga” se refiere a un terapéutico agente que se prepara en una forma inactiva que es convertida en una forma activa dentro del cuerpo o de células del mismo por la acción de enzimas endógenas u otras sustancias químicas o condiciones.

Los “efectos secundarios” se refieren a respuestas fisiológicas atribuibles a un tratamiento que son distintas de los efectos deseados. En determinadas formas de realización, los efectos secundarios incluyen reacciones en el sitio de inyección, anomalías en pruebas de la función hepática, anomalías en la función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anomalías del sistema nervioso central, miopatías y malestar. Por ejemplo, los niveles incrementados de aminotransferasa en suero pueden indicar toxicidad hepática o una anomalía en la función hepática. Por ejemplo, los niveles incrementados de bilirrubina en suero pueden indicar toxicidad hepática o una anomalía en la función hepática.

Un “ácido nucleico del transductor de señales y activador de la transcripción 3” o “ácido nucleico STAT3” se refiere a cualquier ácido nucleico que codifica STAT3. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, un ácido nucleico STAT3 incluye una secuencia de ADN que codifica STAT3, una secuencia de ARN transcrita a partir de un ADN que codifica STAT3 (incluyendo ADN genómico que comprende intrones y exones) y una secuencia de ARNm que codifica STAT3. Un “ARNm STAT3” se refiere a un ARNm que codifica una proteína STAT3.

Un “oligonucleótido de cadena simple” se refiere a un oligonucleótido que no se hibridiza con una cadena

complementaria.

El término “que se hibridiza específicamente” se refiere a un compuesto antisentido que presenta un grado de complementariedad suficiente entre un oligonucleótido antisentido y un ácido nucleico blanco como para inducir un efecto deseado, al mismo tiempo que exhibe un efecto mínimo o ningún efecto sobre los ácidos nucleicos que no son blancos bajo las condiciones a las cuales se desea una unión específica, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* y tratamientos terapéuticos.

Los términos “buscar como blanco” o “buscado como blanco” se refiere al proceso de diseño y selección de un compuesto antisentido que se hibridizará específicamente con un ácido nucleico blanco e inducirá un efecto deseado.

Un “ácido nucleico blanco”, un “ARN blanco”, un “ARNm blanco” y un “transcripto de ARN blanco” se refieren todos a un ácido nucleico capaz de ser buscado como blanco por compuestos antisentido.

Un “segmento blanco” se refiere a la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico blanco que un compuesto antisentido buscará como blanco. Un “sitio blanco 5’” se refiere al nucleótido más 5’ de un segmento blanco. Un “sitio blanco 3’” se refiere al nucleótido más 3’ de un segmento blanco.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de un agente farmacéutico que provee un beneficio terapéutico a un individuo.

“Tratar” se refiere a la administración de una composición farmacéutica para efectuar una alteración o mejora de una enfermedad, trastorno o condición.

Un “nucleótido no modificado” se refiere a un nucleótido compuesto por nucleobases, grupos de azúcar y enlaces internucleosídicos naturales. En determinadas formas de realización, un nucleótido no modificado es un nucleótido de ARN (es decir, β-D-ribonucleósidos) o un nucleótido de ADN (es decir, β-D-desoxirribonucleósidos).

ALGUNAS FORMAS DE REALIZACIÓN

En determinadas formas de realización se proveen métodos, compuestos, y composiciones para inhibir la expresión del ARNm o de la proteína STAT3.

En determinadas formas de realización se proveen métodos para prevenir el crecimiento tumoral y el volumen del tumor. En determinadas formas de realización se proveen métodos para reducir el crecimiento tumoral y el volumen del tumor.

En determinadas formas de realización se proveen métodos, compuestos y composiciones para el tratamiento, la prevención o el alivio de enfermedades, trastornos y condiciones asociadas con STAT3 en un individuo que lo necesita. También se contemplan métodos y compuestos para la preparación de un medicamento para el tratamiento, la prevención o el alivio de una enfermedad, trastorno o condición asociada con STAT3. Las enfermedades, los trastornos y las condiciones asociadas con STAT3 incluyen enfermedades hiperproliferativas, por ejemplo, cáncer, carcinomas, sarcomas, linfomas y leucemias, así como metástasis y formas malignas asociadas.

En determinadas formas de realización, se proveen compuestos antisentido STAT3 para su uso en el tratamiento, la prevención o el alivio de una enfermedad asociada con STAT3. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido STAT3 son oligonucleótidos antisentido STAT3, capaces de inhibir la expresión de ARNm STAT3 y/o proteína STAT3 en una célula, un tejido o un animal.

En determinadas formas de realización, se provee un compuesto antisentido STAT3 descrito en la presente para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, mieloma múltiple, carcinoma hepatocelular (HCC), glioblastoma, cáncer de ovario, osteosarcoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, carcinomas epidermoides, adenomas intestinales, cáncer de próstata y cáncer gástrico.

En determinadas formas de realización se provee un compuesto antisentido STAT3 descrito en la presente para su uso en el tratamiento o la prevención de metástasis de un cáncer.

En determinadas formas de realización se provee un compuesto antisentido STAT3, descrito en la presente, para su uso en el tratamiento, la prevención o el alivio de enfermedades hiperproliferativas, por ejemplo, cáncer, carcinomas, sarcomas, linfomas y leucemias, así como metástasis y formas malignas asociadas.

En la presente se revelan compuestos antisentido que buscan como blanco a un ácido nucleico STAT3. Según se revela en la presente, el ácido nucleico STAT3 es cualquiera de las secuencias descritas en GENBANK, Acceso N° NM_139276.2 (incorporado en la presente como la SEQ ID N° 1) o el complemento de GENBANK, Acceso N° NT_010755.14 truncado entre los nucleótidos 4185000 y 4264000 (incorporado en la presente como la SEQ ID N°: 2).

En la presente se revelan compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado que consiste en entre 12 y 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende una porción de al menos 12 nucleobases contiguas complementarias de una porción de SEQ ID Nº 1 con una longitud idéntica que abarca las nucleobases 3016-3031, por lo que dicha secuencia de nucleobases efectivamente es complementaria de SEQ ID Nº 1.

En determinadas formas de realización, se provee un compuesto monocatenario que comprende un oligonucleótido monocatenario modificado que consiste en 16 nucleósidos unidos que tienen una secuencia de nucleobases que consiste en la SEQ ID NO: 245, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el oligonucleótido modificado comprende:

una extensión 5' que consiste en 3 nucleósidos unidos;

una extensión 3' que consiste en 3 nucleósidos unidos;

un hueco entre la una extensión 5' y la extensión 3' que consiste en 10 2'-desoxinucleósidos unidos; en donde cada nucleósido de cada una de la extensión 5' y la extensión 3' comprende un nucleósido de etilo restringido; en donde cada unión internucleósido es una unión fosforotioato; y

en donde cada citosina es una 5-metilcitosina.

En determinadas formas de realización, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido modificado consiste en la secuencia que se representa en SEQ ID Nº 245.

Según se revela en la presente, el oligonucleótido modificado es 100% complementario de SEQ ID Nº 1 ó 2.

En determinadas formas de realización, el oligonucleótido modificado consiste en un oligonucleótido modificado de cadena simple.

En determinadas formas de realización, el oligonucleótido modificado comprende al menos un enlace modificado entre los nucleósidos.

En determinadas formas de realización, los enlaces entre todos los nucleósidos son enlaces de fosforotioato.

En determinadas formas de realización, al menos un nucleósido comprende un azúcar modificado.

En determinadas formas de realización, al menos uno de los azúcares modificados es un azúcar bicíclico.

En determinadas formas de realización, el azúcar bicíclico comprende un enlace 4'-CH_2-O-2'.

En determinadas formas de realización, el azúcar bicíclico comprende un enlace 4'-$CH(CH_3)$-O-2'.

En determinadas formas de realización, el azúcar modificado comprende un grupo 2'-O$(CH_2)_2$-OCH_3.

En determinadas formas de realización, el azúcar modificado comprende un grupo 2'-O-CH_3.

En determinadas formas de realización, al menos uno de los nucleósidos del oligonucleótido modificado comprende una nucleobase modificada.

En determinadas formas de realización, la nucleobase modificada es una 5-metilcitosina.

En determinadas formas de realización, el oligonucleótido modificado comprende

una saliente en el extremo 5' que consiste en 3 nucleósidos unidos;

una saliente en el extremo 3' que consiste en 3 nucleósidos unidos;

una porción entre la saliente en el extremo 5' y la saliente en el extremo 3' que consiste en 10 2'-deosxinucleósidos unidos;

donde todos los nucleósidos de la saliente en el extremo 5' y de la saliente en el extremo 3' comprenden etil nucleósidos restringidos;

donde los enlaces entre todos los nucleósidos son enlaces de fosforotioato; y

donde todas las citosinas son 5-metilcitosinas.

En la presente se revelan métodos para tratar una enfermedad hiperproliferativa en un animal que lo necesita, que comprenden administrarle al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que

consiste en entre 12 y 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 12 nucleobases contiguas de cualquiera de las secuencias de nucleobases que se detallan en SEQ ID Nº 9-426, 430-442, 445-464, 471-498, 500-1034, 1036-1512 ó 1541-2757.

En determinadas formas de realización, se proveen métodos para tratar una enfermedad hiperproliferativa en un animal que lo necesita, que comprenden administrarle al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en entre 12 y 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 12 nucleobases contiguas de SEQ ID Nº 245.

En determinadas formas de realización, la administración es útil para disminuir el tamaño de los tumores en el animal.

En determinadas formas de realización, la administración es útil para disminuir el volumen de los tumores en el animal.

En determinadas formas de realización, la administración es útil para prevenir las metástasis en el animal.

En determinadas formas de realización, la administración es útil para prolongar la supervivencia del animal.

En determinadas formas de realización, la administración es útil para disminuir la caquexia en el animal.

Determinadas formas de realización proveen un compuesto monocatenario que comprende un oligonucleótido monocatenario modificado que consiste en 16 nucleósidos unidos que tienen una secuencia de nucleobases que consiste en la SEQ ID NO: 245, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el oligonucleótido modificado comprende:

una extensión 5' que consiste en 3 nucleósidos unidos;

una extensión 3' que consiste en 3 nucleósidos unidos;

un hueco entre la extensión 5' y la extensión 3' que consiste en 10 2'-desoxinucleósidos unidos;

en donde cada nucleósido de cada una de la extensión 5' y la extensión 3' comprende un nucleósido de etilo restringido;

en donde cada unión internucleósido es una unión fosforotioato; y

en donde cada citosina es una 5-metilcitosina para uso en un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa en un animal.

COMPUESTOS ANTISENTIDO

Los compuestos oligoméricos incluyen, pero en un sentido no taxativo, oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, oligonucleótido miméticos, compuestos antisentido, oligonucleótidos antisentido y ARNsi. Un compuesto oligomérico puede ser “antisentido” para un ácido nucleico blanco, lo cual significa que tiene la capacidad para hibridizarse con un ácido nucleico blanco por medio de puentes de hidrógeno.

En determinadas formas de realización, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobases que, cuando se escribe en la dirección 5’ a 3’, comprende el complemento inverso del segmento blanco del ácido nucleico blanco que busca como blanco. En algunas de dichas formas de realización, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que, cuando se escribe en la dirección 5’ a 3’, comprende el complemento inverso del segmento blanco del ácido nucleico blanco que busca como blanco.

En la presente se revela un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico STAT3 que tiene una longitud de 12 a 30 subunidades. En la presente se revela un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico STAT3 que tiene una longitud de 14 a 30 subunidades. En la presente se revela un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico STAT3 que tiene una longitud de 12 a 22 subunidades. En otras palabras, tales compuestos antisentido son de 12 a 30 subunidades unidas, 14 a 30 subunidades unidas, o 12 a 22 subunidades unidas, respectivamente. En la presente se revela el compuesto antisentido de que es de 8 a 80, de 12 a 50, de 13 a 30, de 13 a 50, de 14 a 30, de 14 a 50, de 15 a 30, de 15 a 50, de 16 a 30, de 16 a 50, de 17 a 30 , 17 a 50, 18 a 22, 18 a 24, 18 a 30, 18 a 50, 19 a 22, 19 a 30, 19 a 50, o 20 a 30 subunidades unidas. En la presente se revelan los compuestos antisentido que 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, o 80 subunidades unidas en longitud, o un rango definido por cualquiera de dos valores anteriores. En la presente se revela el compuesto antisentido que es un oligonucleótido antisentido, y las subunidades unidas son nucleótidos.

En determinadas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a un ácido nucleico STAT3 pueden ser más cortos o pueden estar truncados. Por ejemplo, se puede eliminar una sola subunidad del extremo 5’ (truncamiento 5’) o, como alternativa, del extremo 3’ (truncamiento 3’). A un compuesto antisentido

más corto o truncado dirigido a un ácido nucleico STAT3 se le puede eliminar dos subunidades del extremo 5' o, como alternativa, se le puede eliminar dos subunidades del extremo 3', del compuesto antisentido. Como alternativa, los nucleósidos eliminados pueden estar dispersos por todo el compuesto antisentido, por ejemplo, en un compuesto antisentido con un nucleósido eliminado del extremo 5' y un nucleósido eliminado del extremo 3'.

Cuando hay una sola subunidad adicional en un compuesto antisentido alargado, la subunidad adicional se puede ubicar por el extremo 5' o el extremo 3' del compuesto antisentido. Cuando hay dos o más subunidades adicionales, dichas subunidades agregadas pueden ser adyacentes entre sí, por ejemplo, en un compuesto antisentido al que se le agregaron dos subunidades por el extremo 5' (adición 5') o, como alternativa, por el extremo 3' (adición 3'), del compuesto antisentido. Como alternativa, las subunidades agregadas pueden estar dispersas por todo el compuesto antisentido, por ejemplo, en un compuesto antisentido con una subunidad agregada al extremo 5' y una subunidad agregada al extremo 3'.

Se puede aumentar o disminuir la longitud de un compuesto antisentido, tal como un oligonucleótido antisentido, y/o se pueden introducir bases de coincidencia errónea sin eliminar la actividad. Por ejemplo, en Woolf et al., (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7305-7309, 1992), se evaluó una serie de oligonucleótidos antisentido de 13-25 nucleobases de longitud por su capacidad para inducir el clivaje de un ARN blanco en un modelo de inyección de oocitos. Los oligonucleótidos antisentido de 25 nucleobases de longitud con 8 ú 11 bases de coincidencia errónea cerca de los extremos de los oligonucleótidos antisentido pudieron dirigir un clivaje específico del ARNm blanco, si bien en menor grado que los oligonucleótidos antisentido que no contenían coincidencias erróneas. De manera similar, se logró un clivaje específico del blanco usando oligonucleótidos antisentido de 13 nucleobases, incluyendo aquellos con 1 ó 3 coincidencias erróneas.

Gautschi *et al.,* (*J. Natl. Cancer Inst.*, 93: 463-471, marzo de 2001) demostraron la capacidad de un oligonucleótido con un 100% de complementariedad con el ARNm de bcl-2 y que presenta 3 coincidencias erróneas con el ARNm de bcl-xL para reducir la expresión de ambos bcl-2 y bcl-xL *in vitro* e *in vivo*. Aún más, este oligonucleótido mostró una potente actividad anti-tumoral *in vivo*.

Maher y Dolnick (*Nuc. Acid. Res.* 16: 3341-3358, 1988) evaluaron 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 del DHFR humano en un ensayo con reticulocitos de conejo. Cada uno de los tres oligonucleótidos antisentido de 14 nucleobases pudo inhibir la traducción, si bien en un nivel más modesto que los oligonucleótidos antisentido de 28 ó 42 nucleobases.

En determinadas formas de realización, los compuestos descritos en la presente son eficaces cuando presentan por lo menos una entre una IC_{50} *in vitro* menor que 20 uM, menor que 19 uM, menor que 18 uM, menor que 17 uM, menor que 16 uM, menor que 15 uM, menor que 14 uM, menor que 13 uM, menor que 12 uM, menor que 11 uM, menor que 10 uM, menor que 9 uM, menor que 8 uM, menor que 7 uM, menor que 6 uM, menor que 5 uM, menor que 4 uM, menor que 3 uM, menor que 2 uM, menor que 1 uM cuando son suministradas en células HuVEC como se describe en la presente.

En determinadas formas de realización, los compuestos descritos en la presente son eficaces cuando presentan por lo menos una entre una IC_{50} *in vitro* menor que 1.0 uM, menor que 0.9 uM, menor que 0.8 uM, menor que 0.7 uM, menor que 0.6 uM, menor que 0.5 uM, menor que 0.4 uM, menor que 0.3 uM, menor que 0.2 uM, menor que 0.1 uM cuando son suministradas en células HuVEC como se describe en la presente.

En determinadas formas de realización, los compuestos descritos en la presente son eficaces cuando presentan por lo menos una entre una IC_{50} *in vitro* menor que 0.95 uM, menor que 0.90 uM, menor que 0.85 uM, menor que 0.80 uM, menor que 0.75 uM, menor que 0.70 uM, menor que 0.65 uM, menor que 0.60 uM, menor que 0.55 uM, menor que 0.50 uM, menor que 0.45 uM, menor que 0.40 uM, menor que 0.35 uM, menor que 0.30 uM, menor que 0.25 uM, menor que 0.20 uM, menor que 0.15 uM, menor que 0.10 uM, menor que 0.05 uM, menor que 0.04 uM, menor que 0.03 uM, menor que 0.02 uM, menor que 0.01 uM cuando son suministradas en células HuVEC como se describe en la presente.

En determinadas formas de realización, el compuesto descrito en la presente es eficaz cuando presenta por lo menos una entre una IC_{50} *in vitro* menor que 20 uM, menor que 15 uM, menor que 10 uM, menor que 5 uM, menor que 2 uM, cuando se administra mediante métodos de captación libre a líneas celulares de cáncer como se describe en la presente.

En determinadas formas de realización, los compuestos descritos en la presente son altamente tolerables como se demuestra con el incremento en por lo menos uno entre los valores ALT o AST de no más de 4 veces, 3 veces o 2 veces en animales tratados con salina o un aumento en el peso de hígado, bazo o riñón de no más de un 30%, 20%, 15%, 12%, 10%, 5% o 2%. En determinadas formas de realización, los compuestos descritos en la presente son altamente tolerables como se demuestra al no haber un aumento de ALT o AST en animales tratados con salina. En determinadas formas de realización, los compuestos descritos en la presente son altamente tolerables como se demuestra al no haber un aumento en el peso de hígado, bazo o riñón en animales

tratados con salina. En determinadas revelaciones, estos compuestos incluyen ISIS 455265, ISIS 455269, ISIS 455271, ISIS 455272, ISIS 455291, ISIS 455371, ISIS 455394, ISIS 455703, ISIS 455429, ISIS 455471, ISIS 455527, ISIS 455530, ISIS 455536, ISIS 455548, ISIS 455611, ISIS 465236, ISIS 465237, ISIS 465588, ISIS 465740, ISIS 465754, ISIS 465830, ISIS 466670, ISIS 466720; ISIS 481374, ISIS 481390, ISIS 481420, ISIS 481431, ISIS 481453, ISIS 481464, ISIS 481475, ISIS 481495, ISIS 481500, ISIS 481501, ISIS 481525, ISIS 481548, ISIS 481549, ISIS 481597, ISIS 481695, ISIS 481700, ISIS 481702, ISIS 481710, ISIS 481725, ISIS 481750 e ISIS 481763. En determinadas revelaciones, dichos compuestos incluyen compuestos que comprenden la secuencia de cualquiera de las SEQ ID N°: 57, 90, 90, 175, 223, 245, 267, 307, 317, 318, 366, 411, 413, 54, 258, 268, 272, 288, 464, 367, 393, 1564, 1568, 1571, 1572, 1590, 1670, 1693, 1728, 1770, 1826, 1829, 1835, 1847, 1910, 1997, 2168, 2198, 2325, 2339, 2720, 2731, 2732 y 2756.

MOTIVOS DE LOS COMPUESTOS ANTISENTIDO

En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido dirigidos al ácido nucleico STAT3 tienen subunidades químicamente modificadas dispuestas en patrones o motivos, para conferirles a los compuestos antisentido propiedades tales como una actividad inhibidora mejorada, una mayor afinidad de unión por un ácido nucleico blanco o resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*.

Los compuestos antisentido quiméricos típicamente contienen por lo menos una región modificada para así conferir una mayor resistencia a la degradación por nucleasas, una mayor captación celular, una mayor afinidad de unión por el ácido nucleico blanco y/o una mayor actividad inhibidora. Una segunda región de un compuesto antisentido quimérico puede servir, opcionalmente, como sustrato para la endonucleasa celular RNasa H, que corta a la cadena de ARN de una dupla de ARN:ADN.

Los compuestos antisentido que tienen un motivo de gápmero se consideran compuestos antisentido quiméricos. En un gápmero, una región interna que tiene una pluralidad de nucleótidos que sustenta el clivaje por RNasaH que se ubica entre las 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 de gápmero, el segmento del hueco generalmente sirve como sustrato para el clivaje por endonucleasas, en tanto los segmentos de extensión comprenden nucleósidos modificados. En determinadas formas de realización, las regiones de un gápmero se diferencian por los tipos de grupos de azúcares comprendidos en cada región distinta. Los tipos de grupos de azúcares que se usan para diferenciar las regiones de un gápmero pueden incluir, en algunas formas de realización, β-D-ribonucleósidos, β-D-desoxirribonucleósidos, nucleósidos modificados en 2' (dichos nucleósidos modificados en 2’ pueden incluir 2’-MOE y 2’-O-CH_3, entre otros), y nucleósidos con azúcares bicíclicos modificados (dichos nucleósidos con azúcares bicíclicos modificados pueden incluir aquellos que tienen un etilo restringido). En determinadas formas de realización, las extensiones pueden incluir barios grupos de azúcares modificados, incluyendo, por ejemplo 2’-MOE y etilo restringido. En determinadas formas de realización, las extensiones pueden incluir varios grupos de azúcares modificados y no modificados. En determinadas formas de realización, las extensiones pueden incluir diversas combinaciones de nucleósidos 2’-MOE, nucleósidos de etilo restringido y 2’-desoxinucleósidos.

Cada región distinta puede comprender grupos de azúcares uniformes, variantes o grupos de azúcares alternantes. El motivo de extensión-hueco-extensión con frecuencia se describe como “X-Y-Z”, donde “X” representa la longitud de la extensión 5’, “Y” representa la longitud del hueco y “Z” representa la longitud de la extensión 3’. “X” y “Z” pueden comprender grupos de azúcares uniformes, variantes o alternantes. En determinadas formas de realización, “X” e “Y” pueden incluir uno o más 2’-desoxinucleósidos.

“Y” puede comprender 2’-desoxinucleósidos. Según se usa en la presente, un gápmero descrito como “X-Y-Z” tiene una configuración tal que el hueco se ubica inmediatamente adyacente a cada una de la extensión 5’ y la extensión 3’. Por consiguiente, no existen nucleótidos intervinientes entre la extensión 5’ y el hueco o entre el hueco y la extensión 3’. Cualquiera de los compuestos antisentido descritos en la presente puede contener un motivo de gápmero. En determinadas formas de realización, “X” y “Z” son iguales, en otras formas de realización son diferentes. En determinadas revelaciones, “Y” tiene entre 8 y 15 nucleósidos. X, Y o Z pueden comprender cualquiera entre 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 determinadas formas de realización, el compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico STAT3 tiene un motivo de gápmero 3-10-3.

ÁCIDOS NUCLEICOS BLANCO, REGIONES BLANCO Y SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS

Las secuencias de nucleótidos que codifican STAT3 incluyen, sin limitaciones, los siguientes: GENBANK, Acceso N° NM_139276.2 (incorporada en la presente como la SEQ ID N°: 1) y el complemento de GENBANK, Acceso N° NT_010755.14 truncada entre los nucleótidos 4185000 y 4264000 (incorporada en la presente como la SEQ ID N°: 2).

Se comprenderá que la secuencia que se muestra en cada SEQ ID N° en los Ejemplos contenidos en la presente es independiente de cualquier modificación en un grupo de azúcar, un enlace internucleosídico o una nucleobase. Como tales, los compuestos antisentido definidos por un SEQ ID N° pueden comprender, de manera

independiente, una o más modificaciones en un grupo de azúcar, un enlace internucleosídico o una nucleobase. Los compuestos antisentido descritos por el Número Isis (N° Isis) indican la combinación de la secuencia de nucleobases y el motivo.

En determinadas formas de realización, la región blanco es una región definida estructuralmente del ácido nucleico blanco. Por ejemplo, una región blanco puede abarcar una UTR 3', una UTR 5', un exón, un intrón, una unión de exón/intrón, una región de codificación, una región de inicio de la traducción, una región de terminación de la traducción o una otra región de ácido nucleico definida. Las regiones estructuralmente definidas para STAT3 se pueden obtener con el número de acceso en las bases de secuencias, tal como NCBI. En determinadas formas de realización, la región blanco puede abarcar la secuencia entre un sitio blanco 5' de un segmento blanco dentro de la región blanco y un sitio blanco 3' de otro segmento blanco dentro de la misma región blanco.

El direccionamiento incluye la determinación de por lo menos un segmento blanco con el cual se hibridiza un compuesto antisentido, de manera tal que se produzca un efecto deseado. En determinadas formas de realización, el efecto deseado es una reducción de los niveles de ácido nucleico de ARNm blanco. En determinadas formas de realización, el efecto deseado es una reducción de los niveles de proteína codificada por el ácido nucleico blanco o un cambio fenotípico asociado con el ácido nucleico blanco.

La región blanco puede contener uno o más segmentos blanco. Los múltiples segmentos blanco en una región blanco se pueden superponer. Como alternativa, no se superponen. En determinadas formas de realización, los segmentos blanco en una región blanco están separados por no más que aproximadamente 300 nucleótidos. En determinadas formas de realización, los segmentos blanco en una región blanco están separados por un número de nucleótidos que comprende, que comprende aproximadamente, que comprende no más que, que comprende no más que aproximadamente 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 ó 10 nucleótidos en el ácido nucleico blanco o un rango definido por cualesquiera dos de los valores precedentes. En determinadas formas de realización, los segmentos blanco en una región blanco están separados por no más que, o no más que aproximadamente, 5 nucleótidos en el ácido nucleico blanco. En determinadas formas de realización, los segmentos blanco son contiguos. Se contemplan regiones blanco definidas por un rango que tiene un ácido nucleico de partida que comprende cualquiera de los sitios blanco 5' o los sitios blanco 3' enumerados en la presente.

Los segmentos blanco adecuados se pueden encontrar dentro de una UTR 5', una región de codificación, una UTR 3', un intrón, un exón o una unión de exón/intrón. Los segmentos blanco que contienen un codón de inicio o un codón de terminación también constituyen segmentos blanco adecuados. Un segmento blanco adecuado puede excluir específicamente una región determinada definida estructuralmente, tal como el codón de inicio o el codón de terminación.

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

Puede haber variación en la actividad (por ejemplo, como lo define una reducción porcentual de los niveles de ácido nucleico blanco) de los compuestos antisentido en una región blanco activa. En determinadas formas de realización, las reducciones en los niveles de ARNm STAT3 son indicativas de la inhibición de la expresión de STAT3. Las reducciones en los niveles de una proteína STAT3 también son indicativas de la inhibición de la expresión del ARNm blanco. Además, los cambios fenotípicos son indicativos de la inhibición de la expresión de STAT3. En determinadas formas de realización, un crecimiento celular reducido, un crecimiento tumoral reducido y un volumen del tumor reducido pueden ser indicativos de la inhibición de la expresión de STAT3. En determinadas formas de realización, el alivio de los síntomas asociados con el cáncer puede ser indicativo de una inhibición de la expresión de STAT3. En determinadas formas de realización, una reducción de la caquexia es indicativa de una inhibición de la expresión de STAT3. En determinadas formas de realización, una reducción de los marcadores de cáncer puede ser indicativa de una inhibición de la expresión de STAT3.

HIBRIDACIÓN

En algunas formas de realización, se produce hibridación entre un compuesto antisentido divulgado en la presente y un ácido nucleico STAT3. El mecanismo de hibridación más común comprende la formación de puentes de hidrógeno (por ejemplo, puentes de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o inversos) entre nucleobases complementarias de las moléculas de ácido nucleico.

La hibridación puede tener lugar bajo condiciones variables. Las condiciones severas son dependientes de la secuencia y está determinadas por la naturaleza y la composición de las moléculas de ácido nucleico que se hibridizarán.

Los métodos para determinar si una secuencia se hibridiza específicamente con un ácido nucleico blanco son

bien conocidos en el arte. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido provistos en la presente se hibridizan específicamente con un ácido nucleico STAT3.

COMPLEMENTARIEDAD

Un compuesto antisentido y un ácido nucleico blanco son complementario entre sí cuando un número suficiente de nucleobases del compuesto antisentido puede formar puentes de hidrógeno con las correspondientes nucleobases del ácido nucleico blanco, de manera tal que se producirá el efecto deseado (por ejemplo, inhibición antisentido de un ácido nucleico blanco, tal como un ácido nucleico STAT3).

Las nucleobases no complementarias entre un compuesto antisentido y un ácido nucleico STAT3 se pueden tolerar siempre que el compuesto antisentido aún pueda hibridizarse específicamente con un ácido nucleico blanco. Aún más, un compuesto antisentido se puede hibridiza sobre uno o más segmentos de un ácido nucleico STAT3 sin compromiso de segmentos intervinientes o adyacentes en el evento de hibridación (por ejemplo, una estructura de bucle, una coincidencia errónea o una estructura en horquilla).

En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido provistos en la presente, o una porción específica 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 de un ácido nucleico STAT3, una región blanco, un segmento blanco o una porción específica de los mismos. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con un ácido nucleico blanco se puede determinar usando métodos de rutina.

Por ejemplo, un compuesto antisentido en donde 18 de 20 nucleobases del compuesto antisentido son complementarias de una región blanco, y por ello se hibridizarían específicamente, representará un 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, las nucleobases no complementarias remanentes pueden estar agrupadas o dispersas entre las nucleobases complementarias y no es necesario que sean contiguas entre sí o de nucleobases complementarias. Como tal, un compuesto antisentido de 18 nucleobases de longitud que tiene cuatro nucleobases no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico blanco tendría un 77.8% de complementariedad global con el ácido nucleico blanco y por consiguiente se encontraría dentro del alcance de la presente invención. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico blanco se puede determinar de manera rutinaria usando los programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineación local básica) y los programas PowerBLAST conocidos en el arte (Altschul *et al*., *J. Mol. Biol*., 1990, 215, 403 410; Zhang y Madden, *Genome Res*., 1997, 7, 649 656). El porcentaje de homología, de identidad de secuencia o de complementariedad se puede determinar, por ejemplo, con el programa Gap (*Wisconsin Sequence Analysis Package*, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Grupo, University Research Park, Madison Wis.), usando los ajustes predeterminados, que emplea el algoritmo de Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math*., 1981, 2, 482 489).

En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido provistos en la presente, o porciones específicas de los mismos, son completamente complementarios (es decir, 100% complementarios) de un ácido nucleico blanco o una porción específica del mismo. Por ejemplo, un compuesto antisentido puede ser completamente complementario de un ácido nucleico STAT3 o de una región blanco o de un segmento blanco o de una secuencia blanco del mismo. Según se usa en la presente, el término “completamente complementario” se refiere a que cada nucleobase de un compuesto antisentido tiene la capacidad de aparear sus bases de manera precisa con las correspondientes nucleobases de un ácido nucleico blanco. Por ejemplo, un compuesto antisentido de 20 nucleobases es completamente complementario de una secuencia blanco de 400 nucleobases de longitud, siempre que exista una correspondiente porción de 20 nucleobases en el ácido nucleico blanco que sea completamente complementario del compuesto antisentido. El término completamente complementario también se puede usar con referencia a una porción específica del primer y/o del segundo ácido nucleico. Por ejemplo, una porción de 20 nucleobases de un compuesto antisentido de 30 nucleobases puede ser “completamente complementaria” de una secuencia blanco de 400 nucleobases de longitud. La porción de 20 nucleobases del oligonucleótido de 30 nucleobases es completamente complementaria de la secuencia blanco si la secuencia blanco tiene una correspondiente porción de 20 nucleobases en donde cada nucleobase es complementario de la porción de 20 nucleobases del compuesto antisentido. Al mismo tiempo, el compuesto antisentido completo de 30 nucleobases puede, o no, ser completamente complementario de la secuencia blanco, dependiendo de si los 10 nucleobases remanentes del compuesto antisentido también son complementarios de la secuencia blanco.

La ubicación de una nucleobase no complementaria se ser por el extremo 5’ o por el extremo 3’ del compuesto antisentido. Como alternativa, la nucleobase no complementaria o las nucleobases no complementarias pueden encontrarse en una posición interna del compuesto antisentido. Cuando hay dos o más nucleobases no complementarias, pueden ser contiguas (es decir, pueden estar unidas) o no contiguas. En una forma de realización, la nucleobase no complementaria se ubica en el segmento de extensión de un oligonucleótido antisentido con gápmero.

En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido que comprenden, o que comprenden hasta, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 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) con relación a un ácido nucleico blanco, tal como un ácido nucleico STAT3 o una porción específica del mismo.

En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido que comprenden, o que comprenden hasta, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 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) con relación a un ácido nucleico blanco, tal como un ácido nucleico STAT3 o una porción específica del mismo.

Los compuestos antisentido provistos en la presente también incluyen aquellos que son complementarios de una porción de un ácido nucleico blanco. Según se usa en la presente, una “porción” se refiere a un número definido de nucleobases contiguas (es decir, unidas) en una región o segmento de un ácido nucleico blanco. Una “porción” también puede hacer referencia a un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido son complementarios de por lo menos una porción de 8 nucleobases de un segmento blanco. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido son complementarios de por lo menos una porción de 9 nucleobases de un segmento blanco. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido son complementarios de por lo menos una porción de 10 nucleobases de un segmento blanco. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido son complementarios de por lo menos una porción de 11 nucleobases de un segmento blanco. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido son complementarios de por lo menos una porción de 12 nucleobases de un segmento blanco. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido son complementarios de por lo menos una porción de 13 nucleobases de un segmento blanco. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido son complementarios de por lo menos una porción de 14 nucleobases de un segmento blanco. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido son complementarios de por lo menos una porción de 15 nucleobases de un segmento blanco. También se contemplan compuestos antisentido que son complementarios de por lo menos una porción de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleobases de un segmento blanco o un rango definido por cualesquiera dos de estos valores.

IDENTIDAD

Los compuestos antisentido provistos en la presente también pueden tener un porcentaje de identidad definido con una secuencia de nucleótidos, SEQ ID N° o compuesto particular representado por un número Isis específico, o una porción de la misma. Según se usa en la presente, un compuesto antisentido es idéntico a la secuencia divulgada en la presente si tiene la misma capacidad de apareamiento de nucleobases. Por ejemplo, un ARN que contiene uracilo en lugar de timidina en la secuencia de ADN divulgada se consideraría idéntica a la secuencia de ADN dado que tanto el uracilo como la timidina se aparea con adenina. También se contemplan versiones más cortas o más largas de los compuestos antisentido descritos en la presente, así como compuestos que tienen bases no idénticas con relación a los compuestos antisentido provistos en la presente. Las bases no idénticas pueden ser adyacentes entre sí o pueden estar dispersas 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 apareamiento de bases idéntico con relación a la secuencia con la cual se compara.

En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido, o porciones de los mismos, son por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticos a uno o más de los compuestos antisentido o SEQ ID N° o a porción de los mismos, divulgados en la presente.

En determinadas formas de realización, se compara una porción del compuesto antisentido con una porción de igual longitud del ácido nucleico blanco. En determinadas formas de realización, se compara una porción de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleobases con una porción de igual longitud del ácido nucleico blanco.

En determinadas formas de realización, se compara una porción del oligonucleótido antisentido con una porción de igual longitud del ácido nucleico blanco. En determinadas formas de realización, se compara una porción de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleobases con una porción de igual longitud del ácido nucleico blanco.

MODIFICACIONES

Un nucleósido es una combinación de una base y un azúcar. La porción de la nucleobase (también conocida simplemente como base) del nucleósido normalmente es una base heterocíclica. Los nucleótidos son nucleósidos que además incluyen un grupo fosfato unido de manera covalente con la porción de azúcar del nucleósido. En el caso de los nucleósidos que incluyen un azúcar de pentofuranosilo, el grupo fosfato se puede unir con el grupo hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. Los oligonucleótidos se forman mediante la unión covalente de nucleósidos adyacentes entre sí, para formar un polimérico de linear oligonucleótidos lineal. En el contexto de la estructura del oligonucleótido, los grupos fosfatos se conocen comúnmente por formar los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido.

Las modificaciones de los compuestos antisentido abarcan sustituciones o cambios en los enlaces internucleosídicos, en los grupos de azúcares o en las nucleobases. A menudo se prefieren los compuestos antisentido modificados antes que las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, mayor afinidad por el ácido nucleico blanco, mayor estabilidad en la presencia de nucleasas o mayor actividad inhibidora.

También se pueden emplear nucleósidos químicamente modificados para aumentar la afinidad de unión de un oligonucleótido antisentido más corto o truncado por su ácido nucleico blanco. En consecuencia, a menudo se pueden obtener resultados comparables con compuestos antisentido más cortos que contienen a dichos nucleósidos químicamente modificados.

ENLACES INTERNUCLEOSÍDICOS MODIFICADOS

Los enlaces internucleosídicos de ARN y ADN naturales comprenden un enlace fosfodiéster 3' a 5'. Los compuestos antisentido que tienen uno o más enlaces internucleosídicos modificados, es decir no naturales, a menudo se seleccionan ante los compuestos antisentido con enlaces internucleosídicos naturales debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, una captación celular mejorada, una mayor afinidad por los ácidos nucleicos blanco y una mayor estabilidad en la 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 en un sentido no taxativo, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidato y fosforotioatos. Los métodos de preparación de enlaces que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos.

En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico STAT3 comprenden uno o más enlaces internucleosídicos modificados. En determinadas formas de realización, los enlaces internucleosídicos modificados son enlaces fosforotioatos. En determinadas formas de realización, cada enlace internucleosídico de un compuesto antisentido es un enlace internucleosídico fosforotioato.

GRUPOS DE AZÚCARES MODIFICADOS

Los compuestos antisentido provistos en la presente opcionalmente pueden contener uno o más nucleósidos en los cuales se ha modificado el grupo de azúcar. Dichos nucleósidos con azúcar modificado pueden impartir una estabilidad mejorada a nucleasas, una mayor afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa, a los compuestos antisentido. En determinadas formas de realización, los nucleósidos comprenden un anillo ribofuranosa químicamente modificado. Los ejemplos de anillos ribofuranosa químicamente modificados incluyen, en un sentido no taxativo, adición de grupos de sustituyentes (incluyendo grupos sustituyentes en 5' y 2'); formación de puentes en átomos de anillo no geminales para formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA); reemplazo del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S, N(R) o C(R1)(R)2 (R = H, C_1-C_{12} alquilo o un grupo protector); y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de azúcares químicamente modificados incluyen, nucleósido sustituidos con 2'-F-5'-metilo (véase, la Solicitud de Patente Internacional PCT WO 2008/101157, publicada el 21/8/08 por la divulgación de otros nucleósidos 5', 2'-bi-sustituidos), reemplazo del átomo de oxígeno en el anillo ribosilo por S con una sustitución adicional en la posición 2' (véase, la publicación de la Solicitud de Patente de los EE.UU. N°: US2005/0130923, publicada el 16 de junio, 2005) o, como alternativa, la sustitución en 5' de un BNA (véase, Solicitud de Patente Internacional PCT WO 2007/134181, publicada el 22/11/07, en donde se sustituye LNA, por ejemplo, con un grupo 5'-metilo o un grupo 5'-vinilo).

Los ejemplos de nucleósidos que tienen grupos de azúcares modificados incluyen, en un sentido no taxativo, nucleósidos que comprenden grupos de sustituyentes 5'-vinilo, 5'-metilo (R o S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH_3 y 2'-$O(CH_2)2OCH_3$. El sustituyente de la posición 2' también se puede seleccionar entre alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-C_1-C_{10} alquilo, OCF_3, $O(CH_2)2SCH_3$, $O(CH_2)2$-O-N(Rm)(Rn) y O-CH_2-C(=O)-N(Rm)(Rn), donde cada Rm y Rn es, de manera independiente, H o C_1-C_{10} alquilo sustituido o no sustituido.

Según se usa en la presente, los “nucleósidos bicíclicos” se refieren a nucleósidos modificados que comprenden un azúcar bicíclico. Los ejemplos de nucleósidos bicíclicos incluyen, en un sentido no taxativo, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos 4' y 2' del anillo ribosilo. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido provistos en la presente incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos en donde el puente comprende un nucleósido bicíclico 4’ a 2’. Los ejemplos de dichos nucleósidos bicíclicos 4’ a 2’, incluyen, pero en un sentido no taxativo, uno que presenta una de las siguientes fórmulas: 4'-(CH_2)-O-2' (LNA); 4'-(CH_2)-S-2'; 4'-$(CH_2)_2$-O-2' (ENA); 4'-$CH(CH_3)$-O-2' y 4'-$CH(CH_2OCH_3)$-O-2' y análogos de los mismos (véase, la Patente de los EE.UU. N°: 7,399,845, presentada el 15 de julio, 2008); 4'-$C(CH_3)(CH_3)$-O-2' y análogos de los mismos (véase, la publicación de la Solicitud de Patente Internacional PCT WO2009/006478, publicada el 8 de enero, 2009); 4'-CH_2-N(OCH_3)-2' y análogos de los mismos (véase, la publicación de la Solicitud de Patente Internacional PCT WO2008/150729, publicada el 11 de diciembre, 2008); 4'-CH_2-O-N(CH_3)-2' (véase, la publicación de la Solicitud de Patente de los EE.UU. N°: US2004/0171570, publicada el 2 de septiembre, 2004); 4'-CH_2-N(R)-O-2', en donde R es H, un grupo C_1-C_{12} alquilo o un grupo protector (véase, la Patente de los EE.UU. N°: 7,427,672, presentada

el 23 de septiembre, 2008); 4'-CH_2-C(H)(CH_3)-2' (véase, Chattopadhyaya, *et al., J. Org. Chem.,* 2009, *74*, 118-134); y 4'-CH_2-C(=CH_2)-2' y análogos de los mismos (véase, la publicación de la Solicitud de Patente Internacional PCT WO 2008/154401, publicada el 8 de diciembre, 2008). También véase, por ejemplo: Singh et al., *Chem. Commun*., 1998, *4*, 455-456; Koshkin et al., *Tetrahedron*, 1998, *54*, 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*., *129(26)* 8362-8379 (4 de julio, 2007); Elayadi *et al., Curr. Opinion Invens. Drugs,* 2001, *2*, 558-561; Braasch *et al., Chem. Biol.,* 2001, *8*, 1-7; Orum *et al., Curr. Opinion Mol. Ther.,* 2001, *3*, 239-243; Patentes de los EE.UU. N°: 6,670,461, 7,053,207, 6,268,490, 6,770,748, 6,794,499, 7,034,133, 6,525,191, 7,399,845; las publicaciones de las Solicitudes de Patente Internacional PCT WO 2004/106356, WO 94/14226, WO 2005/021570 y WO 2007/134181; las publicaciones de las Patentes de los EE.UU. N°: US2004/0171570, US2007/0287831 y US2008/0039618; y las Patentes de los EE.UU. N° Acta: 12/129,154, 60/989,574, 61/026,995, 61/026,998, 61/056,564, 61/086,231, 61/097,787 y 61/099,844; y las Solicitudes de Patente Internacional PCT N° PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154 y PCT/US2008/068922. Cada uno de los nucleósidos bicíclicos precedentes se puede preparar con una o más configuraciones estereoquímicas del azúcar incluyendo, por ejemplo, α-L-ribofuranosa y β-D-ribofuranosa (véase la Solicitud de Patente Internacional PCT PCT/DK98/00393, publicada el 25 de marzo, 1999 como WO 99/14226).

En determinadas formas de realización, las unidades de azúcares bicíclicos de los nucleósidos BNA pueden ser, sin limitaciones, compuestos que comprenden al menos un enlace entre las posiciones 4' y 2' de una unidad de azúcar de pentofuranosilo, donde dichos enlaces comprenden, en cada caso independientemente, 1 o entre 2 y 4 grupos unidos que pueden seleccionarse de manera independiente entre los siguientes: -[$C(R_a)(R_b)]_n$-, -$C(R_a)$=$C(R_b)$-, -$C(R_a)$=N-, -C(=NR_a)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -$Si(R_a)_2$-, -$S(=O)_x$- y -$N(R_a)$-;

donde

x es 0, 1 ó 2;

n es 1, 2, 3 ó 4;

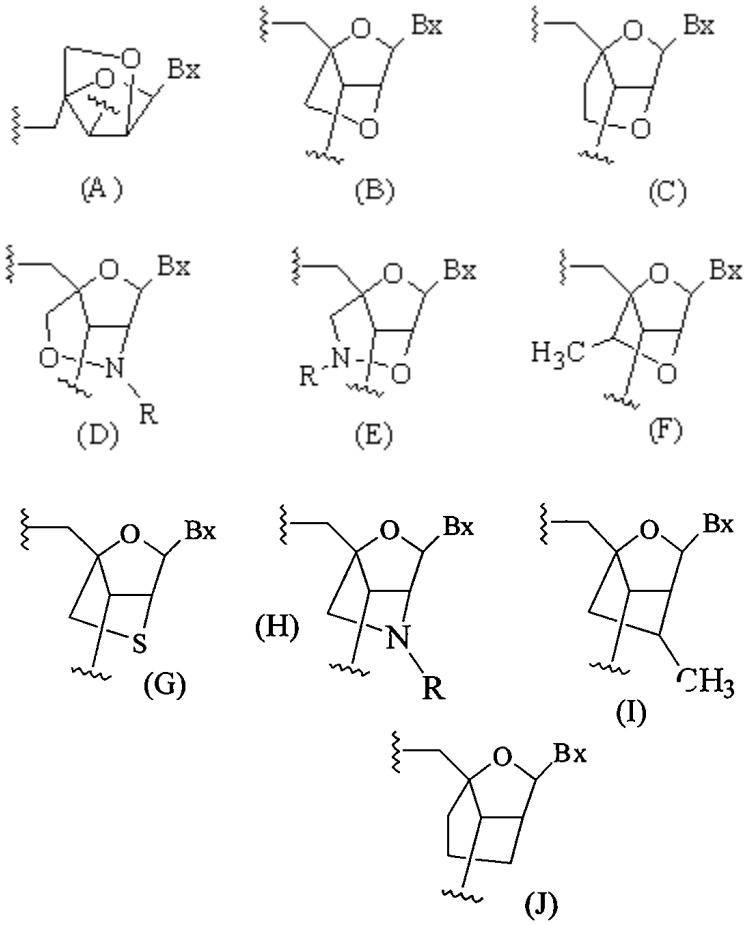
cada uno de R_a y R_b es independientemente H, un grupo protector, un hidroxilo, un alquilo C_1-C_{12}, un alquilo C_1-C_{12} sustituido, un alquenilo C_2-C_{12}, un alquenilo C_2-C_{12} sustituido, un alquinilo C_2-C_{12}, un alquinilo C_2-C_{12} sustituido, un arilo C_5-C_{20}, un arilo C_5-C_{20} sustituido, un radical heterocíclico, un radical heterocíclico sustituido, un heteroarilo, un heteroarilo sustituido, un radical alicíclico C_5-C_7, un radical alicíclico C_5-C_7 sustituido, un halógeno, un grupo OJ_1, un grupo NJ_1J_2, un grupo SJ_1, un grupo N_3, un grupo $COOJ_1$, un grupo acil (C(=O)-H), un grupo acilo sustituido, un grupo CN, un grupo sulfonil ($S(=O)_2$-J_1) o un grupo sulfoxil (S(=O)-J_1); y

cada uno de J_1 y J_2 es independientemente H, un alquilo C_1-C_{12}, un alquilo C_1-C_{12} sustituido, un alquenilo C_2-C_{12}, un alquenilo C_2-C_{12} sustituido, un alquinilo C_2-C_{12}, un alquinilo C_2-C_{12} sustituido, un arilo C_5-C_{20}, un arilo C_5-C_{20} sustituido, un grupo acil (C(=O)-H), un acilo sustituido, un radical heterocíclico, un radical heterocíclico sustituido, un aminoalquilo C_1-C_{12}, un aminoalquilo C_1-C_{12} sustituido o un grupo protector.

En determinadas formas de realización, el enlace de la unidad de azúcar bicíclico es -$[C(R_a)(R_b)]_n$-, -$[C(R_a)(R_b)]_n$-O-, -$C(R_aR_b)$-N(R)-O- o -$C(R_aR_b)$-O-N(R)-. En determinadas formas de realización, el enlace 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' o 4'-CH_2-N(R)-O-2'-, donde, en cada caso independientemente, R es H, un grupo protector o un alquilo C_1-C_{12}.

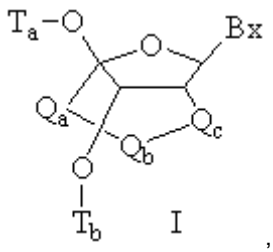
En determinadas formas de realización, los nucleósidos bicíclicos también pueden definirse sobre la base de su configuración isomérica. A modo de ejemplo, un nucleósido que comprende un enlace de 4'-2'-metileno-oxilo puede presentar una configuración α-L o una configuración β-D. Se ha descripto la incorporación de nucleósidos BNA del tipo del α-L-metilenoxilo (4'-CH_2-O-2') en oligonucleótidos antisentido activos (Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372).

En determinadas formas de realización, los nucleósidos bicíclicos incluyen, sin limitaciones, (A) los nucleósidos BNA del tipo del α-L-metilenoxilo (4'-CH_2-O-2'), (B) los nucleósidos BNA del tipo del β-D-metilenoxilo (4'-CH_2-O-2'), (C) los nucleósidos BNA del tipo del etilenoxilo (4'-$(CH_2)_2$-O-2'), (D) los nucleósidos BNA del tipo del aminooxilo (4'-CH_2-O-N(R)-2'), (E) los nucleósidos BNA del tipo del oxiamino (4'-CH_2-N(R)-O-2'), (F) los nucleósidos BNA del tipo del metil(metilenoxilo) (4'-CH(CH_3)-O-2'), (G) los nucleósidos BNA del tipo del metilentiol (4'-CH_2-S-2'), (H) los nucleósidos BNA del tipo del metilenamino (4'-CH2-N(R)-2'), (I) los nucleósidos BNA del tipo metil carbocíclico (4'-CH_2-CH(CH_3)-2') y (J) los nucleósidos BNA del tipo propilen carbocíclico (4'-$(CH_2)_3$-2'), que se representan a continuación,



donde Bx es la unidad básica y R, en cada caso independientemente, es H, un grupo protector o un alquilo C_1-C_{12}.

En determinadas formas de realización, el nucleósido bicíclico tiene la fórmula I



,

donde

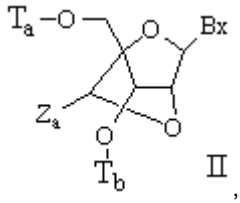
Bx es una unidad básica heterocíclica;

$-Q_a-Q_b-Q_c-$ es $-CH_2-N(R_c)-CH_2-$, $-C(=O)-N(R_c)-CH_2-$, $-CH_2-O-N(R_c)-$, $-CH_2-N(R_c)-O-$ o $-N(R_c)-O-CH_2$;

R_c es un alquilo C_1-C_{12} o un grupo protector de amino; y

cada uno de T_a y T_b es independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo que reactivo que comprende fósforo, una unidad de fósforo o un enlace covalente con un medio de soporte.

En determinadas formas de realización, el nucleósido bicíclico tiene la fórmula II



II ,

donde

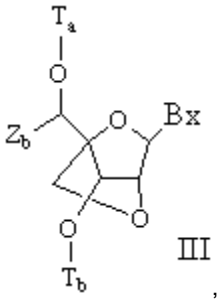
Bx es una unidad básica heterocíclica;

cada uno de T_a y T_b es independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo que reactivo que comprende fósforo, una unidad de fósforo o un enlace covalente con un medio de soporte; y

Z_a es un alquilo C_1-C_6, un alquenilo C_2-C_6, un alquinilo C_2-C_6, un alquilo C_1-C_6 sustituido, un alquenilo C_2-C_6 sustituido, un alquinilo C_2-C_6 sustituido, un acilo, un acilo sustituido, una amida sustituida, un tiol o un tiol sustituido.

En una forma de realización, cada uno de los grupos sustituidos se encuentra monosustituido o polisustituido de manera independiente con grupos que pueden seleccionarse entre los halógenos y los grupos oxo, hidroxilo, OJ_c, NJ_cJ_d, SJ_c, N_3, $OC(=X)J_c$ y $NJ_eC(=X)NJ_cJ_d$, donde cada uno de J_c, J_d y J_e es independientemente H, un alquilo C_1-C_6 o un alquilo C_1-C_6 sustituido y X es O o NJ_c.

En determinadas formas de realización, el nucleósido bicíclico tiene la fórmula III



III ,

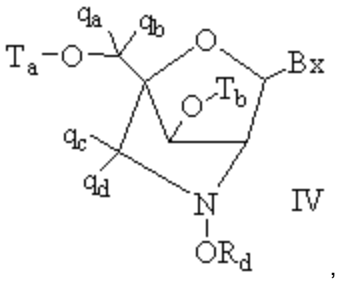
donde

Bx es una unidad básica heterocíclica;

cada uno de T_a y T_b es independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo que reactivo que comprende fósforo, una unidad de fósforo o un enlace covalente con un medio de soporte; y

Z_b es un alquilo C_1-C_6, un alquenilo C_2-C_6, un alquinilo C_2-C_6, un alquilo C_1-C_6 sustituido, un alquenilo C_2-C_6 sustituido, un alquinilo C_2-C_6 sustituido o un acilo sustituido (C(=O)-).

En determinadas formas de realización, el nucleósido bicíclico tiene la fórmula IV



IV ,

donde

Bx es una unidad básica heterocíclica;

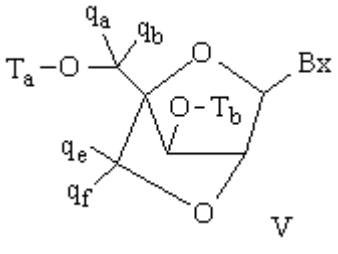
cada uno de T_a y T_b es independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo que reactivo que comprende fósforo, una unidad de fósforo o un enlace covalente con un medio de soporte;

R_d es un alquilo C_1-C_6, un alquenilo C_2-C_6, un alquinilo C_2-C_6, un alquilo C_1-C_6 sustituido, un alquenilo C_2-C_6

sustituido o un alquinilo C_2-C_6 sustituido; y

cada uno de q_a, q_b, q_c y q_d es independientemente H, un halógeno, un alquilo C_1-C_6, un alquenilo C_2-C_6, un alquinilo C_2-C_6, un alquilo C_1-C_6 sustituido, un alquenilo C_2-C_6 sustituido, un alquinilo C_2-C_6 sustituido, un alcoxilo C_1-C_6, un alcoxilo C_1-C_6 sustituido, un acilo, un acilo sustituido, un aminoalquilo C_1-C_6 o un aminoalquilo C_1-C_6 sustituido.

En determinadas formas de realización, el nucleósido bicíclico tiene la fórmula V



V ,

donde

Bx es una unidad básica heterocíclica;

cada uno de T_a y T_b es independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo que reactivo que comprende fósforo, una unidad de fósforo o un enlace covalente con un medio de soporte;

cada uno de q_a, q_b, q_e y q_f es independientemente hidrógeno, un halógeno, un alquilo C_1-C_{12}, un alquilo C_1-C_{12} sustituido, un alquenilo C_2-C_{12}, un alquenilo C_2-C_{12} sustituido, un alquinilo C_2-C_{12}, un alquinilo C_2-C_{12} sustituido, un alcoxilo C_1-C_{12}, un alcoxilo C_1-C_{12} sustituido o un grupo OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO_2J_j, NJ_jJ_k, N_3, CN, $C(=O)OJ_j$, $C(=O)NJ_jJ_k$, $C(=O)J_j$, $O\text{-}C(=O)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ o $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$;

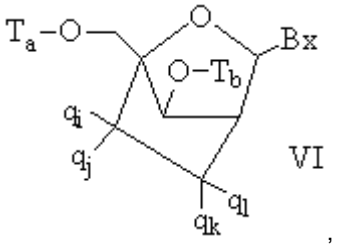
o q_e y q_f juntos forman un grupo $=C(q_g)(q_h)$; y

cada uno de q_g y q_h es independientemente H, un halógeno, un alquilo C_1-C_{12} o un alquilo C_1-C_{12} sustituido.

Se ha descripto la síntesis y la elaboración de los monómeros de los nucleósidos BNA del tipo del metilenoxilo (4'-CH_2-O-2'), la adenina, la citosina, la guanina, la 5-metil-citosina, la timina y el uracilo, así como su oligomerización y sus propiedades relacionadas con el reconocimiento de los ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, Koshkin et al., *Tetrahedron*, 1998, *54*, 3607-3630). Los nucleósidos BNA y su elaboración también se describen en WO 98/39352 y en WO 99/14226.

También se ha descripto la elaboración de los análogos de los nucleósidos BNA del tipo del metilenoxilo (4'-CH_2-O-2') y de los nucleósidos 2'-tio-BNA (véase, por ejemplo, Kumar et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, *8*, 2219-2222), la elaboración de los análogos de nucleósidos que comprenden duplas de oligodesoxirribonucleótidos, que pueden ser útiles como sustratos para las polimerasas que actúan sobre los ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, Wengel et al., WO 99/14226), la síntesis de los nucleósidos 2'-amino-BNA, que son análogos de oligonucleótidos novedosos que presentan una conformación restringida y una afinidad elevada (véase, por ejemplo, Singh et al., *J. Org. Chem.*, 1998, *63*, 10035-10039), *y* la elaboración de los nucleósidos 2'-metilamino-BNA, que pueden formar duplas térmicamente estables con cadenas de ARN o ADN complementario.

En determinadas formas de realización, el nucleósido bicíclico tiene la fórmula VI



VI ,

donde

Bx es una unidad básica heterocíclica;

cada uno de T_a y T_b es independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo que reactivo que comprende fósforo, una unidad de fósforo o un enlace covalente con un medio de soporte;

cada uno de q_i, q_j, q_k y q_l es independientemente H, un halógeno, un alquilo C_1-C_{12}, un alquilo C_1-C_{12} sustituido, un alquenilo C_2-C_{12}, un alquenilo C_2-C_{12} sustituido, un alquinilo C_2-C_{12}, un alquinilo C_2-C_{12} sustituido, un alcoxilo C_1-C_{12}, un alcoxilo C_1-C_{12} sustituido o un grupo OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO_2J_j, NJ_jJ_k, N_3, CN, $C(=O)OJ_j$, $C(=O)NJ_jJ_k$, $C(=O)J_j$, $O\text{-}C(=O)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ o $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$; y

q_i y q_j o q_l y q_k juntos forman un grupo $=C(q_g)(q_h)$, donde cada uno de q_g y q_h es independientemente, H, un halógeno, un alquilo C_1-C_{12} o un alquilo C_1-C_{12} sustituido.

Se ha descripto un nucleósido carbocíclico bicíclico que comprende un enlace 4'-$(CH_2)_3$-2' y un análogo de alquenilo, que puede tomar la forma de un enlace 4'-CH=CH-CH_2-2' (véase, por ejemplo, Freier *et al., Nucleic Acids Research*, 1997, *25(22)*, 4429-4443, y Albaek *et al., J. Org. Chem.,* 2006, *71*, 7731-7740). También se ha descripto la síntesis y la elaboración de los nucleósidos carbocíclicos, así como su oligomerización, y se han publicado estudios bioquímicos donde se los ha usado (véase, por ejemplo, Srivastava *et al., J. Am. Chem. Soc.* 2007, *129(26)*, 8362-8379).

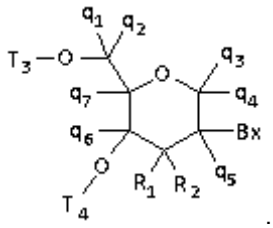
Tal como se lo emplea en la presente, el término "nucleósido bicíclico 4'-2'" hace referencia a un nucleósido bicíclico que comprende un anillo de furanosa que presenta un enlace entre el átomo de carbono en la posición 2' y el átomo de carbono en la posición 4'.

Tal como se lo emplea en la presente, el término "nucleósido monocíclico" hace referencia a un nucleósido que comprende unidades de azúcares modificados que no son azúcares bicíclicos. En determinadas formas de realización, la unidad de azúcar de un nucleósido, que puede ser un análogo de un azúcar, puede someterse a una modificación o una sustitución en cualquier posición.

Tal como se lo emplea en la presente, el término "azúcar modificado en la posición 2'" hace referencia a un azúcar de furanosilo que presenta una modificación en la posición 2'. En determinadas formas de realización, las modificaciones en este contexto incluyen la introducción de sustituyentes que pueden seleccionarse, sin limitaciones, entre los haluros, los alcoxilos sustituidos o no sustituidos, los tioalquilos sustituidos o no sustituidos, los amino alquilos sustituidos o no sustituidos, los alquilos sustituidos o no sustituidos, los alilos sustituidos o no sustituidos y los alquinilos sustituidos o no sustituidos. En determinadas formas de realización, las modificaciones en la posición 2' abarcan la introducción de sustituyentes que pueden seleccionarse, sin limitaciones, entre los grupos $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$, $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$ y $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, donde n y m pueden tomar un valor de entre 1 y 10. Otros grupos que pueden introducirse como sustituyentes en la posición 2' incluyen los alquilos C_1-C_{12}, los alquilos sustituidos, los alquenilos, los alquinilos, los alcarilos, los aralquilos, los O-alcarilos, los O-aralquilos, los grupos SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, los grupos que pueden escindir el ARN, los grupos indicadores, los intercaladores, los grupos que son útiles para mejorar las propiedades farmacocinéticas, los grupos que son útiles para mejorar las propiedades farmacodinámicas de los compuestos antisentido y los sustituyentes que presentan propiedades similares. En determinadas formas de realización, los nucleósidos modificados comprenden una cadena lateral de MOE en la posición 2' (véase, por ejemplo, Baker et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000). Se ha indicado que la introducción de un sustituyente MOE en la posición 2' es útil para mejorar la afinidad de unión, en comparación con la afinidad que podrían presentar los nucleósidos no modificados u otros nucleósidos modificados, como es el caso de los nucleósidos que comprenden grupos O-metilo, O-propilo u O-aminopropilo en la posición 2'. También se ha comprobado que los oligonucleótidos antisentido que comprenden sustituyentes MOE en la posición 2' pueden actuar como inhibidores de la expresión de los genes, por lo que podrían resultar de utilidad *in vivo* (véase, por ejemplo, Martin, P., *Helv. Chim. Acta*, 1995, *78*, 486-504, Altmann et al., *Chimia*, 1996, *50*, 168-176, Altmann et al., *Biochem. Soc. Trans.*, 1996, *24*, 630-637, y Altmann et al., *Nucleosides Nucleotides*, 1997, *16*, 917-926).

Tal como se lo emplea en la presente, el término "nucleósido de tetrahidropirano modificado" o "nucleósido THP modificado" hace referencia a un nucleósido que comprende un "azúcar" de seis miembros del tipo del tetrahidropirano como sustituyente en el residuo de pentofuranosilo, en comparación con los nucleósidos normales, por lo que pueden ser usados en reemplazo de los azúcares. Los nucleósidos THP modificados incluyen, sin limitaciones, los nucleósidos que en la técnica se conocen como ácidos nucleicos del tipo del hexitol (HNA), ácidos nucleicos del tipo del anitol (ANA) o ácidos nucleicos del tipo del manitol (MNA) (véase Leumann, CJ., *Bioorg. & Med. Chem.* (2002) 10:841-854), los ácidos nucleicos HNA modificados con flúor (F-HNA) y los compuestos que se tienen la fórmula X

Fórmula X



donde de manera independiente en cada uno de los análogos de nucleósidos del tipo del tetrahidropirano que tienen la fórmula X,

Bx es una unidad básica heterocíclica;

cada uno de T_3 y T_4 es independientemente un enlace entre dos nucleósidos, que en particular une el análogo de nucleósido del tipo del tetrahidropirano y el compuesto antisentido, o bien uno de T_3 y T_4 es un enlace entre dos nucleósidos que une el análogo de nucleósido del tipo del tetrahidropirano y el compuesto antisentido y el otro es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado o un grupo terminal 5' o 3';

cada uno de q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6 y q_7 es independientemente, H, un alquilo C_1-C_6, un alquilo C_1-C_6 sustituido, un alquenilo C_2-C_6, un alquenilo C_2-C_6 sustituido, un alquinilo C_2-C_6 o un alquinilo C_2-C_6 sustituido; y

uno de R_1 y R_2 es hidrógeno y el otro se selecciona entre un halógeno, un alcoxilo sustituido o no sustituido o un grupo NJ_1J_2, SJ_1, N_3, $OC(=X)J_1$, $OC(=X)NJ_1J_2$, $NJ_3C(=X)NJ_1J_2$ o CN, donde X es O, S o NJ_1 y cada uno de J_1, J_2 y J_3 es independientemente H o un alquilo C_1-C_6.

En determinadas formas de realización, en los nucleósidos THP modificados de fórmula X, q_m, q_n, q_p, q_r, q_s, q_t y q_u son H. En determinadas formas de realización, al menos uno de q_m, q_n, q_p, q_r, q_s, q_t y q_u no es H. En determinadas formas de realización, al menos uno de q_m, q_n, q_p, q_r, q_s, q_t y q_u es metilo. En determinadas formas de realización, en los nucleósidos THP de fórmula X, uno de R_1 y R_2 es F. En determinadas formas de realización, R_1 es fluoro y R_2 es H, R_1 es metoxilo y R_2 es H o R_1 es metoxietoxilo y R_2 es H.

Tal como se los emplea en la presente, los términos "modificado en la posición 2'" y "sustituido en la posición 2'" se aplican a aquellos nucleósidos que comprenden un azúcar que presenta un sustituyente diferente del H y el OH en la posición 2'. Los nucleósidos modificados en la posición 2', incluyen, sin limitaciones, aquellos nucleósidos bicíclicos que comprenden un enlace entre el átomo de carbono en la posición 2' y otro átomo de carbono del anillo del azúcar y aquellos nucleósidos que comprenden sustituyentes que no son enlaces en la posición 2', lo que abarca los grupos alilo, amino, azido, tiol, O-alilo, alquilo O-C_1-C_{10}, -OCF_3, O-$(CH_2)_2$-O-CH_3, 2'-$O(CH_2)_2SCH_3$, O-$(CH_2)_2$-O-$N(R_m)(R_n)$ y O-CH_2-C(=O)-$N(R_m)(R_n)$, donde cada uno de R_m y R_n es independientemente H o un alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido. Los nucleósidos modificados en la posición 2' también pueden presentar otras modificaciones, por ejemplo, en otras posiciones de los azúcares y/o en las nucleobases.

Tal como se lo emplea en la presente, el término "2'-F" hace referencia a la presencia de un átomo de flúor en la posición 2' de un azúcar en un nucleósido.

Tal como se los emplea en la presente, los términos "2'-OMe", "2'-OCH_3" y "2'-O-metilo" hacen referencia a la presencia de un grupo -OCH_3 en la posición 2' de un azúcar en un nucleósido.

Tal como se lo emplea en la presente, el término "oligonucleótido" hace referencia a un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos unidos. En determinadas formas de realización, uno o más de estos nucleósidos se encuentran modificados. En determinadas formas de realización, un oligonucleótido comprende uno o más ribonucleósidos (ARN) y/o uno o más desoxirribonucleósidos (ADN).

En la técnica se conocen otros sistemas de anillos bicíclicos o tricíclicos que pueden usarse en reemplazo de los azúcares para modificar los nucleósidos en los compuestos antisentido (véase, por ejemplo, el artículo de Leumann, J. C., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, *10*, 841-854).

Estos sistemas de anillos pueden someterse a diversas sustituciones adicionales para incrementar su actividad.

Aquellos versados en la técnica han de conocer diversos métodos para elaborar los azúcares modificados.

En los nucleótidos que comprenden unidades de azúcares modificados, suelen conservarse las nucleobases (que pueden ser nucleobases naturales, nucleobases modificadas o una combinación de nucleobases naturales y nucleobases modificadas) para poder efectuar la hibridación con los blancos apropiados.

En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido comprenden uno o más nucleótidos que presentan unidades de azúcares modificados. En determinadas formas de realización, el azúcar modificado toma

la forma de una unidad MOE en el extremo 2'. En determinadas formas de realización, los nucleótidos modificados que comprenden unidades MOE en el extremo 2' se distribuyen con un patrón intercalado. En determinadas formas de realización, el azúcar modificado es una unidad de cEt. En determinadas formas de realización, los nucleótidos modificados que comprenden unidades cEt se localizan en los extremos, donde presentan un patrón intercalado.

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA FORMULAR LAS COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Los oligonucleótidos antisentido pueden combinarse con sustancias activas o inertes farmacéuticamente aceptables para elaborar composiciones o formulaciones farmacéuticas. La naturaleza de las composiciones farmacéuticas y los métodos para formularlas pueden variar en función de numerosos factores, tales como la ruta a través de la cual se desea efectuar la administración, la extensión de la enfermedad o la dosis que se desea administrar.

Un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico STAT3 puede formularse en composiciones farmacéuticas combinándolo con un diluyente o un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un diluyente farmacéuticamente aceptable puede ser la solución salina amortiguada con fosfato (PBS). La PBS es un diluyente apropiado para usar en aquellas composiciones que han de administrarse por vía parenteral. Por lo tanto, en una forma de realización, en los métodos que se describen en la presente puede emplearse una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico STAT3 y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En determinadas formas de realización, el diluyente farmacéuticamente aceptable es la PBS. En determinadas formas de realización, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido.

Las composiciones farmacéuticas que comprendan los compuestos antisentido también podrán comprender sales, ésteres o sales de ésteres de dichos compuestos, o bien cualquier otro oligonucleótido que, al administrarlo en un animal, tal como un ser humano, dé como resultado (de manera directa o indirecta) un metabolito con actividad biológica o un residuo de éste. En este contexto, dentro del alcance de la presente invención también se incluyen las sales de los compuestos antisentido que se describen en la presente, las prodrogas de dichos compuestos, las sales farmacéuticamente aceptables de dichas prodrogas y otros equivalentes biológicos. Las sales farmacéuticamente aceptables apropiadas incluyen, sin limitaciones, las sales de sodio y las sales de potasio.

Una prodroga puede comprender un compuesto antisentido inactivo con nucleósidos adicionales en uno de sus extremos o en ambos, donde dichos nucleósidos adicionales pueden ser escindidos por las nucleasas endógenas en el cuerpo para formar un compuesto antisentido activo.

COMPUESTOS ANTISENTIDO CONJUGADOS

Los compuestos antisentido pueden unirse a través de enlaces covalentes a una o más unidades o pueden combinarse con grupos conjugados específicos para incrementar su actividad o para mejorar su distribución en las células o su captación por parte de las células. Los grupos conjugados típicos incluyen las unidades a base de colesterol y las unidades lipídicas. Otros grupos conjugados incluyen los hidratos de carbono, los fosfolípidos, la biotina, la fenazina, el folato, la fenantridina, la antraquinona, la acridina, las fluoresceínas, las rodaminas, las cumarinas y los colorantes.

En uno de los extremos de los compuestos antisentido, o en ambos, también pueden introducirse grupos estabilizadores específicos para mejorar propiedades como la estabilidad ante las nucleasas. Entre los grupos que pueden introducirse, pueden mencionarse las estructuras de recubrimiento. Estas modificaciones que se realizan en los extremos de los compuestos antisentido pueden ser útiles para proteger los nucleótidos que se encuentran en dichos extremos de la degradación por parte de las exonucleasas y para mejorar la distribución y/o la localización de los compuestos en las células. Las estructuras de recubrimiento pueden estar presentes en el extremo 5' (en cuyo caso puede conocérselas como recubrimientos 5') y/o en el extremo 3' (en cuyo caso puede conocérselas como recubrimientos 3'). Las estructuras de recubrimiento son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, las estructuras de recubrimiento abásicas invertidas que comprenden unidades de desoxilo. Otros grupos estabilizadores que pueden introducirse como estructuras de recubrimiento en los extremos 3' y 5' de los compuestos antisentido para incrementar su estabilidad ante las nucleasas incluyen los que se describen en WO 03/004602, que fue publicada el 16 de enero de 2003.

CULTIVO DE LAS CÉLULAS Y TRATAMIENTOS CON LOS COMPUESTOS ANTISENTIDO

Los efectos que presentan los compuestos antisentido sobre el nivel, la actividad o la expresión de los ácidos nucleicos STAT3 pueden analizarse en diversos tipos de células *in vitro*. En este contexto, los tipos de células que pueden usarse en los análisis que se han descripto pueden obtenerse en proveedores comerciales como la Colección Americana de Tipos de Cultivo, Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC, o Clonetics Corporation, Walkersville, MD. Las células pueden cultivarse de acuerdo con las instrucciones de los proveedores, mediante el uso de reactivos disponibles comercialmente (que por ejemplo, pueden adquirirse en Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Entre los tipos de células que pueden usarse, pueden mencionarse, sin limitaciones, las células HuVEC, las células b.END, las células HepG2, las células Hep3B y los hepatocitos

primarios.

ANÁLISIS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO IN VITRO

En la presente se describen métodos con los que pueden tratarse las células con los oligonucleótidos antisentido, los cuales también pueden someterse a modificaciones apropiadas para efectuar un tratamiento con otros compuestos antisentido.

En este contexto, las células pueden tratarse con los oligonucleótidos antisentido cuando presentan una confluencia de aproximadamente 60-80% en el cultivo.

Un reactivo que suele emplearse para introducir los oligonucleótidos antisentido en las células en los cultivos es el reactivo para transfectar lípidos catiónicos que se conoce como Lipofectin (de Invitrogen, Carlsbad, CA). De esta manera, los oligonucleótidos antisentido pueden combinarse con la Lipofectin en un medio Opti-Mem 1 (de Invitrogen, Carlsbad, CA) de manera tal de alcanzar la concentración final deseada, donde la concentración de la Lipofectin puede variar entre 2 y 12 µg/ml por cada 100 nmol/litro del oligonucleótido antisentido.

Otro reactivo que puede usarse para introducir los oligonucleótidos antisentido en las células en los cultivos es la Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA). De esta manera, los oligonucleótidos antisentido pueden combinarse con la Lipofectamine en un medio con un contenido reducido de suero, tal como el medio Opti-Mem 1 (de Invitrogen, Carlsbad, CA), de manera tal de alcanzar la concentración final deseada, donde la concentración de la Lipofectamine puede variar entre 2 y 12 µg/ml por cada 100 nmol/litro del oligonucleótido antisentido.

Otro procedimiento que puede usarse para introducir los oligonucleótidos antisentido en las células cultivadas es la electroporación.

Las células pueden tratarse con los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con métodos de rutina. En este contexto, las células pueden cosecharse 16-24 horas después de tratarlas con los oligonucleótidos antisentido para determinar el nivel de las proteínas o el ARN deseado con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, según se describe en la presente. En general, cuando los tratamientos se llevan a cabo en múltiples réplicas, los resultados pueden presentarse como el promedio de las diversas réplicas.

La concentración que se emplea de los oligonucleótidos antisentido puede variar en función de la línea de células usada. En la técnica se conocen métodos apropiados para determinar la concentración óptima de los oligonucleótidos antisentido para diversas líneas de células. En este contexto, los oligonucleótidos antisentido suelen usarse en una concentración que varía entre 1 nM y 300 nM cuando se realiza una transfección con Lipofectamine. Por otro lado, cuando se realiza una transfección basada en una electroporación, los oligonucleótidos antisentido suelen usarse en una concentración más elevada, por ejemplo, de entre 625 y 20000 nM.

ANÁLISIS BASADOS EN LA CAPTACIÓN LIBRE

En determinadas formas de realización, puede usarse la actividad independiente de la transfección (es decir, en el contexto de una captación libre) de los oligonucleótidos antisentido en líneas de células cancerosas como una indicación de su potencia. La captación libre de los compuestos puede determinarse en líneas de células cancerosas como las células SK-BR-3, las células U251-MG, las células MDA-MB-231, las células H460, las células A431, las células colo205, las células SNB-19, las células SK-OV3, las células de cáncer de pulmón H1993, las células de cáncer de pulmón H358, las células de cáncer de pulmón PC-9, las células de cáncer de pulmón KHM-35, las células de cáncer de páncreas Capan-1, las células de cáncer de páncreas HPAF-11 o las células de cáncer colorrectal Colo 201.

En los análisis basados en la captación libre, los oligonucleótidos antisentido se introducen en las células sin la ayuda de un agente de transfección o de un procedimiento de electroporación. En este contexto, se aplican los oligonucleótidos antisentido sobre las células en una o más dosis y se determina el porcentaje de inhibición de la expresión del ARNm o la proteína blanco. Cuando se administran múltiples dosis, puede determinarse la IC50. En determinadas formas de realización, se prefieren los oligonucleótidos antisentido que presentan una potencia alta, lo cual puede determinarse sobre la base del porcentaje de inhibición del blanco, después de administrar una o varias dosis, sobre los oligonucleótidos antisentido que presentan una potencia baja, ya que es más probable que los oligonucleótidos antisentido que se caractericen por una potencia elevada *in vitro* presenten una potencia apropiada *in vivo*.

AISLAMIENTO DEL ARN

El estudio del ARN puede basarse en un análisis del ARN total de las células o del ARNm poli(A)+. Los métodos para aislar el ARN han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica, así como los métodos para preparar el ARN. A modo de ejemplo, puede recurrirse al uso del reactivo Trizol (de Invitrogen, Carlsbad, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

ANÁLISIS DE LA INHIBICIÓN DEL NIVEL O LA EXPRESIÓN DEL BLANCO

La inhibición del nivel o la expresión de un ácido nucleico STAT3 puede analizarse con diversos procedimientos conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, el nivel del ácido nucleico blanco puede cuantificarse, por ejemplo, por medio de un análisis de transferencia Northern, sobre la base de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva o con una PCR cuantitativa en tiempo real. Según se ha indicado, el estudio del ARN puede basarse en un análisis del ARN total de las células o del ARNm poli(A)+, y los métodos para aislar el ARN han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica. El análisis de transferencia Northern también ha de resultar conocido para aquellos versados en la técnica. La PCR cuantitativa en tiempo real puede ponerse en práctica de manera conveniente con los sistemas comerciales para analizar secuencias ABI PRISM 7600, 7700 ó 7900, de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, que pueden emplearse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

ANÁLISIS DEL NIVEL DEL ARN BLANCO POR MEDIO DE UNA PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

El nivel del ARN blanco puede cuantificarse sobre la base de una PCR cuantitativa en tiempo real, por ejemplo, mediante el uso de un sistema para analizar secuencias ABI PRISM 7600, 7700 ó 7900 (de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En la técnica se conocen métodos para poner en práctica la PCR cuantitativa en tiempo real.

Antes de llevar a cabo una PCR en tiempo real, el ARN aislado es sometido a una reacción con una transcriptasa inversa (RT), con lo que puede producirse un ADN complementario (ADNc), que posteriormente puede usarse como sustrato en la amplificación basada en la PCR en tiempo real. La reacción con la RT y la PCR en tiempo real pueden llevarse a cabo de manera consecutiva, en una misma cavidad, y los reactivos correspondientes pueden adquirirse en Invitrogen (Carlsbad, CA). En general, la reacción con la RT y la PCR en tiempo real pueden ponerse en práctica con métodos bien conocidos por aquellos versados en la técnica.

La cantidad del gen (o el ARN) blanco que se determina en la PCR en tiempo real suele normalizarse en función del nivel de expresión de un gen que presenta una expresión constante, tal como el gen que codifica la ciclofilina A. Como alternativa, es posible realizar una cuantificación del ARN total con el reactivo Ribogreen (de Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA), según se describe en Jones, L. J., et al., Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374, donde la fluorescencia obtenida puede determinarse con un instrumento Cytofluor 4000 (de PE Applied Biosystems). La expresión del gen que codifica la ciclofilina A puede cuantificarse sobre la base de una PCR en tiempo real, de manera simultánea con el análisis del blanco o por separado, en una unidad o en varias réplicas.

En todos los procedimientos que se han descripto, suelen emplearse cebadores y sondas que pueden hibridar con los ácidos nucleicos STAT3. En la técnica se conocen diversos métodos para diseñar cebadores y sondas apropiados para poner en práctica una PCR en tiempo real, que pueden incluir el uso de un software como Primer Express (de Applied Biosystems, Foster City, CA).

ANÁLISIS DEL NIVEL DE LAS PROTEÍNAS

La inhibición antisentido de los ácidos nucleicos STAT3 puede evaluarse determinando el nivel de las proteínas STAT3, para lo cual puede recurrirse a diversos procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como la inmunoprecipitación, los análisis de transferencia Western (la inmunotransferencia), los análisis inmunosorbentes ligados a enzimas (ELISA), los análisis cuantitativos de las proteínas, los análisis de la actividad de las proteínas (por ejemplo, el análisis de la actividad de la caspasa), los procedimientos inmunohistoquímicos, los procedimientos inmunocitoquímicos o la clasificación de las células activadas por fluorescencia (FACS). Los anticuerpos dirigidos al blanco pueden identificarse y obtenerse a partir de diversas fuentes, tales como el catálogo de anticuerpos MSRS (de Aerie Corporation, Birmingham, MI), o bien pueden elaborarse con métodos convencionales para generar anticuerpos monoclonales o policlonales, que han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica. Los anticuerpos útiles para detectar las proteínas STAT3 de ratón, de rata, de mono y humanas se encuentran disponibles comercialmente.

ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS ANTISENTIDO IN VIVO

Los compuestos antisentido, por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido, pueden analizarse en animales para determinar su capacidad de inhibir la expresión de STAT3 y de producir cambios en el fenotipo, por ejemplo, una disminución en la velocidad de crecimiento de las células, una mejora de los síntomas asociados al cáncer, una reducción de la caquexia o una disminución en el nivel de los indicadores del cáncer. El análisis podrá llevarse a cabo en animales normales o en animales que sirvan como modelos experimentales de diversas enfermedades. Para administrárselos a los animales, los oligonucleótidos antisentido pueden formularse en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como la solución salina amortiguada con fosfato. La administración puede efectuarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intratecal o intracerebroventricular. Aquellos versados en la técnica han de poder determinar fácilmente la dosis de los oligonucleótidos antisentido y la frecuencia de su administración, en función de factores como la ruta seleccionada para la administración o el peso corporal del animal. Después de un período de tratamiento con los oligonucleótidos antisentido, puede aislarse ARN a partir del tejido hepático para analizar los cambios en la

expresión de los ácidos nucleicos STAT3. También pueden analizarse los cambios en el nivel de las proteínas STAT3.

En determinadas formas de realización, puede recurrirse al uso de modelos basados en el xenoinjerto de tumores para analizar el efecto de los oligonucleótidos antisentido sobre el crecimiento de los tumores o sobre sus metástasis. En los modelos basados en xenoinjertos que se describen en la presente, se inoculan células pertenecientes a una línea cancerosa en un animal. Las líneas que pueden usarse incluyen, por ejemplo, las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231, las células de cáncer epidermoide humano A431, las células de tumores provenientes de gliomas humanos U251 y las células de carcinoma de células pulmonares no pequeñas humano NCI-H460. Los compuestos que se describen en la presente, que pueden usarse en los modelos basados en xenoinjertos que se describen en la presente, pueden estar dirigidos a ácidos nucleicos STAT3 humanos, de ratón, de rata y/o de mono. Algunos de los compuestos que se describen en la presente, que pueden usarse en los modelos basados en xenoinjertos que se describen en la presente, pueden presentar una reacción transversal con ácidos nucleicos STAT3 de una o más especies. En determinadas formas de realización, los compuestos que se describen en la presente, que pueden usarse en los modelos basados en xenoinjertos que se describen en la presente, pueden ser inhibidores más potentes del crecimiento de los tumores y pueden provocar una disminución más importante en el volumen de los tumores que lo que podría esperarse en función de los datos disponibles que se han obtenido en ausencia de una inhibición de STAT3, debido a la falta de reactividad transversal.

INDICACIONES

En determinadas formas de realización, en la presente se proveen métodos, compuestos y composiciones farmacéuticas que son útiles en determinados métodos de tratamiento, particularmente en el tratamiento de aquellos individuos que padecen enfermedades hiperproliferativas. En determinadas formas de realización, la enfermedad hiperproliferativa es un cáncer, por ejemplo, un carcinoma, un sarcoma, un linfoma, una leucemia o un tumor maligno asociado o una metástasis de cualquiera de ellos. En determinadas formas de realización, el cáncer es un cáncer de pulmón, tal como el cáncer de las células pulmonares no pequeñas (NSCLC), un cáncer de páncreas, un cáncer colorrectal, un mieloma múltiple, un carcinoma hepatocelular (HCC), un glioblastoma, un cáncer de ovario, un osteosarcoma, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de mama, un carcinoma epidermoide, un adenoma intestinal, un cáncer de próstata o un cáncer gástrico. En determinadas formas de realización, los individuos se encuentran en riesgo de desarrollar una enfermedad hiperproliferativa, que puede ser un cáncer, por ejemplo, un carcinoma, un sarcoma, un linfoma, una leucemia o un tumor maligno asociado o una metástasis de cualquiera de ellos. Estos individuos pueden presentar uno o más factores de riesgo asociados al desarrollo de una enfermedad hiperproliferativa, tales como una edad avanzada, un historial de uso de tabaco, una exposición excesiva a la luz solar o a la radiación ionizante, un contacto con determinadas sustancias químicas, una infección con determinados virus o con determinadas bacterias, un historial de determinadas terapias hormonales, una predisposición genética, un historial de uso de alcohol o determinados factores de riesgo asociados al estilo de vida, como puede ser el caso de una dieta pobre, un historial de poca actividad física y/o un historial de sobrepeso. En determinadas formas de realización, los individuos son individuos de los que se ha determinado que necesitan un tratamiento para una enfermedad hiperproliferativa. En determinadas formas de realización, se proveen métodos con los que puede disminuirse de manera profiláctica la expresión de STAT3 en un individuo. En determinadas formas de realización, el tratamiento de los individuos que lo necesitan está basado en la administración de una cantidad eficaz para el uso terapéutico de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico STAT3.

En determinadas formas de realización, el tratamiento con los métodos, los compuestos y las composiciones que se describen en la presente es útil para prevenir las metástasis de un cáncer asociado a la regulación positiva de determinados genes, tales como STAT3, en la interfase entre los huesos. En determinadas formas de realización, el tratamiento con los métodos, los compuestos y las composiciones que se describen en la presente es útil para prevenir el desarrollo de metástasis de un cáncer hasta los huesos. En determinadas formas de realización, el tratamiento con los métodos, los compuestos y las composiciones que se describen en la presente es útil para prevenir el desarrollo de metástasis desde un carcinoma de las células renales, un cáncer de mama, un carcinoma de las células pulmonares no pequeñas o un cáncer de próstata hasta los huesos.

En una forma de realización, la administración de una cantidad eficaz para el uso terapéutico de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico STAT3 está acompañada por el monitoreo del nivel de STAT3 en el suero de un individuo, con lo que puede determinarse la respuesta del individuo a la administración del compuesto antisentido. A su vez, la respuesta del individuo a la administración del compuesto antisentido puede ser usada por un médico para determinar la magnitud y la duración de la intervención terapéutica.

En determinadas formas de realización, la administración de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico STAT3 da como resultado una disminución en la expresión de STAT3 de al menos 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%, o de cualquier rango intermedio definido por dos de estos valores. En determinadas formas de realización, la administración de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico STAT3 da como resultado una disminución en el crecimiento de las células, una disminución en el crecimiento de los tumores, una disminución en el tamaño de los tumores,

una mejora en los síntomas asociados a un cáncer o una disminución en el nivel de los indicadores de un cáncer. En determinadas formas de realización, la administración de un compuesto antisentido dirigido a STAT3 da como resultado una disminución en el crecimiento de las células, en el crecimiento de los tumores o en el tamaño de los tumores de al menos 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%, o de cualquier rango intermedio definido por dos de estos valores.

En determinadas formas de realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto antisentido dirigido a STAT3 se usan para elaborar medicamentos útiles para tratar aquellos pacientes que padecen enfermedades hiperproliferativas o que se encuentran en riesgo de contraerlas.

TERAPIAS COMBINADAS

En determinadas formas de realización, se administran una o más composiciones farmacéuticas como las que se describen en la presente de manera concurrente con uno o más agentes farmacéuticos adicionales. En determinadas formas de realización, estos uno o más agentes farmacéuticos adicionales son útiles para tratar las mismas enfermedades, los mismos trastornos o las mismas afecciones que las una o más composiciones farmacéuticas que se describen en la presente. En determinadas formas de realización, estos uno o más agentes farmacéuticos adicionales son útiles para tratar enfermedades, trastornos o afecciones diferentes de las enfermedades, los trastornos o las afecciones que pueden tratarse con las una o más composiciones farmacéuticas que se describen en la presente. En determinadas formas de realización, estos uno o más agentes farmacéuticos adicionales son útiles para tratar los efectos colaterales indeseables de las una o más composiciones farmacéuticas que se describen en la presente. En determinadas formas de realización, se administran una o más composiciones farmacéuticas como las que se describen en la presente de manera concurrente con otros agentes farmacéuticos que son útiles para tratar los efectos indeseables de otros agentes farmacéuticos diferentes. En determinadas formas de realización, se administran una o más composiciones farmacéuticas como las que se describen en la presente de manera concurrente con otros agentes farmacéuticos que son útiles para obtener efectos combinados. En determinadas formas de realización, se administran una o más composiciones farmacéuticas como las que se describen en la presente de manera concurrente con otros agentes farmacéuticos que son útiles para obtener efectos sinérgicos.

En determinadas formas de realización, las una o más composiciones farmacéuticas como las que se describen en la presente se administran de manera simultánea con los uno o más agentes farmacéuticos adicionales. En determinadas formas de realización, las una o más composiciones farmacéuticas como las que se describen en la presente y los uno o más agentes farmacéuticos adicionales se administran en momentos diferentes. En determinadas formas de realización, las una o más composiciones farmacéuticas como las que se describen en la presente y los uno o más agentes farmacéuticos adicionales se preparan en una única formulación. En determinadas formas de realización, las una o más composiciones farmacéuticas como las que se describen en la presente y los uno o más agentes farmacéuticos adicionales se preparan por separado. En determinadas formas de realización, los ejemplos de estos uno o más agentes farmacéuticos adicionales incluyen el ácido retinoico completamente trans, la azacitidina, la azatioprina, la bleomicina, el carboplatino, la capecitabina, el cisplatino, el clorambucil, la ciclofosfamida, la citarabina, la daunorrubicina, el docetaxel, la doxifluridina, la doxorrubicina, la epirrubicina, la epotilona, el etopósido, el fluorouracilo, la gemcitabina, la hidroxiurea, la idarrubicina, el imatinib, la mecloretamina, la mercaptopurina, el metotrexato, la mitoxantrona, el oxaliplatino, el paclitaxel, el pemetrexed, el tenipósido, la tioguanina, la valrrubicina, la vinblastina, la vincristina, la vindesina y la vinorelbina. En determinadas formas de realización, los uno o más agentes farmacéuticos adicionales pueden ser otros oligonucleótidos antisentido. En determinadas formas de realización, los otros oligonucleótidos antisentido también pueden ser oligonucleótidos antisentido dirigidos a STAT3.

En determinadas formas de realización, los uno o más agentes farmacéuticos adicionales pueden tomar la forma de terapias moleculares guiadas. En determinadas formas de realización, la terapia molecular guiada se basa en el uso de un inhibidor del EGFR, de un inhibidor de mTOR, de un inhibidor de HER2 o de un inhibidor del VEGF/VEGFR. En determinadas formas de realización, los inhibidores del EGFR incluyen el gefitinib, el erlotinib, el lapatinib, el cetuximab y el panitumumab. En determinadas formas de realización, los inhibidores de mTOR incluyen el everolimus y el temsirolimus. En determinadas formas de realización, los inhibidores de HER2 incluyen el trastuzumab y el lapatinib. En determinadas formas de realización, los inhibidores del VEGF/VEGFR incluyen el pazopanib, el bevacizumab, el sunitinib y el sorafenib.

En determinadas formas de realización, se administran una o más composiciones farmacéuticas como las que se describen en la presente con una terapia con radiación. En determinadas formas de realización, se administran una o más composiciones farmacéuticas de manera simultánea con una terapia con radiación. En determinadas formas de realización, se administran una o más composiciones farmacéuticas antes de aplicar una terapia con radiación. En determinadas formas de realización, se administran una o más composiciones farmacéuticas después de aplicar una terapia con radiación. En determinadas formas de realización, se administran una o más composiciones farmacéuticas en diversos puntos de tiempo durante el transcurso de un régimen terapéutico con radiación.

En determinadas formas de realización, la terapia con radiación es útil para inhibir el crecimiento de los tumores.

En determinadas formas de realización, la terapia con radiación es útil para incrementar la supervivencia en general. En determinadas formas de realización, la aplicación de una terapia con radiación en combinación con la administración de uno o más fármacos como los que se describen en la presente resulta más ventajosa que cualquiera de estos dos tratamientos por separado, debido a que cuando se los combina es posible limitar tanto la terapia con radiación como la administración de los uno o más fármacos para disminuir su toxicidad, sin que se vea afectada la respuesta antiproliferativa final.

En determinadas formas de realización, el régimen terapéutico, que puede estar basado en la aplicación de una terapia con radiación y la administración de una o más composiciones farmacéuticas como las que se describen en la presente, es determinado por un médico. En determinadas formas de realización, el régimen terapéutico, que puede estar basado en la aplicación de una terapia con radiación, la administración de una o más composiciones farmacéuticas como las que se describen en la presente y la administración de uno o más agentes quimioterapéuticos adicionales, es determinado por un médico.

TOLERABILIDAD

En determinadas formas de realización, los compuestos que se describen en la presente presentan efectos colaterales mínimos. Los efectos colaterales son aquellas respuestas que típicamente no están relacionadas con el efecto sobre la expresión de STAT3 que se producen cuando se administran los compuestos antisentido de acuerdo con la invención, como es el caso de las respuestas inflamatorias en los animales. En determinadas formas de realización, los compuestos pueden ser bien tolerados por los animales. Una tolerabilidad superior puede atribuirse a numerosos factores, tales como la secuencia de nucleótidos de los compuestos antisentido, las modificaciones químicas en los nucleótidos, los motivos particulares que forman los nucleósidos no modificados y los nucleósidos modificados en los compuestos antisentido o cualquier combinación de los anteriores. La tolerabilidad propiamente dicha también puede depender de factores como el peso corporal, el peso de los órganos, la función del hígado, la función de los riñones, el conteo de plaquetas o el conteo de leucocitos.

En determinadas formas de realización, los compuestos que se describen en la presente presentan un efecto mínimo sobre el peso de los órganos. En determinadas formas de realización, los compuestos dan como resultado un incremento de menos de 7 veces, menos de 6 veces, menos de 5 veces, menos de 4 veces, menos de 3 veces o menos de 2 veces en el peso del bazo y/o del hígado, o directamente no provocan un incremento significativo.

En determinadas formas de realización, los compuestos que se describen en la presente presentan un efecto mínimo sobre la función del hígado. Los factores en los que puede basarse el análisis de la función del hígado incluyen el nivel de ALT, el nivel de AST, el nivel de la bilirrubina en el plasma y el nivel de la albúmina en el plasma. En determinadas formas de realización los compuestos que se describen en la presente dan como resultado un incremento de menos de 7 veces, menos de 6 veces, menos de 5 veces, menos de 4 veces, menos de 3 veces o menos de 2 veces en el nivel de ALT o de AST, o directamente no provocan un incremento significativo. En determinadas formas de realización los compuestos que se describen en la presente dan como resultado un incremento de menos de 3 veces o menos de 2 veces en el nivel de la bilirrubina en el plasma, o directamente no provocan un incremento significativo.

En determinadas formas de realización, los compuestos que se describen en la presente presentan un efecto mínimo sobre la función de los riñones. En determinadas formas de realización, los compuestos que se describen en la presente dan como resultado un incremento de menos de 3 veces o menos de 2 veces en la concentración del nitrógeno proveniente de la urea en la sangre (BUN), o directamente no provocan un incremento significativo. En determinadas formas de realización, los compuestos que se describen en la presente dan como resultado un incremento de menos de 6 veces, menos de 5 veces, menos de 4 veces, menos de 3 veces o menos de 2 veces en la proporción entre las proteínas y la creatinina en la orina, o directamente no provocan un incremento significativo.

En determinadas formas de realización, los compuestos que se describen en la presente presentan un efecto mínimo sobre los factores hematológicos. En determinadas formas de realización, los compuestos que se describen en la presente dan como resultado una disminución inferior a 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% o 5% en el conteo de plaquetas. En determinadas formas de realización, los compuestos que se describen en la presente dan como resultado una disminución de menos de 4 veces, menos de 3 veces, menos de 2 veces en el conteo de monocitos, o directamente no provocan una disminución significativa.

En determinadas formas de realización, los compuestos también presentan una farmacocinética favorable. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido presentan vidas medias relativamente prolongadas en los fluidos o los tejidos biológicos relevantes.

En determinadas formas de realización, los compuestos o las composiciones que los comprenden también presentan una viscosidad favorable. En determinadas formas de realización, la viscosidad de los compuestos o de las composiciones que los comprenden en una concentración de 165-185 mg/ml no supera los 40cP.

En otras formas de realización, los compuestos presentan una combinación de las características que se enumeraron con anterioridad y también dan como resultado una disminución altamente eficiente en la expresión del ARNm de STAT3 en un modelo basado en animales.

Ejemplos

DIVULGACIÓN NO LIMITANTE E INCORPORACIÓN POR REFERENCIA

Mientras que ciertos compuestos, composiciones y métodos que se describen en la presente se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas formas de realización, los siguientes ejemplos sirven solo para ilustrar los compuestos que se describen en la presente y no pretenden limitar a los mismos.

EJEMPLO 1: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DE STAT3 HUMANA EN CÉLULAS HUVEC

Se diseñaron oligonucleótidos antisentido contra un ácido nucleico de STAT3 humana y se probaron para su efecto sobre la expresión del ARNm de STAT3 humana *in vitro*. Los oligonucleótidos antisentido quiméricos que se presentan en las Tablas 1 y 2 se diseñaron ya sea como gápmeros cEt 2-10-2 o bien como gápmeros cEt 3-10-3. Los gápmeros cEt 2-10-2 son de 14 nucleótidos de longitud, en donde el segmento espaciador central comprende diez 2'-desoxinucleósidos y está flanqueado a ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por extensiones que comprenden dos nucleósidos cada una. Los gápmeros cEt 3-10-3 tienen 16 nucleósidos de longitud, en donde el segmento espaciador central comprende diez 2'-desoxinucleósidos y está flanqueado a ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por extensiones que comprenden tres nucleósidos cada una. Cada nucleósido en el segmento extensión 5' y cada nucleósido en el segmento extensión 3' tiene una modificación de azúcar de cEt. Las uniones internucleosídicas a lo largo de cada gápmero son uniones fosforotioato (P=S). Todos los residuos de citosina a lo largo de cada gápmero son 5-metilcitosinas.

Se comparó la potencia de los gápmeros cEt con ISIS 337332, ISIS 337333, e ISIS 345785, que son gápmeros MOE 5-10-5 contra STAT3 humana y que se describen adicionalmente en USPN 7,307,069.

Las células HuVEC cultivadas a una densidad de 20,000 células por pocillo se transfectaron usando electroporación con 1,000 nM de oligonucleótido antisentido. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de cebadores y sonda para humano RTS199 (secuencia directa ACATGCCACTTTGGTGTTTCATAA, designada en la presente como SEQ ID Nº 6; secuencia reversa TCTTCGTAGATTGTGCTGATAGAGAAC, designada en la presente como SEQ ID Nº 7; secuencia de sonda CAGTATAGCCGCTTCCTGCAAGAGTCGAA, designada en la presente como SEQ ID Nº 8) se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar. Todos los gápmeros cEt y gápmeros MOE se probaron bajo las mismas condiciones.

"Sitio de inicio de blanco en humano" indica el nucleósido ubicado más hacia 5' contra el que está dirigido el gápmero en la secuencia génica humana. "Sitio de finalización de blanco en humano" indica el nucleósido ubicado más hacia 3' contra el que está dirigido el gápmero en la secuencia génica humana. Cada gápmero que se lista en la Tabla 1 se dirige contra el ARNm de STAT3 humana, designada en la presente como SEQ ID Nº 1 (No. de Acceso a GENBANK NM_139276.2). Cada gápmero que se lista en la Tabla 2 se dirige contra la secuencia genómica de STAT3 humana, designada en la presente como SEQ ID Nº 2 (el complemento del No. de Acceso a GENBANK NT_010755.14 truncado entre los nucleótidos 4185000 y 4264000).

TABLA 1

Niveles de inhibición del ARNm de STAT3 humana por oligonucleótidos antisentido quiméricos cEt y MOE contra la SEQ ID Nº 1

ISIS N°	Sitio de inicio en Humano	Sitio de Finalización en Humano	Secuencia	Motivo	Química del Extensión	% de inhibición	SEQ ID Nº
481350	76	91	TCCAGGATCCGGTTGG	3-10-3	cEt	52	9
481575	77	90	CCAGGATCCGGTTG	2-10-2	cEt	41	10
481351	132	147	GGCCGAAGGGCCTCTC	3-10-3	cEt	14	11
481576	133	146	GCCGAAGGGCCTCT	2-10-2	cEt	8	12
481352	225	240	CCTGCTAAAATCAGGG	3-10-3	cEt	15	13
481577	226	239	CTGCTAAAATCAGG	2-10-2	cEt	12	14
481353	240	255	ATTCCATTGGGCCATC	3-10-3	cEt	78	15
481578	241	254	TTCCATTGGGCCAT	2-10-2	cEt	51	16
481354	264	279	CCGTGTGTCAAGCTGC	3-10-3	cEt	98	17
481579	265	278	CGTGTGTCAAGCTG	2-10-2	cEt	91	18
481355	322	337	ACTGCCGCAGCTCCAT	3-10-3	cEt	95	19
481580	323	336	CTGCCGCAGCTCCA	2-10-2	cEt	76	20
481356	346	361	GACTCTCAATCCAAGG	3-10-3	cEt	83	21
481581	347	360	ACTCTCAATCCAAG	2-10-2	cEt	31	22
481357	375	390	TTCTTTGCTGGCCGCA	3-10-3	cEt	97	23
481582	376	389	TCTTTGCTGGCCGC	2-10-2	cEt	87	24
481358	403	418	GATTATGAAACACCAA	3-10-3	cEt	85	25
481583	404	417	ATTATGAAACACCA	2-10-2	cEt	20	26
481359	429	444	ATACTGCTGGTCAATC	3-10-3	cEt	90	27

481584	430	443	TACTGCTGGTCAAT	2-10-2	cEt	42	28
481360	459	474	GAGAACATTCGACTCT	3-10-3	cEt	75	29
481585	460	473	AGAACATTCGACTC	2-10-2	cEt	77	30
481361	474	489	TAGATTGTGCTGATAG	3-10-3	cEt	90	31
481586	475	488	AGATTGTGCTGATA	2-10-2	cEt	81	32
481362	490	505	ACTGCTTGATTCTTCG	3-10-3	cEt	59	33
481587	491	504	CTGCTTGATTCTTC	2-10-2	cEt	23	34
481363	511	526	CAAGATACCTGCTCTG	3-10-3	cEt	84	35
481588	512	525	AAGATACCTGCTCT	2-10-2	cEt	58	36
481364	542	557	GCCACAATCCGGGCAA	3-10-3	cEt	36	37
481589	543	556	CCACAATCCGGGCA	2-10-2	cEt	69	38
481365	589	604	CAGTGGCTGCAGTCTG	3-10-3	cEt	36	39
481590	590	603	AGTGGCTGCAGTCT	2-10-2	cEt	30	40
481366	607	622	GGCCCCCTTGCTGGGC	3-10-3	cEt	1	41
481591	608	621	GCCCCCTTGCTGGG	2-10-2	cEt	0	42
481367	638	653	GTCACCACGGCTGCTG	3-10-3	cEt	70	43
481592	639	652	TCACCACGGCTGCT	2-10-2	cEt	48	44
481368	659	674	TCCAGCATCTGCTGCT	3-10-3	cEt	81	45
481593	660	673	CCAGCATCTGCTGC	2-10-2	cEt	46	46
481369	675	690	ATCCTGAAGGTGCTGC	3-10-3	cEt	29	47
481594	676	689	TCCTGAAGGTGCTG	2-10-2	cEt	16	48
481370	701	716	TCTAGATCCTGCACTC	3-10-3	cEt	79	49
481595	702	715	CTAGATCCTGCACT	2-10-2	cEt	47	50

481371	709	724	TTTTCTGTTCTAGATC	3-10-3	cEt	83	51
481596	710	723	TTTCTGTTCTAGAT	2-10-2	cEt	48	52
481372	730	745	GGAGATTCTCTACCAC	3-10-3	cEt	85	53
481597	731	744	GAGATTCTCTACCA	2-10-2	cEt	80	54
481373	751	766	AGTTGAAATCAAAGTC	3-10-3	cEt	87	55
481598	752	765	GTTGAAATCAAAGT	2-10-2	cEt	6	56
481374	788	803	AGATCTTGCATGTCTC	3-10-3	cEt	92	57
481599	789	802	GATCTTGCATGTCT	2-10-2	cEt	51	58
481375	799	814	TGTTTCCATTCAGATC	3-10-3	cEt	65	59
481600	800	813	GTTTCCATTCAGAT	2-10-2	cEt	42	60
481376	868	883	TCCGCATCTGGTCCAG	3-10-3	cEt	82	61
481601	869	882	CCGCATCTGGTCCA	2-10-2	cEt	70	62
481785	872	885	TCTCCGCATCTGGT	2-10-2	cEt	28	63
481377	884	899	TCACTCACGATGCTTC	3-10-3	cEt	85	64
481602	885	898	CACTCACGATGCTT	2-10-2	cEt	55	65
481378	892	907	CCGCCAGCTCACTCAC	3-10-3	cEt	89	66
481603	893	906	CGCCAGCTCACTCA	2-10-2	cEt	60	67
481379	955	970	TCCAGTCAGCCAGCTC	3-10-3	cEt	91	68
481604	956	969	CCAGTCAGCCAGCT	2-10-2	cEt	70	69
481380	963	978	CCGCCTCTTCCAGTCA	3-10-3	cEt	73	70
481605	964	977	CGCCTCTTCCAGTC	2-10-2	cEt	55	71
481381	1010	1025	CGATCTAGGCAGATGT	3-10-3	cEt	26	72
481606	1011	1024	GATCTAGGCAGATG	2-10-2	cEt	35	73

481382	1045	1060	GAGATTCTGCTAATGA	3-10-3	cEt	81	74
481607	1046	1059	AGATTCTGCTAATG	2-10-2	cEt	51	75
481383	1053	1068	CTGAAGTTGAGATTCT	3-10-3	cEt	84	76
481608	1054	1067	TGAAGTTGAGATTC	2-10-2	cEt	26	77
481384	1098	1113	AACTTTTTGCTGCAAC	3-10-3	cEt	76	78
481609	1099	1112	ACTTTTTGCTGCAA	2-10-2	cEt	34	79
481385	1113	1128	GTCCCCTTTGTAGGAA	3-10-3	cEt	41	80
481610	1114	1127	TCCCCTTTGTAGGA	2-10-2	cEt	37	81
481386	1186	1201	AGGCACTTTTCATTAA	3-10-3	cEt	45	82
481611	1187	1200	GGCACTTTTCATTA	2-10-2	cEt	32	83
481387	1225	1240	CAGGATGCATGGGCAT	3-10-3	cEt	92	84
481612	1226	1239	AGGATGCATGGGCA	2-10-2	cEt	86	85
481388	1269	1284	TTTAGTAGTGAACTGG	3-10-3	cEt	74	86
481613	1270	1283	TTAGTAGTGAACTG	2-10-2	cEt	22	87
481389	1282	1297	CCAGCAACCTGACTTT	3-10-3	cEt	66	88
481614	1283	1296	CAGCAACCTGACTT	2-10-2	cEt	34	89
481390	1305	1320	ATAATTCAACTCAGGG	3-10-3	cEt	92	90
481615	1306	1319	TAATTCAACTCAGG	2-10-2	cEt	48	91
481391	1314	1329	TTTAAGCTGATAATTC	3-10-3	cEt	44	92
481616	1315	1328	TTAAGCTGATAATT	2-10-2	cEt	0	93
481392	1326	1341	GCACACTTTAATTTTA	3-10-3	cEt	49	94
481617	1327	1340	CACACTTTAATTTT	2-10-2	cEt	1	95
481393	1347	1362	GTCCCCAGAGTCTTTG	3-10-3	cEt	39	96

481618	1348	1361	TCCCCAGAGTCTTT	2-10-2	cEt	41	97
481394	1437	1452	GAGGCTGCCGTTGTTG	3-10-3	cEt	62	98
481619	1438	1451	AGGCTGCCGTTGTT	2-10-2	cEt	29	99
481395	1468	1483	CCCTCAGGGTCAAGTG	3-10-3	cEt	72	100
481620	1469	1482	CCTCAGGGTCAAGT	2-10-2	cEt	37	101
481396	1480	1495	CACATCTCTGCTCCCT	3-10-3	cEt	92	102
481621	1481	1494	ACATCTCTGCTCCC	2-10-2	cEt	74	103
481397	1517	1532	ATCAGGGAAGCATCAC	3-10-3	cEt	59	104
481622	1518	1531	TCAGGGAAGCATCA	2-10-2	cEt	49	105
481398	1542	1557	GATCAGGTGCAGCTCC	3-10-3	cEt	73	106
481623	1543	1556	ATCAGGTGCAGCTC	2-10-2	cEt	40	107
481399	1563	1578	ATACACCTCGGTCTCA	3-10-3	cEt	73	108
481624	1564	1577	TACACCTCGGTCTC	2-10-2	cEt	43	109
481400	1579	1594	TCTTGAGGCCTTGGTG	3-10-3	cEt	47	110
481625	1580	1593	CTTGAGGCCTTGGT	2-10-2	cEt	16	111
481401	1589	1604	TCTAGGTCAATCTTGA	3-10-3	cEt	74	112
481626	1590	1603	CTAGGTCAATCTTG	2-10-2	cEt	54	113
481402	1599	1614	GGAGTGGGTCTCTAGG	3-10-3	cEt	52	114
481627	1600	1613	GAGTGGGTCTCTAG	2-10-2	cEt	13	115
481789	1604	1617	CAAGGAGTGGGTCT	2-10-2	cEt	10	116
481403	1607	1622	ACTGGCAAGGAGTGGG	3-10-3	cEt	58	117
481628	1608	1621	CTGGCAAGGAGTGG	2-10-2	cEt	38	118
481404	1633	1648	TCTGACAGATGTTGGA	3-10-3	cEt	50	119

481629	1634	1647	CTGACAGATGTTGG	2-10-2	cEt	64	120
481405	1641	1656	ATTTGGCATCTGACAG	3-10-3	cEt	75	121
481630	1642	1655	TTTGGCATCTGACA	2-10-2	cEt	39	122
481406	1691	1706	TTCTTGGGATTGTTGG	3-10-3	cEt	72	123
481631	1692	1705	TCTTGGGATTGTTG	2-10-2	cEt	33	124
481407	1729	1744	CCCAGGTTCCAATTGG	3-10-3	cEt	50	125
481632	1730	1743	CCAGGTTCCAATTG	2-10-2	cEt	32	126
481408	1780	1795	CTCGCTTGGTGGTGGA	3-10-3	cEt	53	127
481633	1781	1794	TCGCTTGGTGGTGG	2-10-2	cEt	35	128
481409	1795	1810	GCTCGATGCTCAGTCC	3-10-3	cEt	86	129
481634	1796	1809	CTCGATGCTCAGTC	2-10-2	cEt	43	130
481410	1825	1840	CCAAGAGTTTCTCTGC	3-10-3	cEt	91	131
481635	1826	1839	CAAGAGTTTCTCTG	2-10-2	cEt	43	132
481411	1840	1855	AATTCACACCAGGTCC	3-10-3	cEt	72	133
481636	1841	1854	ATTCACACCAGGTC	2-10-2	cEt	42	134
481412	1858	1873	TGATCTGACACCCTGA	3-10-3	cEt	90	135
481637	1859	1872	GATCTGACACCCTG	2-10-2	cEt	79	136
481413	1866	1881	AGCCCATGTGATCTGA	3-10-3	cEt	80	137
481638	1867	1880	GCCCATGTGATCTG	2-10-2	cEt	64	138
481414	1888	1903	CCATGTTTTCTTTGCA	3-10-3	cEt	69	139
481639	1889	1902	CATGTTTTCTTTGC	2-10-2	cEt	16	140
481415	1896	1911	CTTGCCAGCCATGTTT	3-10-3	cEt	88	141
481640	1897	1910	TTGCCAGCCATGTT	2-10-2	cEt	57	142

337332	1898	1917	GAAGCCCTTGCCAGCCATGT	5-10-5	MOE	63	143
481416	1901	1916	AAGCCCTTGCCAGCCA	3-10-3	cEt	87	144
481641	1902	1915	AGCCCTTGCCAGCC	2-10-2	cEt	68	145
337333	1903	1922	AAGGAGAAGCCCTTGCCAGC	5-10-5	MOE	49	146
481417	1903	1918	AGAAGCCCTTGCCAGC	3-10-3	cEt	97	147
481418	1904	1919	GAGAAGCCCTTGCCAG	3-10-3	cEt	92	148
481642	1904	1917	GAAGCCCTTGCCAG	2-10-2	cEt	67	149
481419	1905	1920	GGAGAAGCCCTTGCCA	3-10-3	cEt	83	150
481643	1905	1918	AGAAGCCCTTGCCA	2-10-2	cEt	58	151
481644	1906	1919	GAGAAGCCCTTGCC	2-10-2	cEt	45	152
481420	1948	1963	ACTTTTTTCACAAGGTC	3-10-3	cEt	94	153
481645	1949	1962	CTTTTTCACAAGGT	2-10-2	cEt	50	154
481421	2021	2036	CTCAAGATGGCCCGCT	3-10-3	cEt	86	155
481646	2022	2035	TCAAGATGGCCCGC	2-10-2	cEt	41	156
481422	2036	2051	CCTGGAGGCTTAGTGC	3-10-3	cEt	80	157
481647	2037	2050	CTGGAGGCTTAGTG	2-10-2	cEt	0	158
481423	2077	2092	CTCCTTCTTTGCTGCT	3-10-3	cEt	69	159
481648	2078	2091	TCCTTCTTTGCTGC	2-10-2	cEt	51	160
481424	2093	2108	CAAGTGAAAGTGACGC	3-10-3	cEt	70	161
481649	2094	2107	AAGTGAAAGTGACG	2-10-2	cEt	25	162
481425	2115	2130	ACCGCTGATGTCCTTC	3-10-3	cEt	78	163
481650	2116	2129	CCGCTGATGTCCTT	2-10-2	cEt	79	164
481426	2131	2146	ACTGGATCTGGGTCTT	3-10-3	cEt	80	165

481651	2132	2145	CTGGATCTGGGTCT	2-10-2	cEt	64	166
481427	2155	2170	GCTGCTTTGTGTATGG	3-10-3	cEt	75	167
481652	2156	2169	CTGCTTTGTGTATG	2-10-2	cEt	82	168
481428	2164	2179	TGTTCAGCTGCTGCTT	3-10-3	cEt	77	169
481653	2165	2178	GTTCAGCTGCTGCT	2-10-2	cEt	79	170
481429	2172	2187	TGACATGTTGTTCAGC	3-10-3	cEt	84	171
481654	2173	2186	GACATGTTGTTCAG	2-10-2	cEt	70	172
481430	2190	2205	CATGATGATTTCAGCA	3-10-3	cEt	67	173
481655	2191	2204	ATGATGATTTCAGC	2-10-2	cEt	31	174
481431	2206	2221	CCATGATCTTATAGCC	3-10-3	cEt	91	175
481656	2207	2220	CATGATCTTATAGC	2-10-2	cEt	0	176
481432	2233	2248	GTGGAGACACCAGGAT	3-10-3	cEt	55	177
481657	2234	2247	TGGAGACACCAGGA	2-10-2	cEt	58	178
481433	2256	2271	AATGTCAGGATAGAGA	3-10-3	cEt	73	179
481658	2257	2270	ATGTCAGGATAGAG	2-10-2	cEt	62	180
481434	2266	2281	CCTCCTTGGGAATGTC	3-10-3	cEt	73	181
345785	2267	2286	TGCCTCCTCCTTGGGAATGT	5-10-5	MOE	50	182
481659	2267	2280	CTCCTTGGGAATGT	2-10-2	cEt	51	183
481435	2269	2284	CCTCCTCCTTGGGAAT	3-10-3	cEt	49	184
481660	2270	2283	CTCCTCCTTGGGAA	2-10-2	cEt	54	185
481436	2275	2290	CGAATGCCTCCTCCTT	3-10-3	cEt	82	186
481661	2276	2289	GAATGCCTCCTCCT	2-10-2	cEt	76	187
481437	2296	2311	TCTCTGGCCGACAATA	3-10-3	cEt	49	188

481662	2297	2310	CTCTGGCCGACAAT	2-10-2	cEt	43	189
481438	2353	2368	ACTTGGTCTTCAGGTA	3-10-3	cEt	51	190
481663	2354	2367	CTTGGTCTTCAGGT	2-10-2	cEt	52	191
481439	2371	2386	TTGGTGTCACACAGAT	3-10-3	cEt	82	192
481664	2372	2385	TGGTGTCACACAGA	2-10-2	cEt	89	193
481440	2387	2402	GTATTGCTGCAGGTCG	3-10-3	cEt	79	194
481665	2388	2401	TATTGCTGCAGGTC	2-10-2	cEt	43	195
481441	2395	2410	GGTCAATGGTATTGCT	3-10-3	cEt	55	196
481666	2396	2409	GTCAATGGTATTGC	2-10-2	cEt	36	197
481442	2403	2418	CATCGGCAGGTCAATG	3-10-3	cEt	44	198
481667	2404	2417	ATCGGCAGGTCAAT	2-10-2	cEt	31	199
481443	2423	2438	GAATCTAAAGTGCGGG	3-10-3	cEt	78	200
481668	2424	2437	AATCTAAAGTGCGG	2-10-2	cEt	41	201
481444	2431	2446	GCATCAATGAATCTAA	3-10-3	cEt	66	202
481669	2432	2445	CATCAATGAATCTA	2-10-2	cEt	0	203
481445	2439	2454	TCCAAACTGCATCAAT	3-10-3	cEt	70	204
481670	2440	2453	CCAAACTGCATCAA	2-10-2	cEt	60	205
481446	2460	2475	TTCAGCACCTTCACCA	3-10-3	cEt	44	206
481671	2461	2474	TCAGCACCTTCACC	2-10-2	cEt	41	207
481447	2476	2491	GCCCTCCTGCTGAGGG	3-10-3	cEt	10	208
481672	2477	2490	CCCTCCTGCTGAGG	2-10-2	cEt	15	209
481448	2484	2499	CTCAAACTGCCCTCCT	3-10-3	cEt	29	210
481797	2484	2497	CAAACTGCCCTCCT	2-10-2	cEt	11	211

481673	2485	2498	TCAAACTGCCCTCC	2-10-2	cEt	33	212
481449	2503	2518	CCATGTCAAAGGTGAG	3-10-3	cEt	77	213
481674	2504	2517	CATGTCAAAGGTGA	2-10-2	cEt	31	214
481450	2530	2545	GGGAGGTAGCGCACTC	3-10-3	cEt	53	215
481675	2531	2544	GGAGGTAGCGCACT	2-10-2	cEt	41	216
481451	2592	2607	GAATGCAGGTAGGCGC	3-10-3	cEt	55	217
481676	2593	2606	AATGCAGGTAGGCG	2-10-2	cEt	39	218
481452	2631	2646	TTTCAGATGATCTGGG	3-10-3	cEt	71	219
481677	2632	2645	TTCAGATGATCTGG	2-10-2	cEt	38	220
481574	2650	2665	GGAACCACAAAGTTAG	3-10-3	cEt	69	221
481799	2651	2664	GAACCACAAAGTTA	2-10-2	cEt	50	222
481453	2681	2696	GATAGCAGAAGTAGGA	3-10-3	cEt	92	223
481678	2682	2695	ATAGCAGAAGTAGG	2-10-2	cEt	78	224
481454	2702	2717	AAAGTGCCCAGATTGC	3-10-3	cEt	85	225
481679	2703	2716	AAGTGCCCAGATTG	2-10-2	cEt	69	226
481455	2722	2737	CACTCATTTCTCTATT	3-10-3	cEt	74	227
481680	2723	2736	ACTCATTTCTCTAT	2-10-2	cEt	39	228
481456	2767	2782	AACACATCCTTATTTG	3-10-3	cEt	48	229
481681	2768	2781	ACACATCCTTATTT	2-10-2	cEt	47	230
481457	2779	2794	TGGGTCTCAGAGAACA	3-10-3	cEt	88	231
481682	2780	2793	GGGTCTCAGAGAAC	2-10-2	cEt	77	232
481458	2832	2847	CAAGACATTTCCTTTT	3-10-3	cEt	54	233
481683	2833	2846	AAGACATTTCCTTT	2-10-2	cEt	29	234

481459	2908	2923	GGAGGCACTTGTCTAA	3-10-3	cEt	76	235
481684	2909	2922	GAGGCACTTGTCTA	2-10-2	cEt	89	236
481460	2943	2958	TTACAGAAACAGGCAG	3-10-3	cEt	83	237
481685	2944	2957	TACAGAAACAGGCA	2-10-2	cEt	36	238
481461	2969	2984	AGCTATAGGTGGCCTG	3-10-3	cEt	75	239
481686	2970	2983	GCTATAGGTGGCCT	2-10-2	cEt	70	240
481462	2984	2999	ATGCCAGGAGTATGTA	3-10-3	cEt	89	241
481687	2985	2998	TGCCAGGAGTATGT	2-10-2	cEt	80	242
481463	3001	3016	CAAGGTTAAAAAGTGC	3-10-3	cEt	88	243
481688	3002	3015	AAGGTTAAAAAGTG	2-10-2	cEt	13	244
481464	3016	3031	CTATTTGGATGTCAGC	3-10-3	cEt	97	245
481689	3017	3030	TATTTGGATGTCAG	2-10-2	cEt	40	246
481465	3032	3047	TAGATAGTCCTATCTT	3-10-3	cEt	51	247
481690	3033	3046	AGATAGTCCTATCT	2-10-2	cEt	64	248
481466	3047	3062	AAGAAACCTAGGGCTT	3-10-3	cEt	74	249
481691	3048	3061	AGAAACCTAGGGCT	2-10-2	cEt	77	250
481467	3097	3112	GCTGATACAGTGTTTT	3-10-3	cEt	74	251
481692	3098	3111	CTGATACAGTGTTT	2-10-2	cEt	74	252
481468	3112	3127	ATACAGAAAGGCTATG	3-10-3	cEt	71	253
481693	3113	3126	TACAGAAAGGCTAT	2-10-2	cEt	25	254
481469	3127	3142	GCTTAAGTTTCTTAAA	3-10-3	cEt	61	255
481694	3128	3141	CTTAAGTTTCTTAA	2-10-2	cEt	0	256
481470	3461	3476	AGCACCAAGGAGGCTG	3-10-3	cEt	49	257

481695	3462	3475	GCACCAAGGAGGCT	2-10-2 cEt	83		258
481471	3476	3491	AAGCTGAATGCTTAAA	3-10-3 cEt	36		259
481696	3477	3490	AGCTGAATGCTTAA	2-10-2 cEt	33		260
481472	3491	3506	TTACCAGCCTGAAGGA	3-10-3 cEt	76		261
481697	3492	3505	TACCAGCCTGAAGG	2-10-2 cEt	63		262
481473	3506	3521	CAGGGATTATATAAAT	3-10-3 cEt	53		263
481698	3507	3520	AGGGATTATATAAA	2-10-2 cEt	15		264
481474	3521	3536	ACCTGAAGCCCGTTTC	3-10-3 cEt	80		265
481699	3522	3535	CCTGAAGCCCGTTT	2-10-2 cEt	57		266
481475	3536	3551	TGTCTTAAGGGTTTGA	3-10-3 cEt	93		267
481700	3537	3550	GTCTTAAGGGTTTG	2-10-2 cEt	89		268
481476	3551	3566	GGTTGCAGCTTCAGAT	3-10-3 cEt	92		269
481701	3552	3565	GTTGCAGCTTCAGA	2-10-2 cEt	60		270
481477	3567	3582	TCAACACCAAAGGCCA	3-10-3 cEt	95		271
481702	3568	3581	CAACACCAAAGGCC	2-10-2 cEt	89		272
481478	3585	3600	TCCTTAAACCTTCCTA	3-10-3 cEt	84		273
481703	3586	3599	CCTTAAACCTTCCT	2-10-2 cEt	57		274
481479	3600	3615	AAAATGCTTAGATTCT	3-10-3 cEt	80		275
481704	3601	3614	AAATGCTTAGATTC	2-10-2 cEt	32		276
481480	3628	3643	AAATAAGTCTATTTAT	3-10-3 cEt	5		277
481705	3629	3642	AATAAGTCTATTTA	2-10-2 cEt	25		278
481481	3648	3663	GGCCAATACATTACAA	3-10-3 cEt	63		279
481706	3649	3662	GCCAATACATTACA	2-10-2 cEt	56		280

481482	3670	3685	TGCCCAGCCTTACTCA	3-10-3	cEt	55	281
481707	3671	3684	GCCCAGCCTTACTC	2-10-2	cEt	43	282
481483	3685	3700	GTTGTAAGCACCCTCT	3-10-3	cEt	1	283
481708	3686	3699	TTGTAAGCACCCTC	2-10-2	cEt	56	284
481484	3700	3715	AGAAAGGGAGTCAAGG	3-10-3	cEt	60	285
481709	3701	3714	GAAAGGGAGTCAAG	2-10-2	cEt	27	286
481485	3717	3732	GCAGATCAAGTCCAGG	3-10-3	cEt	90	287
481710	3718	3731	CAGATCAAGTCCAG	2-10-2	cEt	88	288
481486	3730	3745	AGCCTCTGAAACAGCA	3-10-3	cEt	75	289
481711	3731	3744	GCCTCTGAAACAGC	2-10-2	cEt	74	290
481487	3746	3761	CCCACAGAAACAACCT	3-10-3	cEt	66	291
481712	3747	3760	CCACAGAAACAACC	2-10-2	cEt	45	292
481488	3761	3776	AGCCCTGATAAGGCAC	3-10-3	cEt	23	293
481713	3762	3775	GCCCTGATAAGGCA	2-10-2	cEt	18	294
481489	3776	3791	AATCAGAAGTATCCCA	3-10-3	cEt	60	295
481714	3777	3790	ATCAGAAGTATCCC	2-10-2	cEt	43	296
481490	3833	3848	GCCTCTAGCAGGATCA	3-10-3	cEt	78	297
481715	3834	3847	CCTCTAGCAGGATC	2-10-2	cEt	79	298
481491	3848	3863	CACGCAAGGAGACATG	3-10-3	cEt	70	299
481716	3849	3862	ACGCAAGGAGACAT	2-10-2	cEt	68	300
481492	3863	3878	TGAGGGACCTTTAGAC	3-10-3	cEt	61	301
481717	3864	3877	GAGGGACCTTTAGA	2-10-2	cEt	44	302
481493	3886	3901	CAGGATTCCTAAAACA	3-10-3	cEt	43	303

481718	3887	3900	AGGATTCCTAAAAC	2-10-2	cEt	7	304
481494	3901	3916	ATGAGGTCCTGAGACC	3-10-3	cEt	60	305
481719	3902	3915	TGAGGTCCTGAGAC	2-10-2	cEt	29	306
481495	3940	3955	CATCATGTCCAACCTG	3-10-3	cEt	92	307
481720	3941	3954	ATCATGTCCAACCT	2-10-2	cEt	63	308
481496	3955	3970	GGGCCCCATAGTGTGC	3-10-3	cEt	29	309
481721	3956	3969	GGCCCCATAGTGTG	2-10-2	cEt	19	310
481497	3977	3992	AGCTCAACCAGACACG	3-10-3	cEt	67	311
481722	3978	3991	GCTCAACCAGACAC	2-10-2	cEt	69	312
481498	3992	4007	GAACCATATTCCCTGA	3-10-3	cEt	90	313
481723	3993	4006	AACCATATTCCCTG	2-10-2	cEt	49	314
481499	4007	4022	CAAGAAACTGGCTAAG	3-10-3	cEt	43	315
481724	4008	4021	AAGAAACTGGCTAA	2-10-2	cEt	17	316
481500	4022	4037	GCCACTGGATATCACC	3-10-3	cEt	92	317
481501	4048	4063	AACTGAATGAAGACGC	3-10-3	cEt	91	318
481726	4049	4062	ACTGAATGAAGACG	2-10-2	cEt	56	319
481502	4063	4078	CCTTTGCCCTGCATGA	3-10-3	cEt	85	320
481727	4064	4077	CTTTGCCCTGCATG	2-10-2	cEt	70	321
481503	4078	4093	AAGTTTATCAGTAAGC	3-10-3	cEt	57	322
481728	4079	4092	AGTTTATCAGTAAG	2-10-2	cEt	22	323
481504	4093	4108	TACGAGGGCAGACTCA	3-10-3	cEt	60	324
481729	4094	4107	ACGAGGGCAGACTC	2-10-2	cEt	22	325
481505	4108	4123	AGGTATACACCCTCAT	3-10-3	cEt	45	326

481730	4109	4122	GGTATACACCCTCA	2-10-2	cEt	47	327
481506	4123	4138	CCTCAGAGGGAGGCCA	3-10-3	cEt	32	328
481731	4124	4137	CTCAGAGGGAGGCC	2-10-2	cEt	0	329
481507	4138	4153	GGGAGGAGTCACCAGC	3-10-3	cEt	64	330
481732	4139	4152	GGAGGAGTCACCAG	2-10-2	cEt	59	331
481508	4205	4220	TAGCCAGCCAAGGCGG	3-10-3	cEt	33	332
481733	4206	4219	AGCCAGCCAAGGCG	2-10-2	cEt	50	333
481509	4220	4235	ACAGGAGAGGCGAGCT	3-10-3	cEt	46	334
481734	4221	4234	CAGGAGAGGCGAGC	2-10-2	cEt	28	335
481510	4237	4252	TAGGTGTTCCCATACG	3-10-3	cEt	95	336
481735	4238	4251	AGGTGTTCCCATAC	2-10-2	cEt	22	337
481511	4258	4273	GGCAGCCCATCCAGCA	3-10-3	cEt	43	338
481736	4259	4272	GCAGCCCATCCAGC	2-10-2	cEt	54	339
481512	4275	4290	CATGCCTCTGAGTCAG	3-10-3	cEt	30	340
481737	4276	4289	ATGCCTCTGAGTCA	2-10-2	cEt	31	341
481513	4290	4305	GTTGCCAAATCCGGCC	3-10-3	cEt	85	342
481738	4291	4304	TTGCCAAATCCGGC	2-10-2	cEt	70	343
481514	4305	4320	GCAAGGTGGTTTTGAG	3-10-3	cEt	85	344
481739	4306	4319	CAAGGTGGTTTTGA	2-10-2	cEt	60	345
481515	4325	4340	AGAAACTCTGATCAGC	3-10-3	cEt	88	346
481740	4326	4339	GAAACTCTGATCAG	2-10-2	cEt	71	347
481516	4364	4379	CAGAGACCAGCTAATT	3-10-3	cEt	78	348
481741	4365	4378	AGAGACCAGCTAAT	2-10-2	cEt	80	349

481517	4394	4409	ATCTTAGAGAAGGTCG	3-10-3	cEt	87		350
481742	4395	4408	TCTTAGAGAAGGTC	2-10-2	cEt	64		351
481518	4425	4440	CCAGGCAGGAGGACTG	3-10-3	cEt	67		352
481743	4426	4439	CAGGCAGGAGGACT	2-10-2	cEt	75		353
481519	4437	4452	CATCAACTGTCTCCAG	3-10-3	cEt	29		354
481744	4438	4451	ATCAACTGTCTCCA	2-10-2	cEt	69		355
481520	4439	4454	CACATCAACTGTCTCC	3-10-3	cEt	73		356
481745	4440	4453	ACATCAACTGTCTC	2-10-2	cEt	74		357
481521	4459	4474	GAAGTAAGAGCTCTGC	3-10-3	cEt	86		358
481746	4460	4473	AAGTAAGAGCTCTG	2-10-2	cEt	67		359
481522	4474	4489	AAGAGTGTTGCTGGAG	3-10-3	cEt	92		360
481747	4475	4488	AGAGTGTTGCTGGA	2-10-2	cEt	95		361
481523	4489	4504	GCTTATTATGTACTGA	3-10-3	cEt	95		362
481748	4490	4503	CTTATTATGTACTG	2-10-2	cEt	15		363
481524	4530	4545	GCCCAAGTCTCACCTT	3-10-3	cEt	70		364
481749	4531	4544	CCCAAGTCTCACCT	2-10-2	cEt	70		365
481525	4541	4556	CCCAATGGTAAGCCCA	3-10-3	cEt	93		366
481750	4542	4555	CCAATGGTAAGCCC	2-10-2	cEt	94		367
481526	4543	4558	AACCCAATGGTAAGCC	3-10-3	cEt	82		368
481751	4544	4557	ACCCAATGGTAAGC	2-10-2	cEt	54		369
481527	4560	4575	TAGGTCCCTATGATTT	3-10-3	cEt	55		370
481752	4561	4574	AGGTCCCTATGATT	2-10-2	cEt	62		371
481528	4579	4594	AAGCCCTGAACCCTCG	3-10-3	cEt	77		372

481753	4580	4593	AGCCCTGAACCCTC	2-10-2	cEt	71	373
481529	4615	4630	CCTAAGGCCATGAACT	3-10-3	cEt	64	374
481754	4616	4629	CTAAGGCCATGAAC	2-10-2	cEt	53	375
481530	4630	4645	ACCAGATACATGCTAC	3-10-3	cEt	87	376
481755	4631	4644	CCAGATACATGCTA	2-10-2	cEt	84	377
481531	4646	4661	TACAATCAGAGTTAAG	3-10-3	cEt	66	378
481756	4647	4660	ACAATCAGAGTTAA	2-10-2	cEt	5	379
481532	4664	4679	TCCTCTCAGAACTTTT	3-10-3	cEt	65	380
481757	4665	4678	CCTCTCAGAACTTT	2-10-2	cEt	81	381
481533	4666	4681	GCTCCTCTCAGAACTT	3-10-3	cEt	80	382
481758	4667	4680	CTCCTCTCAGAACT	2-10-2	cEt	62	383
481534	4693	4708	TTCTTTAATGGGCCAC	3-10-3	cEt	79	384
481759	4694	4707	TCTTTAATGGGCCA	2-10-2	cEt	74	385
481535	4767	4782	ACGGGATTCCCTCGGC	3-10-3	cEt	78	386
481760	4768	4781	CGGGATTCCCTCGG	2-10-2	cEt	78	387
481536	4782	4797	GTAGGTAAGCAACCCA	3-10-3	cEt	91	388
481761	4783	4796	TAGGTAAGCAACCC	2-10-2	cEt	78	389
481537	4830	4845	GAATTTGAATGCAGTG	3-10-3	cEt	84	390
481762	4831	4844	AATTTGAATGCAGT	2-10-2	cEt	2	391
481538	4844	4859	TGAAGTACACATTGGA	3-10-3	cEt	92	392
481763	4845	4858	GAAGTACACATTGG	2-10-2	cEt	96	393
481539	4860	4875	ATAAAATTTTTACACTA	3-10-3	cEt	19	394
481764	4861	4874	TAAATTTTTTACACT	2-10-2	cEt	1	395

481765	4869	4882	CAATAATATAAATT	2-10-2	cEt	0	396
481541	4934	4949	CTGGAAGTTAAAGTAG	3-10-3	cEt	71	397
481766	4935	4948	TGGAAGTTAAAGTA	2-10-2	cEt	10	398

TABLA 2

Niveles de inhibición del ARNm de STAT3 humana por oligonucleótidos antisentido quiméricos cEt y MOE contra la SEQ ID Nº 2

ISIS N°	Sitio de inicio en Humano	Sitio de Finalización en Humano	Secuencia	Motivo	Wing Chem	% de inhibición	*SEQ ID N°*
481350	1065	1080	TCCAGGATCCGGTTGG	3-10-3	cEt	52	9
481575	1066	1079	CCAGGATCCGGTTG	2-10-2	cEt	41	10
481351	1121	1136	GGCCGAAGGGCCTCTC	3-10-3	cEt	14	11
481576	1122	1135	GCCGAAGGGCCTCT	2-10-2	cEt	8	12
481542	1988	2003	GGCTCAATTATTTATC	3-10-3	cEt	64	399
481767	1989	2002	GCTCAATTATTTAT	2-10-2	cEt	0	400
481543	1996	2011	AATGCAATGGCTCAAT	3-10-3	cEt	84	401
481768	1997	2010	ATGCAATGGCTCAA	2-10-2	cEt	95	402
481544	2004	2019	ATCCAGTAAATGCAAT	3-10-3	cEt	58	403
481769	2005	2018	TCCAGTAAATGCAA	2-10-2	cEt	55	404
481545	2061	2076	AGAAAACTCCCACTCT	3-10-3	cEt	36	405
481770	2062	2075	GAAAACTCCCACTC	2-10-2	cEt	42	406
481546	2113	2128	CTGTCTTTGTTTCCCT	3-10-3	cEt	70	407
481771	2114	2127	TGTCTTTGTTTCCC	2-10-2	cEt	75	408

481547	2121	2136	AGGCCAGCCTGTCTTT	3-10-3	cEt	87	409
481772	2122	2135	GGCCAGCCTGTCTT	2-10-2	cEt	53	410
481548	2705	2720	CTAATGGTTCTTTGTG	3-10-3	cEt	78	411
481773	2706	2719	TAATGGTTCTTTGT	2-10-2	cEt	9	412
481549	6476	6491	GAAATTCATTCTTCCA	3-10-3	cEt	96	413
481774	6477	6490	AAATTCATTCTTCC	2-10-2	cEt	56	414
481550	10001	10016	ACACACACAGATGTGA	3-10-3	cEt	48	415
481775	10002	10015	CACACACAGATGTG	2-10-2	cEt	35	416
481551	10337	10352	CTACCCAAACATCCCC	3-10-3	cEt	69	417
481776	10338	10351	TACCCAAACATCCC	2-10-2	cEt	62	418
481552	10345	10360	TACAAAAACTACCCAA	3-10-3	cEt	30	419
481777	10346	10359	ACAAAAACTACCCA	2-10-2	cEt	1	420
481553	10364	10379	AGTTTTCAGAAATGGC	3-10-3	cEt	96	421
481778	10365	10378	GTTTTCAGAAATGG	2-10-2	cEt	47	422
481554	15469	15484	CAAGCTTTTCTATGAA	3-10-3	cEt	86	423
481779	15470	15483	AAGCTTTTCTATGA	2-10-2	cEt	60	424
481555	24588	24603	TTATTCAGGTCACTTT	3-10-3	cEt	73	425
481780	24589	24602	TATTCAGGTCACTT	2-10-2	cEt	60	426
481352	40953	40968	CCTGCTAAAATCAGGG	3-10-3	cEt	15	13
481577	40954	40967	CTGCTAAAATCAGG	2-10-2	cEt	12	14
481353	40968	40983	ATTCCATTGGGCCATC	3-10-3	cEt	78	15
481578	40969	40982	TTCCATTGGGCCAT	2-10-2	cEt	51	16
481354	40992	41007	CCGTGTGTCAAGCTGC	3-10-3	cEt	98	17

481579	40993	41006	CGTGTGTCAAGCTG	2-10-2	cEt	91	18
481355	41050	41065	ACTGCCGCAGCTCCAT	3-10-3	cEt	95	19
481580	41051	41064	CTGCCGCAGCTCCA	2-10-2	cEt	76	20
481356	41074	41089	GACTCTCAATCCAAGG	3-10-3	cEt	83	21
481581	41075	41088	ACTCTCAATCCAAG	2-10-2	cEt	31	22
481556	42765	42780	GCATATGCCCTAGGAA	3-10-3	cEt	23	430
481781	42766	42779	CATATGCCCTAGGA	2-10-2	cEt	15	431
481357	42778	42793	TTCTTTGCTGGCCGCA	3-10-3	cEt	97	23
481582	42779	42792	TCTTTGCTGGCCGC	2-10-2	cEt	87	24
481358	42806	42821	GATTATGAAACACCAA	3-10-3	cEt	85	25
481583	42807	42820	ATTATGAAACACCA	2-10-2	cEt	20	26
481359	42832	42847	ATACTGCTGGTCAATC	3-10-3	cEt	90	27
481584	42833	42846	TACTGCTGGTCAAT	2-10-2	cEt	42	28
481360	42862	42877	GAGAACATTCGACTCT	3-10-3	cEt	75	29
481585	42863	42876	AGAACATTCGACTC	2-10-2	cEt	77	30
481361	42877	42892	TAGATTGTGCTGATAG	3-10-3	cEt	90	31
481586	42878	42891	AGATTGTGCTGATA	2-10-2	cEt	81	32
481362	42893	42908	ACTGCTTGATTCTTCG	3-10-3	cEt	59	33
481587	42894	42907	CTGCTTGATTCTTC	2-10-2	cEt	23	34
481557	43043	43058	GCTAATTACTTCTCCT	3-10-3	cEt	57	432
481782	43044	43057	CTAATTACTTCTCC	2-10-2	cEt	25	433
481588	43826	43839	AAGATACCTGCTCT	2-10-2	cEt	58	36
481364	43856	43871	GCCACAATCCGGGCAA	3-10-3	cEt	36	37

481589	43857	43870	CCACAATCCGGGCA	2-10-2	cEt	69	38
481365	43903	43918	CAGTGGCTGCAGTCTG	3-10-3	cEt	36	39
481590	43904	43917	AGTGGCTGCAGTCT	2-10-2	cEt	30	40
481558	50069	50084	GCCCCCTTGCTGCCAA	3-10-3	cEt	0	434
481783	50070	50083	CCCCCTTGCTGCCA	2-10-2	cEt	39	435
481367	50101	50116	GTCACCACGGCTGCTG	3-10-3	cEt	70	43
481592	50102	50115	TCACCACGGCTGCT	2-10-2	cEt	48	44
481368	50122	50137	TCCAGCATCTGCTGCT	3-10-3	cEt	81	45
481593	50123	50136	CCAGCATCTGCTGC	2-10-2	cEt	46	46
481369	50138	50153	ATCCTGAAGGTGCTGC	3-10-3	cEt	29	47
481594	50139	50152	TCCTGAAGGTGCTG	2-10-2	cEt	16	48
481559	50668	50683	TGTTCTAGATCCTGTT	3-10-3	cEt	72	436
481784	50669	50682	GTTCTAGATCCTGT	2-10-2	cEt	79	437
481371	50673	50688	TTTTCTGTTCTAGATC	3-10-3	cEt	83	51
481596	50674	50687	TTTCTGTTCTAGAT	2-10-2	cEt	48	52
481372	50694	50709	GGAGATTCTCTACCAC	3-10-3	cEt	85	53
481597	50695	50708	GAGATTCTCTACCA	2-10-2	cEt	80	54
481373	50715	50730	AGTTGAAATCAAAGTC	3-10-3	cEt	87	55
481598	50716	50729	GTTGAAATCAAAGT	2-10-2	cEt	6	56
481599	51626	51639	GATCTTGCATGTCT	2-10-2	cEt	51	58
481375	51636	51651	TGTTTCCATTCAGATC	3-10-3	cEt	65	59
481600	51637	51650	GTTTCCATTCAGAT	2-10-2	cEt	42	60
481376	51705	51720	TCCGCATCTGGTCCAG	3-10-3	cEt	82	61

481601	51706	51719	CCGCATCTGGTCCA	2-10-2	cEt	70		62
481560	51708	51723	CTCTCCGCATCTGGTC	3-10-3	cEt	63		438
481785	51709	51722	TCTCCGCATCTGGT	2-10-2	cEt	28		63
481378	51905	51920	CCGCCAGCTCACTCAC	3-10-3	cEt	89		66
481603	51906	51919	CGCCAGCTCACTCA	2-10-2	cEt	60		67
481379	51968	51983	TCCAGTCAGCCAGCTC	3-10-3	cEt	91		68
481604	51969	51982	CCAGTCAGCCAGCT	2-10-2	cEt	70		69
481380	51976	51991	CCGCCTCTTCCAGTCA	3-10-3	cEt	73		70
481605	51977	51990	CGCCTCTTCCAGTC	2-10-2	cEt	55		71
481381	52023	52038	CGATCTAGGCAGATGT	3-10-3	cEt	26		72
481606	52024	52037	GATCTAGGCAGATG	2-10-2	cEt	35		73
481382	55443	55458	GAGATTCTGCTAATGA	3-10-3	cEt	81		74
481607	55444	55457	AGATTCTGCTAATG	2-10-2	cEt	51		75
481383	55451	55466	CTGAAGTTGAGATTCT	3-10-3	cEt	84		76
481608	55452	55465	TGAAGTTGAGATTC	2-10-2	cEt	26		77
481384	55496	55511	AACTTTTTGCTGCAAC	3-10-3	cEt	76		78
481609	55497	55510	ACTTTTTGCTGCAA	2-10-2	cEt	34		79
481385	55511	55526	GTCCCCTTTGTAGGAA	3-10-3	cEt	41		80
481610	55512	55525	TCCCCTTTGTAGGA	2-10-2	cEt	37		81
481387	55748	55763	CAGGATGCATGGGCAT	3-10-3	cEt	92		84
481612	55749	55762	AGGATGCATGGGCA	2-10-2	cEt	86		85
481388	55792	55807	TTTAGTAGTGAACTGG	3-10-3	cEt	74		86
481613	55793	55806	TTAGTAGTGAACTG	2-10-2	cEt	22		87

481561	57949	57964	TGACCAGCAACCTATT	3-10-3	cEt	43	439
481786	57950	57963	GACCAGCAACCTAT	2-10-2	cEt	59	440
481390	57969	57984	ATAATTCAACTCAGGG	3-10-3	cEt	92	90
481615	57970	57983	TAATTCAACTCAGG	2-10-2	cEt	48	91
481391	57978	57993	TTTAAGCTGATAATTC	3-10-3	cEt	44	92
481616	57979	57992	TTAAGCTGATAATT	2-10-2	cEt	0	93
481392	57990	58005	GCACACTTTAATTTTA	3-10-3	cEt	49	94
481617	57991	58004	CACACTTTAATTTT	2-10-2	cEt	1	95
481562	59703	59718	CCCAGAGTCTCTGTAA	3-10-3	cEt	36	441
481787	59704	59717	CCAGAGTCTCTGTA	2-10-2	cEt	22	442
481394	59895	59910	GAGGCTGCCGTTGTTG	3-10-3	cEt	62	98
481619	59896	59909	AGGCTGCCGTTGTT	2-10-2	cEt	29	99
481396	60034	60049	CACATCTCTGCTCCCT	3-10-3	cEt	92	102
481621	60035	60048	ACATCTCTGCTCCC	2-10-2	cEt	74	103
481563	60064	60079	TTACATCACAATTGGC	3-10-3	cEt	24	445
481788	60065	60078	TACATCACAATTGG	2-10-2	cEt	3	446
481398	63306	63321	GATCAGGTGCAGCTCC	3-10-3	cEt	73	106
481623	63307	63320	ATCAGGTGCAGCTC	2-10-2	cEt	40	107
481399	63327	63342	ATACACCTCGGTCTCA	3-10-3	cEt	73	108
481624	63328	63341	TACACCTCGGTCTC	2-10-2	cEt	43	109
481400	63343	63358	TCTTGAGGCCTTGGTG	3-10-3	cEt	47	110
481625	63344	63357	CTTGAGGCCTTGGT	2-10-2	cEt	16	111
481401	63353	63368	TCTAGGTCAATCTTGA	3-10-3	cEt	74	112

481626	63354	63367	CTAGGTCAATCTTG	2-10-2	cEt	54	113
481564	64421	64436	GCAAGGAGTGGGTCTG	3-10-3	cEt	33	446
481789	64422	64435	CAAGGAGTGGGTCT	2-10-2	cEt	10	116
481403	64425	64440	ACTGGCAAGGAGTGGG	3-10-3	cEt	58	117
481628	64426	64439	CTGGCAAGGAGTGG	2-10-2	cEt	38	118
481404	64451	64466	TCTGACAGATGTTGGA	3-10-3	cEt	50	119
481629	64452	64465	CTGACAGATGTTGG	2-10-2	cEt	64	120
481405	64459	64474	ATTTGGCATCTGACAG	3-10-3	cEt	75	121
481630	64460	64473	TTTGGCATCTGACA	2-10-2	cEt	39	122
481407	64663	64678	CCCAGGTTCCAATTGG	3-10-3	cEt	50	125
481632	64664	64677	CCAGGTTCCAATTG	2-10-2	cEt	32	126
481408	64714	64729	CTCGCTTGGTGGTGGA	3-10-3	cEt	53	127
481633	64715	64728	TCGCTTGGTGGTGG	2-10-2	cEt	35	128
481409	64729	64744	GCTCGATGCTCAGTCC	3-10-3	cEt	86	129
481634	64730	64743	CTCGATGCTCAGTC	2-10-2	cEt	43	130
481410	64759	64774	CCAAGAGTTTCTCTGC	3-10-3	cEt	91	131
481635	64760	64773	CAAGAGTTTCTCTG	2-10-2	cEt	43	132
481411	65859	65874	AATTCACACCAGGTCC	3-10-3	cEt	72	133
481636	65860	65873	ATTCACACCAGGTC	2-10-2	cEt	42	134
481412	65877	65892	TGATCTGACACCCTGA	3-10-3	cEt	90	135
481637	65878	65891	GATCTGACACCCTG	2-10-2	cEt	79	136
481413	65885	65900	AGCCCATGTGATCTGA	3-10-3	cEt	80	137
481638	65886	65899	GCCCATGTGATCTG	2-10-2	cEt	64	138

481565	66119	66134	TTTCCTGGAGAAAAGA	3-10-3	cEt	4	447
481790	66120	66133	TTCCTGGAGAAAAG	2-10-2	cEt	3	448
481566	66127	66142	AGCCATGTTTTCCTGG	3-10-3	cEt	62	449
481791	66128	66141	GCCATGTTTTCCTG	2-10-2	cEt	73	450
481415	66133	66148	CTTGCCAGCCATGTTT	3-10-3	cEt	88	141
481640	66134	66147	TTGCCAGCCATGTT	2-10-2	cEt	57	142
337332	66135	66154	GAAGCCCTTGCCAGCCATGT	5-10-5	MOE	63	143
481416	66138	66153	AAGCCCTTGCCAGCCA	3-10-3	cEt	87	144
481641	66139	66152	AGCCCTTGCCAGCC	2-10-2	cEt	68	145
337333	66140	66159	AAGGAGAAGCCCTTGCCAGC	5-10-5	MOE	49	146
481417	66140	66155	AGAAGCCCTTGCCAGC	3-10-3	cEt	97	147
481418	66141	66156	GAGAAGCCCTTGCCAG	3-10-3	cEt	92	148
481642	66141	66154	GAAGCCCTTGCCAG	2-10-2	cEt	67	149
481419	66142	66157	GGAGAAGCCCTTGCCA	3-10-3	cEt	83	150
481643	66142	66155	AGAAGCCCTTGCCA	2-10-2	cEt	58	151
481644	66143	66156	GAGAAGCCCTTGCC	2-10-2	cEt	45	152
481420	66185	66200	ACTTTTTCACAAGGTC	3-10-3	cEt	94	153
481645	66186	66199	CTTTTTCACAAGGT	2-10-2	cEt	50	154
481421	66374	66389	CTCAAGATGGCCCGCT	3-10-3	cEt	86	155
481646	66375	66388	TCAAGATGGCCCGC	2-10-2	cEt	41	156
481422	66389	66404	CCTGGAGGCTTAGTGC	3-10-3	cEt	80	157
481647	66390	66403	CTGGAGGCTTAGTG	2-10-2	cEt	0	158
481423	66430	66445	CTCCTTCTTTGCTGCT	3-10-3	cEt	69	159

481648	66431	66444	TCCTTCTTTGCTGC	2-10-2	cEt	51	160
481424	66446	66461	CAAGTGAAAGTGACGC	3-10-3	cEt	70	161
481649	66447	66460	AAGTGAAAGTGACG	2-10-2	cEt	25	162
481425	66468	66483	ACCGCTGATGTCCTTC	3-10-3	cEt	78	163
481650	66469	66482	CCGCTGATGTCCTT	2-10-2	cEt	79	164
481426	66993	67008	ACTGGATCTGGGTCTT	3-10-3	cEt	80	165
481651	66994	67007	CTGGATCTGGGTCT	2-10-2	cEt	64	166
481427	67017	67032	GCTGCTTTGTGTATGG	3-10-3	cEt	75	167
481652	67018	67031	CTGCTTTGTGTATG	2-10-2	cEt	82	168
481428	67026	67041	TGTTCAGCTGCTGCTT	3-10-3	cEt	77	169
481653	67027	67040	GTTCAGCTGCTGCT	2-10-2	cEt	79	170
481429	67034	67049	TGACATGTTGTTCAGC	3-10-3	cEt	84	171
481654	67035	67048	GACATGTTGTTCAG	2-10-2	cEt	70	172
481430	67052	67067	CATGATGATTTCAGCA	3-10-3	cEt	67	173
481655	67053	67066	ATGATGATTTCAGC	2-10-2	cEt	31	174
481431	67068	67083	CCATGATCTTATAGCC	3-10-3	cEt	91	175
481656	67069	67082	CATGATCTTATAGC	2-10-2	cEt	0	176
481432	67095	67110	GTGGAGACACCAGGAT	3-10-3	cEt	55	177
481657	67096	67109	TGGAGACACCAGGA	2-10-2	cEt	58	178
481433	67118	67133	AATGTCAGGATAGAGA	3-10-3	cEt	73	179
481658	67119	67132	ATGTCAGGATAGAG	2-10-2	cEt	62	180
481434	67128	67143	CCTCCTTGGGAATGTC	3-10-3	cEt	73	181
345785	67129	67148	TGCCTCCTCCTTGGGAATGT	5-10-5	MOE	50	182

481659	67129	67142	CTCCTTGGGAATGT	2-10-2	cEt	51	183
481435	67131	67146	CCTCCTCCTTGGGAAT	3-10-3	cEt	49	184
481660	67132	67145	CTCCTCCTTGGGAA	2-10-2	cEt	54	185
481436	67137	67152	CGAATGCCTCCTCCTCTT	3-10-3	cEt	82	186
481661	67138	67151	GAATGCCTCCTCCT	2-10-2	cEt	76	187
481437	67158	67173	TCTCTGGCCGACAATA	3-10-3	cEt	49	188
481662	67159	67172	CTCTGGCCGACAAT	2-10-2	cEt	43	189
481567	67194	67209	AACAACTACCTGGGTC	3-10-3	cEt	20	451
481792	67195	67208	ACAACTACCTGGGT	2-10-2	cEt	0	452
481438	72272	72287	ACTTGGTCTTCAGGTA	3-10-3	cEt	51	190
481663	72273	72286	CTTGGTCTTCAGGT	2-10-2	cEt	52	191
481568	72290	72305	ACGGTGTCACACAGAT	3-10-3	cEt	85	453
481793	72291	72304	CGGTGTCACACAGA	2-10-2	cEt	93	454
481569	72430	72445	AACACACAAGGTCACT	3-10-3	cEt	62	455
481794	72431	72444	ACACACAAGGTCAC	2-10-2	cEt	81	456
481570	72438	72453	GCTTTTTAAACACACA	3-10-3	cEt	79	457
481795	72439	72452	CTTTTTAAACACAC	2-10-2	cEt	0	458
481571	72528	72543	TGACAAGACACAATGG	3-10-3	cEt	12	459
481796	72529	72542	GACAAGACACAATG	2-10-2	cEt	36	460
481440	72586	72601	GTATTGCTGCAGGTCG	3-10-3	cEt	79	194
481665	72587	72600	TATTGCTGCAGGTC	2-10-2	cEt	43	195
481441	72594	72609	GGTCAATGGTATTGCT	3-10-3	cEt	55	196
481666	72595	72608	GTCAATGGTATTGC	2-10-2	cEt	36	197

481442	72602	72617	CATCGGCAGGTCAATG	3-10-3	cEt	44	198
481667	72603	72616	ATCGGCAGGTCAAT	2-10-2	cEt	31	199
481443	72622	72637	GAATCTAAAGTGCGGG	3-10-3	cEt	78	200
481668	72623	72636	AATCTAAAGTGCGG	2-10-2	cEt	41	201
481444	72630	72645	GCATCAATGAATCTAA	3-10-3	cEt	66	202
481669	72631	72644	CATCAATGAATCTA	2-10-2	cEt	0	203
481445	72638	72653	TCCAAACTGCATCAAT	3-10-3	cEt	70	204
481670	72639	72652	CCAAACTGCATCAA	2-10-2	cEt	60	205
481446	72659	72674	TTCAGCACCTTCACCA	3-10-3	cEt	44	206
481671	72660	72673	TCAGCACCTTCACC	2-10-2	cEt	41	207
481447	72675	72690	GCCCTCCTGCTGAGGG	3-10-3	cEt	10	208
481672	72676	72689	CCCTCCTGCTGAGG	2-10-2	cEt	15	209
481572	72682	72697	CCAAACTGCCCTCCTG	3-10-3	cEt	51	461
481797	72683	72696	CAAACTGCCCTCCT	2-10-2	cEt	11	211
481573	73535	73550	GGTCAGAAAAGCCAGA	3-10-3	cEt	55	462
481798	73536	73549	GTCAGAAAAGCCAG	2-10-2	cEt	59	463
481449	73690	73705	CCATGTCAAAGGTGAG	3-10-3	cEt	77	213
481674	73691	73704	CATGTCAAAGGTGA	2-10-2	cEt	31	214
481450	73717	73732	GGGAGGTAGCGCACTC	3-10-3	cEt	53	215
481675	73718	73731	GGAGGTAGCGCACT	2-10-2	cEt	41	216
481451	73779	73794	GAATGCAGGTAGGCGC	3-10-3	cEt	55	217
481676	73780	73793	AATGCAGGTAGGCG	2-10-2	cEt	39	218
481452	73818	73833	TTTCAGATGATCTGGG	3-10-3	cEt	71	219

481677	73819	73832	TTCAGATGATCTGG	2-10-2	cEt	38	220
481574	73837	73852	GGAACCACACAAAGTTAG	3-10-3	cEt	69	221
481799	73838	73851	GAACCACACAAAGTTA	2-10-2	cEt	50	222
481453	73868	73883	GATAGCAGAAGTAGGA	3-10-3	cEt	92	223
481678	73869	73882	ATAGCAGAAGTAGG	2-10-2	cEt	78	224
481454	73889	73904	AAAGTGCCCAGATTGC	3-10-3	cEt	85	225
481679	73890	73903	AAGTGCCCAGATTG	2-10-2	cEt	69	226
481455	73909	73924	CACTCATTTCTCTATT	3-10-3	cEt	74	227
481680	73910	73923	ACTCATTTCTCTAT	2-10-2	cEt	39	228
481456	73954	73969	AACACATCCTTATTTG	3-10-3	cEt	48	229
481681	73955	73968	ACACATCCTTATTT	2-10-2	cEt	47	230
481457	73966	73981	TGGGTCTCAGAGAACA	3-10-3	cEt	88	231
481682	73967	73980	GGGTCTCAGAGAAC	2-10-2	cEt	77	232
481458	74019	74034	CAAGACATTTCCTTTT	3-10-3	cEt	54	233
481683	74020	74033	AAGACATTTCCTTT	2-10-2	cEt	29	234
481459	74095	74110	GGAGGCACTTGTCTAA	3-10-3	cEt	76	235
481684	74096	74109	GAGGCACTTGTCTA	2-10-2	cEt	89	236
481460	74130	74145	TTACAGAAACAGGCAG	3-10-3	cEt	83	237
481685	74131	74144	TACAGAAACAGGCA	2-10-2	cEt	36	238
481461	74156	74171	AGCTATAGGTGGCCTG	3-10-3	cEt	75	239
481686	74157	74170	GCTATAGGTGGCCT	2-10-2	cEt	70	240
481462	74171	74186	ATGCCAGGAGTATGTA	3-10-3	cEt	89	241
481687	74172	74185	TGCCAGGAGTATGT	2-10-2	cEt	80	242

481463	74188	74203	CAAGGTTAAAAAGTGC	3-10-3	cEt	88	243
481688	74189	74202	AAGGTTAAAAAGTG	2-10-2	cEt	13	244
481464	74203	74218	CTATTTGGATGTCAGC	3-10-3	cEt	97	245
481689	74204	74217	TATTTGGATGTCAG	2-10-2	cEt	40	246
481465	74219	74234	TAGATAGTCCTATCTT	3-10-3	cEt	51	247
481690	74220	74233	AGATAGTCCTATCT	2-10-2	cEt	64	248
481466	74234	74249	AAGAAACCTAGGGCTT	3-10-3	cEt	74	249
481691	74235	74248	AGAAACCTAGGGCT	2-10-2	cEt	77	250
481467	74284	74299	GCTGATACAGTGTTTT	3-10-3	cEt	74	251
481692	74285	74298	CTGATACAGTGTTT	2-10-2	cEt	74	252
481468	74299	74314	ATACAGAAAGGCTATG	3-10-3	cEt	71	253
481693	74300	74313	TACAGAAAGGCTAT	2-10-2	cEt	25	254
481469	74314	74329	GCTTAAGTTTCTTAAA	3-10-3	cEt	61	255
481694	74315	74328	CTTAAGTTTCTTAA	2-10-2	cEt	0	256
481470	74648	74663	AGCACCAAGGAGGCTG	3-10-3	cEt	49	257
481695	74649	74662	GCACCAAGGAGGCT	2-10-2	cEt	83	258
481471	74663	74678	AAGCTGAATGCTTAAA	3-10-3	cEt	36	259
481696	74664	74677	AGCTGAATGCTTAA	2-10-2	cEt	33	260
481472	74678	74693	TTACCAGCCTGAAGGA	3-10-3	cEt	76	261
481697	74679	74692	TACCAGCCTGAAGG	2-10-2	cEt	63	262
481473	74693	74708	CAGGGATTATATAAAT	3-10-3	cEt	53	263
481698	74694	74707	AGGGATTATATAAA	2-10-2	cEt	15	264
481474	74708	74723	ACCTGAAGCCCGTTTC	3-10-3	cEt	80	265

481699	74709	74722	CCTGAAGCCCGTTT	2-10-2	cEt	57	266
481475	74723	74738	TGTCTTAAGGGTTTGA	3-10-3	cEt	93	267
481700	74724	74737	GTCTTAAGGGTTTG	2-10-2	cEt	89	268
481476	74738	74753	GGTTGCAGCTTCAGAT	3-10-3	cEt	92	269
481701	74739	74752	GTTGCAGCTTCAGA	2-10-2	cEt	60	270
481477	74754	74769	TCAACACCAAAGGCCA	3-10-3	cEt	95	271
481702	74755	74768	CAACACCAAAGGCC	2-10-2	cEt	89	272
481478	74772	74787	TCCTTAAACCTTCCTA	3-10-3	cEt	84	273
481703	74773	74786	CCTTAAACCTTCCT	2-10-2	cEt	57	274
481479	74787	74802	AAAATGCTTAGATTCT	3-10-3	cEt	80	275
481704	74788	74801	AAATGCTTAGATTC	2-10-2	cEt	32	276
481480	74815	74830	AAATAAGTCTATTTAT	3-10-3	cEt	5	277
481705	74816	74829	AATAAGTCTATTTA	2-10-2	cEt	25	278
481481	74835	74850	GGCCAATACATTACAA	3-10-3	cEt	63	279
481706	74836	74849	GCCAATACATTACA	2-10-2	cEt	56	280
481482	74857	74872	TGCCCAGCCTTACTCA	3-10-3	cEt	55	281
481707	74858	74871	GCCCAGCCTTACTC	2-10-2	cEt	43	282
481483	74872	74887	GTTGTAAGCACCCTCT	3-10-3	cEt	1	283
481708	74873	74886	TTGTAAGCACCCTC	2-10-2	cEt	56	284
481484	74887	74902	AGAAAGGGAGTCAAGG	3-10-3	cEt	60	285
481709	74888	74901	GAAAGGGAGTCAAG	2-10-2	cEt	27	286
481485	74904	74919	GCAGATCAAGTCCAGG	3-10-3	cEt	90	287
481710	74905	74918	CAGATCAAGTCCAG	2-10-2	cEt	88	288

481486	74917	74932	AGCCTCTGAAACAGCA	3-10-3	cEt	75	289
481711	74918	74931	GCCTCTGAAACAGC	2-10-2	cEt	74	290
481487	74933	74948	CCCACAGAAACAACCT	3-10-3	cEt	66	291
481712	74934	74947	CCACAGAAACAACC	2-10-2	cEt	45	292
481488	74948	74963	AGCCCTGATAAGGCAC	3-10-3	cEt	23	293
481713	74949	74962	GCCCTGATAAGGCA	2-10-2	cEt	18	294
481489	74963	74978	AATCAGAAGTATCCCA	3-10-3	cEt	60	295
481714	74964	74977	ATCAGAAGTATCCC	2-10-2	cEt	43	296
481490	75020	75035	GCCTCTAGCAGGATCA	3-10-3	cEt	78	297
481715	75021	75034	CCTCTAGCAGGATC	2-10-2	cEt	79	298
481491	75035	75050	CACGCAAGGAGACATG	3-10-3	cEt	70	299
481716	75036	75049	ACGCAAGGAGACAT	2-10-2	cEt	68	300
481492	75050	75065	TGAGGGACCTTTAGAC	3-10-3	cEt	61	301
481717	75051	75064	GAGGGACCTTTAGA	2-10-2	cEt	44	302
481493	75073	75088	CAGGATTCCTAAAACA	3-10-3	cEt	43	303
481718	75074	75087	AGGATTCCTAAAAC	2-10-2	cEt	7	304
481494	75088	75103	ATGAGGTCCTGAGACC	3-10-3	cEt	60	305
481719	75089	75102	TGAGGTCCTGAGAC	2-10-2	cEt	29	306
481495	75127	75142	CATCATGTCCAACCTG	3-10-3	cEt	92	307
481720	75128	75141	ATCATGTCCAACCT	2-10-2	cEt	63	308
481496	75142	75157	GGGCCCCATAGTGTGC	3-10-3	cEt	29	309
481721	75143	75156	GGCCCCATAGTGTG	2-10-2	cEt	19	310
481497	75164	75179	AGCTCAACCAGACACG	3-10-3	cEt	67	311

481722	75165	75178	GCTCAACCAGACAC	2-10-2	cEt	69	312
481498	75179	75194	GAACCATATTCCCTGA	3-10-3	cEt	90	313
481723	75180	75193	AACCATATTCCCTG	2-10-2	cEt	49	314
481499	75194	75209	CAAGAAACTGGCTAAG	3-10-3	cEt	43	315
481724	75195	75208	AAGAAACTGGCTAA	2-10-2	cEt	17	316
481500	75209	75224	GCCACTGGATATCACC	3-10-3	cEt	92	317
481725	75210	75223	CCACTGGATATCAC	2-10-2	cEt	88	464
481501	75235	75250	AACTGAATGAAGACGC	3-10-3	cEt	91	318
481726	75236	75249	ACTGAATGAAGACG	2-10-2	cEt	56	319
481502	75250	75265	CCTTTGCCCTGCATGA	3-10-3	cEt	85	320
481727	75251	75264	CTTTGCCCTGCATG	2-10-2	cEt	70	321
481503	75265	75280	AAGTTTATCAGTAAGC	3-10-3	cEt	57	322
481728	75266	75279	AGTTTATCAGTAAG	2-10-2	cEt	22	323
481504	75280	75295	TACGAGGGCAGACTCA	3-10-3	cEt	60	324
481729	75281	75294	ACGAGGGCAGACTC	2-10-2	cEt	22	325
481505	75295	75310	AGGTATACACCCTCAT	3-10-3	cEt	45	326
481730	75296	75309	GGTATACACCCTCA	2-10-2	cEt	47	327
481506	75310	75325	CCTCAGAGGGAGGCCA	3-10-3	cEt	32	328
481731	75311	75324	CTCAGAGGGAGGCC	2-10-2	cEt	0	329
481507	75325	75340	GGGAGGAGTCACCAGC	3-10-3	cEt	64	330
481732	75326	75339	GGAGGAGTCACCAG	2-10-2	cEt	59	331
481508	75392	75407	TAGCCAGCCAAGGCGG	3-10-3	cEt	33	332
481733	75393	75406	AGCCAGCCAAGGCG	2-10-2	cEt	50	333

481509	75407	75422	ACAGGAGAGGCGAGCT	3-10-3	cEt	46	334
481734	75408	75421	CAGGAGAGGCGAGC	2-10-2	cEt	28	335
481510	75424	75439	TAGGTGTTCCCATACG	3-10-3	cEt	95	336
481735	75425	75438	AGGTGTTCCCATAC	2-10-2	cEt	22	337
481511	75445	75460	GGCAGCCCATCCAGCA	3-10-3	cEt	43	338
481736	75446	75459	GCAGCCCATCCAGC	2-10-2	cEt	54	339
481512	75462	75477	CATGCCTCTGAGTCAG	3-10-3	cEt	30	340
481737	75463	75476	ATGCCTCTGAGTCA	2-10-2	cEt	31	341
481513	75477	75492	GTTGCCAAATCCGGCC	3-10-3	cEt	85	342
481738	75478	75491	TTGCCAAATCCGGC	2-10-2	cEt	70	343
481514	75492	75507	GCAAGGTGGTTTTGAG	3-10-3	cEt	85	344
481739	75493	75506	CAAGGTGGTTTTGA	2-10-2	cEt	60	345
481515	75512	75527	AGAAACTCTGATCAGC	3-10-3	cEt	88	346
481740	75513	75526	GAAACTCTGATCAG	2-10-2	cEt	71	347
481516	75551	75566	CAGAGACCAGCTAATT	3-10-3	cEt	78	348
481741	75552	75565	AGAGACCAGCTAAT	2-10-2	cEt	80	349
481517	75581	75596	ATCTTAGAGAAGGTCG	3-10-3	cEt	87	350
481742	75582	75595	TCTTAGAGAAGGTC	2-10-2	cEt	64	351
481518	75612	75627	CCAGGCAGGAGGACTG	3-10-3	cEt	67	352
481743	75613	75626	CAGGCAGGAGGACT	2-10-2	cEt	75	353
481519	75624	75639	CATCAACTGTCTCCAG	3-10-3	cEt	29	354
481744	75625	75638	ATCAACTGTCTCCA	2-10-2	cEt	69	355
481520	75626	75641	CACATCAACTGTCTCC	3-10-3	cEt	73	356

481745	75627	75640	ACATCAACTGTCTC	2-10-2	cEt	74	357
481521	75646	75661	GAAGTAAGAGCTCTGC	3-10-3	cEt	86	358
481746	75647	75660	AAGTAAGAGCTCTG	2-10-2	cEt	67	359
481522	75661	75676	AAGAGTGTTGCTGGAG	3-10-3	cEt	92	360
481747	75662	75675	AGAGTGTTGCTGGA	2-10-2	cEt	95	361
481523	75676	75691	GCTTATTATGTACTGA	3-10-3	cEt	95	362
481748	75677	75690	CTTATTATGTACTG	2-10-2	cEt	15	363
481524	75717	75732	GCCCAAGTCTCACCTT	3-10-3	cEt	70	364
481749	75718	75731	CCCAAGTCTCACCT	2-10-2	cEt	70	365
481525	75728	75743	CCCAATGGTAAGCCCA	3-10-3	cEt	93	366
481750	75729	75742	CCAATGGTAAGCCC	2-10-2	cEt	94	367
481526	75730	75745	AACCCAATGGTAAGCC	3-10-3	cEt	82	368
481751	75731	75744	ACCCAATGGTAAGC	2-10-2	cEt	54	369
481527	75747	75762	TAGGTCCCTATGATTT	3-10-3	cEt	55	370
481752	75748	75761	AGGTCCCTATGATT	2-10-2	cEt	62	371
481528	75766	75781	AAGCCCTGAACCCTCG	3-10-3	cEt	77	372
481753	75767	75780	AGCCCTGAACCCTC	2-10-2	cEt	71	373
481529	75802	75817	CCTAAGGCCATGAACT	3-10-3	cEt	64	374
481754	75803	75816	CTAAGGCCATGAAC	2-10-2	cEt	53	375
481530	75817	75832	ACCAGATACATGCTAC	3-10-3	cEt	87	376
481755	75818	75831	CCAGATACATGCTA	2-10-2	cEt	84	377
481531	75833	75848	TACAATCAGAGTTAAG	3-10-3	cEt	66	378
481756	75834	75847	ACAATCAGAGTTAA	2-10-2	cEt	5	379

481532	75851	75866	TCCTCTCAGAACTTTT	3-10-3	cEt	65	380
481757	75852	75865	CCTCTCAGAACTTT	2-10-2	cEt	81	381
481533	75853	75868	GCTCCTCTCAGAACTT	3-10-3	cEt	80	382
481758	75854	75867	CTCCTCTCAGAACT	2-10-2	cEt	62	383
481534	75880	75895	TTCTTTAATGGGCCAC	3-10-3	cEt	79	384
481759	75881	75894	TCTTTAATGGGCCA	2-10-2	cEt	74	385
481535	75954	75969	ACGGGATTCCCTCGGC	3-10-3	cEt	78	386
481760	75955	75968	CGGGATTCCCTCGG	2-10-2	cEt	78	387
481536	75969	75984	GTAGGTAAGCAACCCA	3-10-3	cEt	91	388
481761	75970	75983	TAGGTAAGCAACCC	2-10-2	cEt	78	389
481537	76017	76032	GAATTTGAATGCAGTG	3-10-3	cEt	84	390
481762	76018	76031	AATTTGAATGCAGT	2-10-2	cEt	2	391
481538	76031	76046	TGAAGTACACATTGGA	3-10-3	cEt	92	392
481763	76032	76045	GAAGTACACATTGG	2-10-2	cEt	96	393
481539	76047	76062	ATAAATTTTTACACTA	3-10-3	cEt	19	394
481764	76048	76061	TAAATTTTTACACT	2-10-2	cEt	1	395
481765	76056	76069	CAATAATATAAATT	2-10-2	cEt	0	396
481541	76121	76136	CTGGAAGTTAAAGTAG	3-10-3	cEt	71	397
481766	76122	76135	TGGAAGTTAAAGTA	2-10-2	cEt	10	398

EJEMPLO 2: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DE STAT3 MURINA EN CÉLULAS B.END

Los oligonucleótidos antisentido que se probaron en el estudio que se describe en el Ejemplo 1 también se probaron para sus efectos sobre el ARNm de STAT3 en células b.END. Las células b.END cultivadas a una densidad de 20,000 células por pocillo se transfectaron usando electroporación con 7,000 nM de oligonucleótido antisentido. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de cebadores y sonda para murino RTS2381 (secuencia directa GCCACGTTGGTGTTTCATAATCT, designada en la presente como SEQ ID Nº 465; secuencia reversa GATAGAGGACATTGGACTCTTGCA, designada en la presente como SEQ ID Nº 466; secuencia de sonda TTGGGTGAAATTGACCAGCAATATAGCCG, designada en la presente como SEQ ID Nº 467) se usó para medir el ARN. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®.

Ciertas secuencias complementarias a la secuencia génica murina de STAT3 mostraron buena inhibición en las células b.END. Los resultados se presentan en la Tabla 3 como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar. Los oligonucleótidos humanos en la Tabla 3 se compararon con la secuencia genómica de la STAT-3 de ratón, designada en la presente como SEQ ID Nº 3 (el complemento del No. de Acceso a GENBANK NT_165773.2 truncado entre los nucleótidos 12286001 y 12344000). “Sitio de inicio de blanco de ratón” indica el nucleótido ubicado más hacia 5’ contra el que está dirigido el gápmero en la secuencia murina. “Sitio de finalización de blanco de ratón” indica el nucleótido ubicado más hacia 3’ contra el que está dirigido el gápmero en la secuencia murina.

TABLA 3

Niveles de inhibición del ARNm de STAT3 humana por ciertos oligonucleótidos antisentido quiméricos cEt complementarios a SEQ ID Nº 1 y SEQ ID Nº 3

ISIS N°	Sitio de inicio en Ratón	Sitio de Finalización en Ratón	% de inhibición	SEQ ID Nº
481549	5283	5298	96	413
481553	9913	9928	94	421
481768	3189	3202	91	402
481356	30356	30371	83	21
481548	4045	4060	82	411
481554	14662	14677	82	423
481426	48328	48343	82	165
481580	30333	30346	81	20
481412	47413	47428	81	135
481417	47636	47651	81	147
481418	47637	47652	80	148
481355	30332	30347	79	19
481396	43120	43135	79	443
481416	47634	47649	79	144
481420	47681	47696	79	153
481358	32842	32857	78	25

481363	33520	33535	78	35
481570	51870	51885	78	457
481382	37857	37872	77	74
481378	36560	36575	76	66
481431	48403	48418	76	175
481453	53034	53049	76	223
481621	43121	43134	75	444
481641	47635	47648	75	145
481637	47414	47427	74	136
481380	36631	36646	73	70
481574	53000	53015	73	221
481601	36392	36405	71	62
481419	47638	47653	71	150
481371	35938	35953	70	51
481642	47637	47650	70	149
481542	3180	3195	69	399
481547	3313	3328	69	409
481772	3314	3327	69	410
481362	32929	32944	69	33
481653	48362	48375	69	170
481786	38812	38825	68	440
481415	47629	47644	68	141
481543	3188	3203	67	401
481793	51714	51727	67	454
481443	52060	52075	67	200
481684	53229	53242	67	236
481398	45226	45241	66	106
481560	36394	36409	65	438
481643	47638	47651	65	151
481430	48387	48402	65	173
481440	52024	52039	65	194

EJEMPLO 3: TOLERABILIDAD DE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO CONTRA STAT3 EN RATONES BALB/C

Cuarenta oligonucleótidos antisentido que exhiben un alto nivel de potencia, seleccionados de entre los 452 compuestos que se evaluaron en el Ejemplo 1, se probaron adicionalmente para tolerabilidad *in vivo*.

Se inyectaron grupos de entre 2 y 4 ratones BALB/c machos por vía subcutánea dos veces por semana durante 3 semanas con 25 mg/kg de oligonucleótidos antisentido ISIS. Un grupo de 4 ratones BALB/c machos se inyectó por vía subcutánea dos veces por semana durante 3 semanas con PBS. Este grupo de ratones se utilizó como grupo control contra el que se compararon los grupos de tratamiento. Un día después de la última dosis, se tomaron los pesos corporales, se sacrificaron los ratones, y se colectaron los órganos y el plasma para análisis adicionales.

Los pesos corporales de los ratones se midieron antes de las dosis y al final del periodo de tratamiento. Se calculó el porcentaje de incremento por sobre el peso corporal inicial. Se midieron los pesos de hígado, bazo, y riñón al final del estudio y se compararon con los ratones tratados con PBS.

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función metabólica, se midieron las concentraciones plasmáticas de transaminasas y BUN usando un analizador para química clínica automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron las concentraciones plasmáticas de ALT (alanina transaminasa), AST (aspartato transaminasa), y BUN.

Entre los cuarenta oligonucleótidos antisentido probados, ciertos oligonucleótidos antisentido, incluyendo a ISIS 481374, ISIS 481390, ISIS 481420, ISIS 481431, ISIS 481453, ISIS 481464, ISIS 481475, ISIS 481495, ISIS 481500, ISIS 481501, ISIS 481525, ISIS 481548, ISIS 481549, ISIS 481597, ISIS 481695, ISIS 481700, ISIS 481702, ISIS 481710, ISIS 481725, ISIS 481750, y ISIS 481763 cumplieron con los umbrales de tolerabilidad para peso corporal, peso de órganos, ALT, AST, y parámetros BUN.

EJEMPLO 4: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 HUMANA EN CÉLULAS HUVEC

Los gápmeros de los Ejemplos 1 y 2 que exhiben inhibición *in vitro* significativa de STAT3 se probaron a diferentes dosis en células HuVEC. Se plaquearon las células a una densidad de 20,000 células por pocillo y se transfectaron usando electroporación con concentraciones de 31.25 nM, 62.5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, y 1,0000 nM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 4. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS199 (secuencia directa ACATGCCACTTTGGTGTTTCATAA, designada en la presente como SEQ ID Nº 6; secuencia reversa TCTTCGTAGATTGTGCTGATAGAGAAC, designada en la presente como SEQ ID Nº 7; secuencia de sonda CAGTATAGCCGCTTCCTGCAAGAGTCGAA, designada en la presente como SEQ ID Nº 8) se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 4 y se calculó mediante el gráfico de las concentraciones de los oligonucleótidos usados versus el porcentaje de inhibición de la expresión del ARNm de STAT3 conseguida para cada concentración y registrando la concentración de oligonucleótido a la que se consiguió el 50% de inhibición de la expresión del ARNm de STAT3 en comparación con el control. Como se ilustra en la Tabla 4, los niveles de ARNm de STAT3 se redujeron de forma significativa en una forma dependiente de la dosis en las células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

TABLA 4

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de STAT3 humana en células HuVEC usando electroporación

ISIS N°	31.25 nM	62.5 nM	125.0 nM	250.0 nM	500.0 nM	1000.0 nM	IC_{50} (μM)

481355	19	15	36	61	75	89	0.18
481374	25	42	52	72	82	88	0.10
481390	17	37	44	60	73	86	0.15
481420	23	20	40	60	81	92	0.16
481453	21	37	52	69	79	88	0.12
481464	57	73	81	90	94	94	<0.03
481475	22	46	54	78	83	92	0.10
481500	25	37	42	75	83	90	0.12
481501	32	57	69	82	94	94	0.05
481523	35	60	74	85	90	93	0.04
481525	36	53	60	79	89	92	0.06
481549	0	16	60	81	90	96	0.15
481554	0	15	28	49	70	86	0.25
481597	8	18	39	48	64	83	0.24
481695	15	27	39	50	64	80	0.22
481700	0	17	44	58	80	88	0.20
481710	12	39	65	79	86	90	0.11
481715	11	26	32	44	53	69	0.36
481725	27	40	56	77	89	93	0.09
481750	7	24	46	63	83	89	0.16
481755	17	28	30	54	68	80	0.20
481768	7	21	27	44	67	85	0.26

EJEMPLO 5: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS SK-BR-3

Los gápmeros del Ejemplo 4 se probaron a diferentes dosis en células SK-BR-3. Se plaquearon las células a una densidad de 4,000 células por pocillo. Se incubaron las células con concentraciones de 0.02 µM, 0.1 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM, y 10 µM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 5. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS199, que se describió previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 5. Como se ilustra en la Tabla 5, la mayoría de los oligonucleótidos ISIS fueron capaces de penetrar la membrana celular y los niveles de ARNm de STAT3 se redujeron de forma significativa en una forma dependiente de la dosis en las células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

TABLA 5

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de STAT3 humana mediante captación libre de oligonucleótido ISIS por las células SK-BR-3

ISIS N°	0.02 µM	0.1 µM	0.5 µM	1 µM	2.5 µM	10 µM	IC_{50} (µM)
481374	10	18	18	16	8	25	15.9
481390	0	10	11	12	40	72	3.2
481453	14	13	27	45	58	79	1.3
481464	23	32	57	70	85	93	0.5
481475	0	0	35	49	72	88	1.0
481500	7	9	26	45	49	75	1.7
481501	0	0	4	5	53	65	2.7
481523	9	24	56	67	83	92	0.5
481525	0	17	13	15	32	68	4.4
481549	0	0	0	16	33	54	8.2
481597	1	0	11	14	22	44	10.6
481710	5	0	10	13	27	66	6.0
481725	29	45	47	39	39	63	2.6
481750	19	24	36	42	71	80	1.1
481763	30	38	51	63	81	89	0.6
481768	12	5	34	25	32	35	12.4

EJEMPLO 6: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS U251-MG

Los gápmeros del Ejemplo 5 se probaron adicionalmente a diferentes dosis en células U251-MG. Se plaquearon las células a una densidad de 4,000 células por pocillo. Se incubaron las células con concentraciones de 0.02 µM, 0.1 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM, y 10 µM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 6. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS199, que se describió previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 6. Como se ilustra en la Tabla 6, la mayoría de los oligonucleótidos ISIS fueron capaces de penetrar la membrana celular y los niveles de ARNm de STAT3 se redujeron de forma significativa en una forma dependiente de la dosis en las células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

TABLA 6

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de STAT3 mediante captación libre de oligonucleótido ISIS por las células U251-MG

ISIS N°	0.02 µM	0.1 µM	0.5 µM	1 µM	2.5 µM	10 µM	IC_{50} (µM)
481374	0	0	10	0	12	25	15.7
481390	0	4	10	8	16	31	13.9
481453	4	3	15	16	20	42	11.0
481464	13	11	41	42	54	79	1.3
481475	3	13	26	37	41	67	2.6
481500	2	12	14	12	25	38	11.7
481501	0	0	2	1	14	47	10.3
481523	22	27	39	45	63	83	1.1
481525	1	1	17	17	35	60	6.3
481549	0	0	0	0	9	29	14.5
481597	3	3	12	18	18	47	10.1
481695	0	14	12	22	25	33	12.9
481710	0	0	0	0	6	23	16.8
481725	0	0	5	7	20	38	11.8
481750	4	15	18	18	17	33	13.2
481763	15	16	25	36	36	64	3.2
481768	22	16	18	22	21	37	12.2

EJEMPLO 7: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS U251-MG

Los ISIS 481464 e ISIS 481549, de los estudios que se describieron previamente, se probaron adicionalmente a diferentes dosis en células U251-MG. Se plaquearon las células a una densidad de 4,000 células por pocillo. Se incubaron las células con concentraciones de 0.1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, y 20 µM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 7. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS199, que se describió previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 7. Como se ilustra en la Tabla 7, ambos oligonucleótidos ISIS fueron capaces de penetrar la membrana celular.

TABLA 7

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de STAT3 mediante captación libre de oligonucleótido ISIS por las células U251-MG

ISIS N°	0.1 µM	1 µM	5 µM	10 µM	20 µM	IC_{50} (µM)

481464	0	30	69	80	79	2.3
481549	0	0	26	35	38	>20

EJEMPLO 8: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS MDA-MB-231

Se probaron los ISIS 481464 e ISIS 481549 adicionalmente a diferentes dosis en células MDA-MB-231. Se plaquearon las células a una densidad de 4,000 células por pocillo. Se incubaron las células con concentraciones de 0.02 µM, 0.2 µM, 1.0 µM, 5.0 µM, y 10.0 µM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 8. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS199, que se describió previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 8. Como se ilustra en la Tabla 8, ambos oligonucleótidos ISIS fueron capaces de penetrar la membrana celular y reducir significativamente los niveles de ARNm de STAT3 en una forma dependiente de la dosis.

TABLA 8

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de STAT3 mediante captación libre de oligonucleótido ISIS por células MDA-MB-231

ISIS N°	0.02 µM	0.2 µM	1.0 µM	5.0 µM	10.0 µM	IC_{50} (µM)
481464	0	25	71	85	87	0.6
481549	0	2	33	49	66	4.4

EJEMPLO 9: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS A431

Se probaron adicionalmente los ISIS 481464 e ISIS 481549 a diferentes dosis en células A431. Se plaquearon las células a una densidad de 4,000 células por pocillo. Se incubaron las células con concentraciones de 0.02 µM, 0.2 µM, 1.0 µM, 5.0 µM, y 10.0 µM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 9. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS199, que se describió previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 9. Como se ilustra en la Tabla 9, ambos oligonucleótidos ISIS fueron capaces de penetrar la membrana celular y reducir significativamente los niveles de ARNm de STAT3 en una forma dependiente de la dosis.

TABLA 9

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de STAT3 mediante captación libre de oligonucleótido ISIS por las células A431

ISIS N°	0.02 µM	0.2 µM	1.0 µM	5.0 µM	10.0 µM	IC_{50} (µM)

481464	79	93	98	98	98	<0.02
481549	0	38	68	82	84	0.6

EJEMPLO 10: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS H460

Se probaron adicionalmente los ISIS 481464 e ISIS 481549 a diferentes dosis en células H460. Se plaquearon las células a una densidad de 4,000 células por pocillo. Se incubaron las células con concentraciones de 0.02 µM, 0.2 µM, 1.0 µM, 5.0 µM, y 10.0 µM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 10. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS199, que se describió previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 10. Como se ilustra en la Tabla 10, ambos oligonucleótidos ISIS fueron capaces de penetrar la membrana celular y reducir significativamente los niveles de ARNm de STAT3 en una forma dependiente de la dosis.

TABLA 10

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de STAT3 mediante captación libre de oligonucleótido ISIS por las células H460

ISIS N°	0.02 µM	0.2 µM	1.0 µM	5.0 µM	10.0 µM	IC_{50} (µM)
481464	46	89	96	97	98	0.01
481549	8	53	78	96	98	0.23

EJEMPLO 11: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DE STAT3 HUMANA EN CÉLULAS HUVEC

Se diseñaron oligonucleótidos antisentido contra un ácido nucleico de STAT3 humana y se probaron para su efecto sobre la expresión del ARNm de STAT3 humana *in vitro*. Las células HuVEC cultivadas a una densidad de 20,000 células por pocillo se transfectaron usando electroporación con 1,000 nM de oligonucleótido antisentido. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de cebadores y sonda para humano RTS199 (secuencia directa ACATGCCACTTTGGTGTTTCATAA, designada en la presente como SEQ ID Nº 6; secuencia reversa TCTTCGTAGATTGTGCTGATAGAGAAC, designada en la presente como SEQ ID Nº 7; secuencia de sonda CAGTATAGCCGCTTCCTGCAAGAGTCGAA, designada en la presente como SEQ ID Nº 8) se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos en la Tabla 11 se diseñaron como gápmeros 3-10-3 MOE, desoxi, y cEt. Los gápmeros tienen 16 nucleótidos de longitud, en donde el segmento espaciador central comprende diez 2'-desoxinucleósidos y está flanqueado a ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por extensiones que comprenden tres nucleósidos cada una. Cada nucleósido en el segmento de extensión 5' tiene una modificación con azúcar 2'-MOE. Cada nucleósido en el segmento de extensión 3' tiene una modificación con azúcar cEt. Las uniones internucleosídicas a lo largo de cada gápmero son uniones fosforotioato (P=S). Todos los residuos de citosina a lo largo de cada gápmero son 5-metilcitosinas. La columna de la química de Tabla 11 presenta el motivo de azúcar de cada gápmero, en donde 'e' indica un nucleósido 2'-MOE, 'k' indica un nucleósido de etilo

(cEt) constreñido, y ‘d’ indica un 2’-desoxinucleósido.

“Sitio de inicio de blanco en humano” indica el nucleósido ubicado más hacia 5’ contra el que está dirigido el gápmero en la secuencia génica humana. “Sitio de finalización de blanco en humano” indica el nucleósido ubicado más hacia 3’ contra el que está dirigido el gápmero en la secuencia génica humana. Cada gápmero que se lista en la Tabla 11 se dirige contra el ARNm de STAT3 humana, designada en la presente como SEQ ID Nº 1 (No. de Acceso a GENBANK NM_139276.2).

TABLA 11

Niveles de inhibición del ARNm de STAT3 humana por oligonucleótidos antisentido quiméricos contra la SEQ ID Nº 1

Sitio de inicio en Humano	Sitio de Finalización en Humano	ISIS No	Secuencia	Química	% de inhibición	SEQ ID Nº
1	16	528170	CGCAGCTCCGGAAACC	e-e-e-$d_{(10)}$-k-k-k	12	471
2	17	528171	CCGCAGCTCCGGAAAC	e-e-e-$d_{(10)}$-k-k-k	11	472
4	19	528172	CGCCGCAGCTCCGGAA	e-e-e-$d_{(10)}$-k-k-k	10	473
5	20	528173	CCGCCGCAGCTCCGGA	e-e-e-$d_{(10)}$-k-k-k	22	474
32	47	528174	ACCCCCGGCTCCCCCT	e-e-e-$d_{(10)}$-k-k-k	18	475
34	49	528175	GAACCCCCGGCTCCCC	e-e-e-$d_{(10)}$-k-k-k	17	476
35	50	528176	GGAACCCCCGGCTCCC	e-e-e-$d_{(10)}$-k-k-k	23	477
36	51	528177	CGGAACCCCCGGCTCC	e-e-e-$d_{(10)}$-k-k-k	15	478
38	53	528178	GTCGGAACCCCCGGCT	e-e-e-$d_{(10)}$-k-k-k	21	479
39	54	528179	CGTCGGAACCCCCGGC	e-e-e-$d_{(10)}$-k-k-k	19	480
57	72	528180	TTGTTCCCTCGGCTGC	e-e-e-$d_{(10)}$-k-k-k	40	481
58	73	528181	CTTGTTCCCTCGGCTG	e-e-e-$d_{(10)}$-k-k-k	28	482
60	75	528182	GGCTTGTTCCCTCGGC	e-e-e-$d_{(10)}$-k-k-k	25	483
61	76	528183	GGGCTTGTTCCCTCGG	e-e-e-$d_{(10)}$-k-k-k	34	484
75	90	528184	CCAGGATCCGGTTGGG	e-e-e-$d_{(10)}$-k-k-k	34	485
76	91	528185	TCCAGGATCCGGTTGG	e-e-e-$d_{(10)}$-k-k-k	15	9

77	92	528186	GTCCAGGATCCGGTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	486
78	93	528187	TGTCCAGGATCCGGTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	487
79	94	528188	CTGTCCAGGATCCGGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	33	488
81	96	528189	GCCTGTCCAGGATCCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	63	489
83	98	528190	GTGCCTGTCCAGGATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	490
189	204	528191	AGAGGCCGAGAGGCCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	2	491
210	225	528192	GGTCCCAACTGTTTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	11	492
232	247	528193	GGGCCATCCTGCTAAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	493
233	248	528194	TGGGCCATCCTGCTAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	16	494
234	249	528195	TTGGGCCATCCTGCTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	495
236	251	528196	CATTGGGCCATCCTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	496
237	252	528197	CCATTGGGCCATCCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	497
239	254	528198	TTCCATTGGGCCATCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	19	498
240	255	528199	ATTCCATTGGGCCATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	15
244	259	528200	GCTGATTCCATTGGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	500
245	260	528201	AGCTGATTCCATTGGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	501
246	261	528202	TAGCTGATTCCATTGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	502
247	262	528203	GTAGCTGATTCCATTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	503
250	265	528204	GCTGTAGCTGATTCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	83	504
251	266	528205	TGCTGTAGCTGATTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	72	505
252	267	528206	CTGCTGTAGCTGATTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	44	506
253	268	528207	GCTGCTGTAGCTGATT	e-e-e-d(10)-k-k-k	49	507
263	278	528208	CGTGTGTCAAGCTGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	73	508

264	279	528209	CCGTGTGTCAAGCTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	81	17
265	280	528210	ACCGTGTGTCAAGCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	78	509
266	281	528211	TACCGTGTGTCAAGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	72	510
267	282	528212	GTACCGTGTGTCAAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	81	511
268	283	528213	GGTACCGTGTGTCAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	46	512
270	285	528214	CAGGTACCGTGTGTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	80	513
271	286	528215	CCAGGTACCGTGTGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	69	514
272	287	528216	TCCAGGTACCGTGTGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	515
273	288	528217	CTCCAGGTACCGTGTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	44	516
274	289	528218	GCTCCAGGTACCGTGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	517
275	290	528219	TGCTCCAGGTACCGTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	50	518
291	306	528220	GTAGAGCTGATGGAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	519
292	307	528221	TGTAGAGCTGATGGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	520
295	310	528222	CACTGTAGAGCTGATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	521
297	312	528223	GTCACTGTAGAGCTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	44	522
302	317	528224	AAGCTGTCACTGTAGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	523
303	318	528225	GAAGCTGTCACTGTAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	24	524
307	322	528226	TTGGGAAGCTGTCACT	e-e-e-d(10)-k-k-k	35	525
308	323	528227	ATTGGGAAGCTGTCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	29	526
310	325	528228	CCATTGGGAAGCTGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	33	527
322	337	519639	ACTGCCGCAGCTCCAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	19
329	344	528229	GCCAGAAACTGCCGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	528
330	345	528230	GGCCAGAAACTGCCGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	1	529

331	346	528231	GGGCCAGAAACTGCCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	1	530
345	360	528232	ACTCTCAATCCAAGGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	531
346	361	528233	GACTCTCAATCCAAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	21
347	362	528234	TGACTCTCAATCCAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	6	532
351	366	528235	ATCTTGACTCTCAATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	533
353	368	528236	CAATCTTGACTCTCAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	29	534
354	369	528237	CCAATCTTGACTCTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	60	535
355	370	528238	CCCAATCTTGACTCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	536
356	371	528239	GCCCAATCTTGACTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	48	537
357	372	528240	TGCCCAATCTTGACTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	538
358	373	528241	ATGCCCAATCTTGACT	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	539
359	374	528242	TATGCCCAATCTTGAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	540
362	377	528243	GCATATGCCCAATCTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	16	541
363	378	528244	CGCATATGCCCAATCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	50	542
367	382	528245	TGGCCGCATATGCCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	67	543
368	383	528246	CTGGCCGCATATGCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	47	544
369	384	528247	GCTGGCCGCATATGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	54	545
370	385	528248	TGCTGGCCGCATATGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	35	546
371	386	528249	TTGCTGGCCGCATATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	547
372	387	528250	TTTGCTGGCCGCATAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	19	548
373	388	528251	CTTTGCTGGCCGCATA	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	549
374	389	528252	TCTTTGCTGGCCGCAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	34	550
375	390	528253	TTCTTTGCTGGCCGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	59	23

376	391	528254	ATTCTTTGCTGGCCGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	63	551
378	393	528255	TGATTCTTTGCTGGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	552
379	394	528256	GTGATTCTTTGCTGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	47	553
383	398	528257	GCATGTGATTCTTTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	43	554
384	399	528258	GGCATGTGATTCTTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	47	555
388	403	528259	AAGTGGCATGTGATTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	43	556
391	406	528260	CCAAAGTGGCATGTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	46	557
393	408	528261	CACCAAAGTGGCATGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	558
395	410	528262	AACACCAAAGTGGCAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	559
397	412	528263	GAAACACCAAAGTGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	69	560
427	442	528264	ACTGCTGGTCAATCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	561
428	443	528265	TACTGCTGGTCAATCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	562
430	445	528266	TATACTGCTGGTCAAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	563
431	446	528267	CTATACTGCTGGTCAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	564
432	447	528268	GCTATACTGCTGGTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	58	565
433	448	528269	GGCTATACTGCTGGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	69	566
434	449	528270	CGGCTATACTGCTGGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	73	567
435	450	528271	GCGGCTATACTGCTGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	71	568
436	451	528272	AGCGGCTATACTGCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	54	569
437	452	528273	AAGCGGCTATACTGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	570
439	454	528274	GGAAGCGGCTATACTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	571
440	455	528275	AGGAAGCGGCTATACT	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	572
441	456	528276	CAGGAAGCGGCTATAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	573

442	457	528277	GCAGGAAGCGGCTATA	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	574
443	458	528278	TGCAGGAAGCGGCTAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	575
444	459	528279	TTGCAGGAAGCGGCTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	576
445	460	528280	CTTGCAGGAAGCGGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	44	577
463	478	528281	GATAGAGAACATTCGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	578
464	479	528282	TGATAGAGAACATTCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	579
469	484	528283	TGTGCTGATAGAGAAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	580
471	486	528284	ATTGTGCTGATAGAGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	581
472	487	528285	GATTGTGCTGATAGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	50	582
473	488	528286	AGATTGTGCTGATAGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	49	583
475	490	528287	GTAGATTGTGCTGATA	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	584
476	491	528288	CGTAGATTGTGCTGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	8	585
490	505	528289	ACTGCTTGATTCTTCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	33
511	526	528290	CAAGATACCTGCTCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	48	35
512	527	528291	TCAAGATACCTGCTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	34	586
513	528	528292	CTCAAGATACCTGCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	19	587
514	529	528293	TCTCAAGATACCTGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	588
517	532	528294	GCTTCTCAAGATACCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	589
519	534	528295	TGGCTTCTCAAGATAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	590
522	537	528296	CATTGGCTTCTCAAGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	11	591
523	538	528297	CCATTGGCTTCTCAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	23	592
530	545	528298	GCAATCTCCATTGGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	46	593
531	546	528299	GGCAATCTCCATTGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	594

532	547	528300	GGGCAATCTCCCATTGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	24	595
533	548	528301	CGGGCAATCTCCCATTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	596
534	549	528302	CCGGGCAATCTCCCATT	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	597
535	550	528303	TCCGGGCAATCTCCCAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	29	598
536	551	528304	ATCCGGGCAATCTCCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	599
537	552	528305	AATCCGGGCAATCTCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	600
538	553	528306	CAATCCGGGCAATCTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	24	601
539	554	528307	ACAATCCGGGCAATCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	602
540	555	528308	CACAATCCGGGCAATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	603
541	556	528309	CCACAATCCGGGCAAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	13	604
543	558	528310	GGCCACAATCCGGGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	605
546	561	528311	CCGGGCCACAATCCGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	606
547	562	528312	ACCGGGCCACAATCCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	58	607
548	563	528313	CACCGGGCCACAATCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	608
549	564	528314	GCACCGGGCCACAATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	609
550	565	528315	GGCACCGGGCCACAAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	33	610
551	566	528316	AGGCACCGGGCCACAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	611
558	573	528317	TTCCCACAGGCACCGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	47	612
586	601	528318	TGGCTGCAGTCTGTAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	613
592	607	528319	CCGCAGTGGCTGCAGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	614
599	614	528320	TGCTGGGCCGCAGTGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	615
601	616	528321	CTTGCTGGGCCGCAGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	616
603	618	528322	CCCTTGCTGGGCCGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	6	617

604	619	528323	CCCCTTGCTGGGGCCGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	618
605	620	528324	CCCCCTTGCTGGGCCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	8	619
608	623	528325	TGGCCCCCTTGCTGGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	620
615	630	528326	GTTGGCCTGGCCCCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	621
616	631	528327	GGTTGGCCTGGCCCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	47	622
617	632	528328	TGGTTGGCCTGGCCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	623
646	661	528329	GCTTCTCCGTCACCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	624
647	662	528330	TGCTTCTCCGTCACCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	625
649	664	528331	GCTGCTTCTCCGTCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	35	626
667	682	528332	GGTGCTGCTCCAGCAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	627
678	693	528333	GACATCCTGAAGGTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	628
682	697	528334	TCCGGACATCCTGAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	1	629
683	698	528335	TTCCGGACATCCTGAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	630
684	699	528336	CTTCCGGACATCCTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	631
685	700	528337	TCTTCCGGACATCCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	632
686	701	528338	CTCTTCCGGACATCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	19	633
687	702	528339	TCTCTTCCGGACATCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	634
688	703	528340	CTCTCTTCCGGACATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	17	635
689	704	528341	ACTCTCTTCCGGACAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	636
727	742	528342	GATTCTCTACCACTTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	33	637
730	745	528343	GGAGATTCTCTACCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	53
731	746	528344	TGGAGATTCTCTACCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	638
732	747	528345	CTGGAGATTCTCTACC	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	639

733	748	528346	CCTGGAGATTCTCTAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	640
738	753	528347	GTCATCCTGGAGATTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	54	641
764	779	528348	TTGAGGGTTTTATAGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	642
775	790	528349	CTCCTTGACTCTTGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	643
781	796	528350	GCATGTCTCCTTGACT	e-e-e-d(10)-k-k-k	29	644
782	797	528351	TGCATGTCTCCTTGAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	645
783	798	528352	TTGCATGTCTCCTTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	17	646
787	802	528353	GATCTTGCATGTCTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	61	647
788	803	518346	AGATCTTGCATGTCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	57
790	805	528354	TCAGATCTTGCATGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	43	648
792	807	528355	ATTCAGATCTTGCATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	649
794	809	528356	CCATTCAGATCTTGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	650
795	810	528357	TCCATTCAGATCTTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	55	651
796	811	528358	TTCCATTCAGATCTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	17	652
803	818	528359	TGGTTGTTTCCATTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	33	653
804	819	528360	CTGGTTGTTTCCATTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	654
806	821	528361	GACTGGTTGTTTCCAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	23	655
807	822	528362	TGACTGGTTGTTTCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	33	656
813	828	528363	GGTCACTGACTGGTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	43	657
814	829	528364	TGGTCACTGACTGGTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	62	658
848	863	528365	GTGAGCATCTGTTCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	659
852	867	528366	CGCAGTGAGCATCTGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	660
853	868	528367	GCGCAGTGAGCATCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	661

854	869	528368	AGCGCAGTGAGCATCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	7	662
855	870	528369	CAGCGCAGTGAGCATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	6	663
857	872	528370	TCCAGCGCAGTGAGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	664
858	873	528371	GTCCAGCGCAGTGAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	11	665
859	874	528372	GGTCCAGCGCAGTGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	8	666
860	875	528373	TGGTCCAGCGCAGTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	667
862	877	528374	TCTGGTCCAGCGCAGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	668
863	878	528375	ATCTGGTCCAGCGCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	8	669
864	879	528376	CATCTGGTCCAGCGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	670
865	880	528377	GCATCTGGTCCAGCGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	671
867	882	528378	CCGCATCTGGTCCAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	72	672
868	883	528379	TCCGCATCTGGTCCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	43	61
869	884	528380	CTCCGCATCTGGTCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	34	673
870	885	528381	TCTCCGCATCTGGTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	674
871	886	528382	TTCTCCGCATCTGGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	675
872	887	528383	CTTCTCCGCATCTGGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	23	676
873	888	528384	GCTTCTCCGCATCTGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	677
875	890	528385	ATGCTTCTCCGCATCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	678
876	891	528386	GATGCTTCTCCGCATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	679
877	892	528387	CGATGCTTCTCCGCAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	680
878	893	528388	ACGATGCTTCTCCGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	681
879	894	528389	CACGATGCTTCTCCGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	46	682
880	895	528390	TCACGATGCTTCTCCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	17	683

881	896	528391	CTCACGATGCTTCTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	684
882	897	528392	ACTCACGATGCTTCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	16	685
883	898	528393	CACTCACGATGCTTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	686
885	900	528394	CTCACTCACGATGCTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	687
886	901	528395	GCTCACTCACGATGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	688
888	903	528396	CAGCTCACTCACGATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	24	689
889	904	528397	CCAGCTCACTCACGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	690
890	905	528398	GCCAGCTCACTCACGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	691
891	906	528399	CGCCAGCTCACTCACG	e-e-e-d(10)-k-k-k	4	692
1068	1083	528477	AATTTGTTGACGGGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	693
1069	1084	528478	TAATTTGTTGACGGGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	35	694
1070	1085	528479	TTAATTTGTTGACGGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	695
1072	1087	528480	TCTTAATTTGTTGACG	e-e-e-d(10)-k-k-k	6	696
1087	1102	528481	GCAACTCCTCCAGTTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	697
1088	1103	528482	TGCAACTCCTCCAGTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	698
1094	1109	528483	TTTTGCTGCAACTCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	49	699
1095	1110	528484	TTTTTGCTGCAACTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	58	700
1114	1129	528485	GGTCCCCTTTGTAGGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	35	701
1115	1130	528486	GGGTCCCCTTTGTAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	702
1129	1144	528487	GGTGCTGTACAATGGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	61	703
1130	1145	528488	CGGTGCTGTACAATGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	61	704
1131	1146	528489	CCGGTGCTGTACAATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	705
1132	1147	528490	GCCGGTGCTGTACAAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	33	706

1133	1148	528491	GGCCGGTGCTGTACAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	707
1134	1149	528492	CGGCCGGTGCTGTACA	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	708
1136	1151	528493	ATCGGCCGGTGCTGTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	29	709
1137	1152	528494	CATCGGCCGGTGCTGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	43	710
1138	1153	528495	GCATCGGCCGGTGCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	711
1139	1154	528496	AGCATCGGCCGGTGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	712
1140	1155	528497	CAGCATCGGCCGGTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	713
1141	1156	528498	CCAGCATCGGCCGGTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	714
1142	1157	528499	TCCAGCATCGGCCGGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	50	715
1144	1159	528500	CCTCCAGCATCGGCCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	58	716
1146	1161	528501	CTCCTCCAGCATCGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	67	717
1147	1162	528502	TCTCCTCCAGCATCGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	76	718
1153	1168	528503	CGATTCTCTCCTCCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	68	719
1154	1169	528504	ACGATTCTCTCCTCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	69	720
1155	1170	528505	CACGATTCTCTCCTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	68	721
1156	1171	528506	CCACGATTCTCTCCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	722
1157	1172	528507	TCCACGATTCTCTCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	723
1158	1173	528508	CTCCACGATTCTCTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	724
1159	1174	528509	GCTCCACGATTCTCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	725
1160	1175	528510	AGCTCCACGATTCTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	7	726
1161	1176	528511	CAGCTCCACGATTCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	5	727
1162	1177	528512	ACAGCTCCACGATTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	728
1163	1178	528513	AACAGCTCCACGATTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	8	729

1184	1199	528514	GCACTTTTCATTAAGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	730
1185	1200	528515	GGCACTTTTCATTAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	731
1199	1214	528516	CGCTCCACCACACAAAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	46	732
1205	1220	528517	GGCTGCCGCTCCACCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	55	733
1206	1221	528518	GGGCTGCCGCTCCACC	e-e-e-d(10)-k-k-k	80	734
1207	1222	528519	AGGGCTGCCGCTCCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	61	735
1208	1223	528520	CAGGGCTGCCGCTCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	63	736
1211	1226	528521	ATGCAGGGCTGCCGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	737
1212	1227	528522	CATGCAGGGCTGCCGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	738
1221	1236	528523	ATGCATGGGCATGCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	26	739
1222	1237	528524	GATGCATGGGCATGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	740
1223	1238	528525	GGATGCATGGGCATGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	43	741
1252	1267	528526	CGCCGGTCTTGATGAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	11	742
1253	1268	528527	ACGCCGGTCTTGATGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	743
1265	1280	528528	GTAGTGAACTGGACGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	744
1284	1299	528529	GACCAGCAACCTGACT	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	745
1285	1300	528530	TGACCAGCAACCTGAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	746
1288	1303	528531	ATTTGACCAGCAACCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	48	747
1289	1304	528532	AATTTGACCAGCAACC	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	748
1290	1305	528533	GAATTTGACCAGCAAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	11	749
1293	1308	528534	AGGGAATTTGACCAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	67	750
1294	1309	528535	CAGGGAATTTGACCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	50	751
1295	1310	528536	TCAGGGAATTTGACCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	752

1296	1311	528537	CTCAGGGAATTTGACC	e-e-e-d(10)-k-k-k	17	753
1336	1351	528539	CTTTGTCAATGCACAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	67	754
1338	1353	528540	GTCTTTGTCAATGCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	61	755
1339	1354	528541	AGTCTTTGTCAATGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	65	756
1343	1358	528542	CCAGAGTCTTTGTCAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	757
1345	1360	528543	CCCCAGAGTCTTTGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	7	758
1371	1386	528544	CCGGGATCCTCTGAGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	759
1372	1387	528545	TCCGGGATCCTCTGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	11	760
1373	1388	528546	TTCCGGGATCCTCTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	7	761
1374	1389	528547	TTTCCGGGATCCTCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	762
1375	1390	528548	ATTTCCGGGATCCTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	763
1376	1391	528549	AATTTCCGGGATCCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	19	764
1377	1392	528550	AAATTTCCGGGATCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	765
1379	1394	528551	TTAAATTTCCGGGATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	1	766
1380	1395	528552	GTTAAATTTCCGGGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	767
1381	1396	528553	TGTTAAATTTCCGGGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	768
1382	1397	528554	ATGTTAAATTTCCGGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	769
1384	1399	528555	GAATGTTAAATTTCCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	13	770
1392	1407	528556	TGTGCCCAGAATGTTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	771
1435	1450	528557	GGCTGCCGTTGTTGGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	48	772
1436	1451	528558	AGGCTGCCGTTGTTGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	773
1437	1452	528559	GAGGCTGCCGTTGTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	24	98
1438	1453	528560	AGAGGCTGCCGTTGTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	774

1439	1454	528561	GAGAGGCTGCCGTTGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	775
1440	1455	528562	AGAGAGGCTGCCGTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	17	776
1441	1456	528563	CAGAGAGGCTGCCGTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	777
1461	1476	528564	GGTCAAGTGTTTGAAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	7	778
1471	1486	528565	GCTCCCTCAGGGTCAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	48	779
1496	1511	528566	GCTCGGCCCCCATTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	780
1497	1512	528567	GGCTCGGCCCCCATTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	781
1498	1513	528568	TGGCTCGGCCCCCATT	e-e-e-d(10)-k-k-k	34	782
1499	1514	528569	TTGGCTCGGCCCCCAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	49	783
1517	1532	528570	ATCAGGGAAGCATCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	104
1519	1534	528571	CAATCAGGGAAGCATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	13	784
1523	1538	528572	GTCACAATCAGGGAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	785
1525	1540	528573	CAGTCACAATCAGGGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	786
1526	1541	528574	TCAGTCACAATCAGGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	51	787
1529	1544	528575	TCCTCAGTCACAATCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	788
1537	1552	528576	GGTGCAGCTCCTCAGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	789
1543	1558	528577	TGATCAGGTGCAGCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	790
1544	1559	528578	GTGATCAGGTGCAGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	791
1545	1560	528579	GGTGATCAGGTGCAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	792
1576	1591	528580	TGAGGCCTTGGTGATA	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	793
1578	1593	528581	CTTGAGGCCTTGGTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	5	794
1579	1594	528582	TCTTGAGGCCTTGGTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	110
1580	1595	528583	ATCTTGAGGCCTTGGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	5	795

1581	1596	528584	AATCTTGAGGCCTTGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	796
1582	1597	528585	CAATCTTGAGGCCTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	7	797
1583	1598	528586	TCAATCTTGAGGCCTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	798
1584	1599	528587	GTCAATCTTGAGGCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	799
1585	1600	528588	GGTCAATCTTGAGGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	26	800
1586	1601	528589	AGGTCAATCTTGAGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	801
1587	1602	528590	TAGGTCAATCTTGAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	802
1588	1603	528591	CTAGGTCAATCTTGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	24	803
1590	1605	528592	CTCTAGGTCAATCTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	33	804
1592	1607	528593	GTCTCTAGGTCAATCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	805
1594	1609	528594	GGGTCTCTAGGTCAAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	806
1595	1610	528595	TGGGTCTCTAGGTCAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	807
1596	1611	528596	GTGGGTCTCTAGGTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	34	808
1597	1612	528597	AGTGGGTCTCTAGGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	19	809
1599	1614	528598	GGAGTGGGTCTCTAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	114
1600	1615	528599	AGGAGTGGGTCTCTAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	810
1601	1616	528600	AAGGAGTGGGTCTCTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	811
1602	1617	528601	CAAGGAGTGGGTCTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	11	812
1609	1624	528602	CAACTGGCAAGGAGTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	17	813
1629	1644	528603	ACAGATGTTGGAGATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	8	814
1632	1647	528604	CTGACAGATGTTGGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	11	815
1633	1648	528605	TCTGACAGATGTTGGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	119
1650	1665	528606	CGCCCAGGCATTTGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	816

1651	1666	528607	ACGCCCAGGCATTTGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	817
1677	1692	528608	GGTCAGCATGTTGTAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	11	818
1678	1693	528609	TGGTCAGCATGTTGTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	819
1680	1695	528610	GTTGGTCAGCATGTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	19	820
1682	1697	528611	TTGTTGGTCAGCATGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	821
1711	1726	528612	GCTTGGTAAAAAAGTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	822
1712	1727	528613	GGCTTGGTAAAAAAGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	823
1713	1728	528614	GGGCTTGGTAAAAAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	824
1736	1751	528615	ACTTGATCCCAGGTTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	26	825
1741	1756	528616	CGGCCACTTGATCCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	826
1742	1757	528617	TCGGCCACTTGATCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	827
1743	1758	528618	CTCGGCCACTTGATCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	828
1744	1759	528619	CCTCGGCCACTTGATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	829
1745	1760	528620	ACCTCGGCCACTTGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	16	830
1746	1761	528621	GACCTCGGCCACTTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	831
1747	1762	528622	GGACCTCGGCCACTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	59	832
1748	1763	528623	AGGACCTCGGCCACTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	49	833
1749	1764	528624	CAGGACCTCGGCCACT	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	834
1753	1768	528625	AGCTCAGGACCTCGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	835
1754	1769	528626	CAGCTCAGGACCTCGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	58	836
1755	1770	528627	CCAGCTCAGGACCTCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	56	837
1778	1793	528628	CGCTTGGTGGTGGAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	838
1779	1794	528629	TCGCTTGGTGGTGGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	839

1780	1795	528630	CTCGCTTGGTGGTGGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	127
1781	1796	528631	CCTCGCTTGGTGGTGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	26	840
1782	1797	528632	TCCTCGCTTGGTGGTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	24	841
1783	1798	528633	GTCCTCGCTTGGTGGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	842
1784	1799	528634	AGTCCTCGCTTGGTGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	843
1785	1800	528635	CAGTCCTCGCTTGGTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	844
1786	1801	528636	TCAGTCCTCGCTTGGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	23	845
1787	1802	528637	CTCAGTCCTCGCTTGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	33	846
1788	1803	528638	GCTCAGTCCTCGCTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	847
1789	1804	528639	TGCTCAGTCCTCGCTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	848
1791	1806	528640	GATGCTCAGTCCTCGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	43	849
1792	1807	528641	CGATGCTCAGTCCTCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	46	850
1793	1808	528642	TCGATGCTCAGTCCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	851
1794	1809	528643	CTCGATGCTCAGTCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	852
1795	1810	528644	GCTCGATGCTCAGTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	43	129
1796	1811	528645	TGCTCGATGCTCAGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	853
1797	1812	528646	CTGCTCGATGCTCAGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	854
1799	1814	528647	AGCTGCTCGATGCTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	855
1800	1815	528648	CAGCTGCTCGATGCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	856
1802	1817	528649	GTCAGCTGCTCGATGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	857
1803	1818	528650	AGTCAGCTGCTCGATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	858
1804	1819	528651	TAGTCAGCTGCTCGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	4	859
1805	1820	528652	GTAGTCAGCTGCTCGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	17	860

1806	1821	528653	TGTAGTCAGCTGCTCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	861
1807	1822	528654	GTGTAGTCAGCTGCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	862
1808	1823	528655	AGTGTAGTCAGCTGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	863
1809	1824	528656	CAGTGTAGTCAGCTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	864
1810	1825	528657	CCAGTGTAGTCAGCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	23	865
1811	1826	528658	GCCAGTGTAGTCAGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	866
1832	1847	528659	CCAGGTCCCAAGAGTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	867
1852	1867	528660	GACACCCTGAATAATT	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	868
1853	1868	528661	TGACACCCTGAATAAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	869
1856	1871	528662	ATCTGACACCCTGAAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	870
1857	1872	528663	GATCTGACACCCTGAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	871
1859	1874	528664	GTGATCTGACACCCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	61	872
1861	1876	528665	ATGTGATCTGACACCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	873
1865	1880	528666	GCCCATGTGATCTGAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	46	874
1866	1881	528667	AGCCCATGTGATCTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	137
1867	1882	528668	TAGCCCATGTGATCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	44	875
1869	1884	528669	TTTAGCCCATGTGATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	876
1907	1922	528670	AAGGAGAAGCCCTTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	35	877
1925	1940	528671	TTGTCCAGCCAGACCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	878
1926	1941	528672	ATTGTCCAGCCAGACC	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	879
1927	1942	528673	TATTGTCCAGCCAGAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	23	880
1928	1943	528674	ATATTGTCCAGCCAGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	24	881
1929	1944	528675	GATATTGTCCAGCCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	52	882

1931	1946	528676	ATGATATTGTCCAGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	883
1933	1948	528677	CAATGATATTGTCCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	23	884
1935	1950	528678	GTCAATGATATTGTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	885
1936	1951	528679	GGTCAATGATATTGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	26	886
1941	1956	528680	CACAAGGTCAATGATA	e-e-e-d(10)-k-k-k	5	887
1942	1957	528681	TCACAAGGTCAATGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	888
1948	1963	518340	ACTTTTTCACAAGGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	52	153
1950	1965	528682	GTACTTTTTCACAAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	889
1954	1969	528683	GGATGTACTTTTTCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	890
1958	1973	528684	GCCAGGATGTACTTTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	891
1962	1977	528685	AAGGGCCAGGATGTAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	892
1963	1978	528686	AAAGGGCCAGGATGTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	893
2004	2019	528687	CCGCTCCTTACTGATA	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	894
2010	2025	528688	CCGCTCCCGCTCCTTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	895
2014	2029	528689	TGGCCCGCTCCCGCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	52	896
2015	2030	528690	ATGGCCCGCTCCCGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	897
2017	2032	528691	AGATGGCCCGCTCCCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	51	898
2018	2033	528692	AAGATGGCCCGCTCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	899
2019	2034	528693	CAAGATGGCCCGCTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	46	900
2020	2035	528694	TCAAGATGGCCCGCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	901
2022	2037	528695	GCTCAAGATGGCCCGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	54	902
2023	2038	528696	TGCTCAAGATGGCCCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	46	903
2024	2039	528697	GTGCTCAAGATGGCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	60	904

2041	2056	528698	AGGTGCCTGGAGGCTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	17	905
2093	2108	528699	CAAGTGAAAGTGACGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	2	161
2094	2109	528700	CCAAGTGAAAGTGACG	e-e-e-d(10)-k-k-k	13	906
2095	2110	528701	CCCAAGTGAAAGTGAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	907
2128	2143	528702	GGATCTGGGTCTTACC	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	908
2129	2144	528703	TGGATCTGGGTCTTAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	909
2131	2146	528704	ACTGGATCTGGGTCTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	165
2133	2148	528705	GGACTGGATCTGGGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	910
2138	2153	528706	TCCACGGACTGGATCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	13	911
2139	2154	528707	TTCCACGGACTGGATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	19	912
2140	2155	528708	GTTCCACGGACTGGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	2	913
2141	2156	528709	GGTTCCACGGACTGGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	914
2142	2157	528710	TGGTTCCACGGACTGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	63	915
2143	2158	528711	ATGGTTCCACGGACTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	62	916
2144	2159	528712	TATGGTTCCACGGACT	e-e-e-d(10)-k-k-k	35	917
2146	2161	528713	TGTATGGTTCCACGGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	918
2147	2162	528714	GTGTATGGTTCCACGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	48	919
2193	2208	528715	GCCCATGATGATTTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	920
2194	2209	528716	AGCCCATGATGATTTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	921
2195	2210	528717	TAGCCCATGATGATTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	922
2196	2211	528718	ATAGCCCATGATGATT	e-e-e-d(10)-k-k-k	19	923
2197	2212	528719	TATAGCCCATGATGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	924
2198	2213	528720	TTATAGCCCATGATGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	925

2199	2214	528721	CTTATAGCCCATGATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	926
2200	2215	528722	TCTTATAGCCCATGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	927
2201	2216	528723	ATCTTATAGCCCATGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	17	928
2202	2217	528724	GATCTTATAGCCCATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	35	929
2203	2218	528725	TGATCTTATAGCCCAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	930
2204	2219	528726	ATGATCTTATAGCCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	67	931
2205	2220	528727	CATGATCTTATAGCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	932
2206	2221	528728	CCATGATCTTATAGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	175
2207	2222	528729	TCCATGATCTTATAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	933
2208	2223	528730	ATCCATGATCTTATAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	934
2213	2228	528731	GTAGCATCCATGATCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	935
2214	2229	528732	GGTAGCATCCATGATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	936
2217	2232	528733	ATTGGTAGCATCCATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	937
2218	2233	528734	TATTGGTAGCATCCAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	938
2219	2234	528735	ATATTGGTAGCATCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	939
2264	2279	528736	TCCTTGGGAATGTCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	940
2266	2281	528737	CCTCCTTGGGAATGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	181
2275	2290	528738	CGAATGCCTCCTCCTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	29	186
2277	2292	528739	TCCGAATGCCTCCTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	33	941
2278	2293	528740	TTCCGAATGCCTCCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	942
2279	2294	528741	TTTCCGAATGCCTCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	943
2280	2295	528742	CTTTCCGAATGCCTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	944
2281	2296	528743	ACTTTCCGAATGCCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	945

2283	2298	528744	ATACTTTCCGAATGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	44	946
2285	2300	528745	CAATACTTTCCGAATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	947
2286	2301	528746	ACAATACTTTCCGAAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	948
2288	2303	528747	CGACAATACTTTCCGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	11	949
2289	2304	528748	CCGACAATACTTTCCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	950
2290	2305	528749	GCCGACAATACTTTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	951
2291	2306	528750	GGCCGACAATACTTTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	16	952
2293	2308	528751	CTGGCCGACAATACTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	953
2294	2309	528752	TCTGGCCGACAATACT	e-e-e-d(10)-k-k-k	8	954
2295	2310	528753	CTCTGGCCGACAATAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	955
2296	2311	528754	TCTCTGGCCGACAATA	e-e-e-d(10)-k-k-k	6	188
2297	2312	528755	CTCTCTGGCCGACAAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	956
2298	2313	528756	GCTCTCTGGCCGACAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	35	957
2299	2314	528757	GGCTCTCTGGCCGACA	e-e-e-d(10)-k-k-k	57	958
2300	2315	528758	TGGCTCTCTGGCCGAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	64	959
2301	2316	528759	CTGGCTCTCTGGCCGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	960
2326	2341	528760	TACCTGGGTCAGCTTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	961
2328	2343	528761	GCTACCTGGGTCAGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	962
2329	2344	528762	CGCTACCTGGGTCAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	963
2330	2345	528763	GCGCTACCTGGGTCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	26	964
2349	2364	528764	GGTCTTCAGGTATGGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	965
2350	2365	528765	TGGTCTTCAGGTATGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	966
2352	2367	528766	CTTGGTCTTCAGGTAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	967

2353	2368	528767	ACTTGGTCTTCAGGTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	190
2358	2373	528768	GATAAACTTGGTCTTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	968
2360	2375	528769	CAGATAAACTTGGTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	969
2361	2376	528770	ACAGATAAACTTGGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	7	970
2369	2384	528771	GGTGTCACACAGATAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	35	971
2373	2388	528772	CGTTGGTGTCACACAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	52	972
2387	2402	528773	GTATTGCTGCAGGTCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	49	194
2388	2403	528774	GGTATTGCTGCAGGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	48	973
2389	2404	528775	TGGTATTGCTGCAGGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	35	974
2390	2405	528776	ATGGTATTGCTGCAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	975
2392	2407	528777	CAATGGTATTGCTGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	24	976
2393	2408	528778	TCAATGGTATTGCTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	977
2394	2409	528779	GTCAATGGTATTGCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	16	978
2395	2410	528780	GGTCAATGGTATTGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	34	196
2396	2411	528781	AGGTCAATGGTATTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	26	979
2397	2412	528782	CAGGTCAATGGTATTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	16	980
2398	2413	528783	GCAGGTCAATGGTATT	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	981
2399	2414	528784	GGCAGGTCAATGGTAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	982
2400	2415	528785	CGGCAGGTCAATGGTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	983
2401	2416	528786	TCGGCAGGTCAATGGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	51	984
2403	2418	528787	CATCGGCAGGTCAATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	26	198
2404	2419	528788	ACATCGGCAGGTCAAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	985
2405	2420	528789	GACATCGGCAGGTCAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	986

2406	2421	528790	GGACATCGGCAGGTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	58	987
2407	2422	528791	GGGACATCGGCAGGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	68	988
2423	2438	528792	GAATCTAAAGTGCGGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	46	200
2424	2439	528793	TGAATCTAAAGTGCGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	43	989
2427	2442	528794	CAATGAATCTAAAGTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	990
2462	2477	528795	GGTTCAGCACCTTCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	13	991
2463	2478	528796	GGGTTCAGCACCTTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	24	992
2464	2479	528797	AGGGTTCAGCACCTTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	23	993
2465	2480	528798	GAGGGTTCAGCACCTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	994
2466	2481	528799	TGAGGGTTCAGCACCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	24	995
2490	2505	528800	GAGGGACTCAAACTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	996
2492	2507	528801	GTGAGGGACTCAAACT	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	997
2493	2508	528802	GGTGAGGGACTCAAAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	998
2494	2509	528803	AGGTGAGGGACTCAAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	13	999
2495	2510	528804	AAGGTGAGGGACTCAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	1000
2497	2512	528805	CAAAGGTGAGGGACTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	1001
2498	2513	528806	TCAAAGGTGAGGGACT	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	1002
2506	2521	528807	ACTCCATGTCAAAGGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	54	1003
2510	2525	528808	GTCAACTCCATGTCAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1004
2511	2526	528809	GGTCAACTCCATGTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	56	1005
2513	2528	528810	GAGGTCAACTCCATGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	1006
2514	2529	528811	CGAGGTCAACTCCATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	1007
2515	2530	528812	CCGAGGTCAACTCCAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	1008

2517	2532	528813	CTCCGAGGTCAACTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	58	1009
2518	2533	528814	ACTCCGAGGTCAACTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	1010
2519	2534	528815	CACTCCGAGGTCAACT	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	1011
2551	2566	528816	CGTTCTCAGCTCCTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	54	1012
2554	2569	528817	TTCCGTTCTCAGCTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	53	1013
2555	2570	528818	CTTCCGTTCTCAGCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	1014
2556	2571	528819	GCTTCCGTTCTCAGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	35	1015
2557	2572	528820	AGCTTCCGTTCTCAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	1016
2558	2573	528821	CAGCTTCCGTTCTCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	53	1017
2559	2574	528822	GCAGCTTCCGTTCTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	66	1018
2614	2629	528823	TTTGGCTGTGTGTGAGGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	62	1019
2615	2630	528824	GTTTGGCTGTGTGTGAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	50	1020
2616	2631	528825	GGTTTGGCTGTGTGTGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	1021
2641	2656	528826	AAGTTAGTAGTTTCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	1022
2677	2692	528827	GCAGAAGTAGGAGATT	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	1023
2690	2705	528828	TTGCTCAAAGATAGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1024
2691	2706	528829	ATTGCTCAAAGATAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	1025
2692	2707	528830	GATTGCTCAAAGATAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1026
2694	2709	528831	CAGATTGCTCAAAGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	26	1027
2695	2710	528832	CCAGATTGCTCAAAGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	1028
2699	2714	528833	GTGCCCAGATTGCTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	77	1029
2738	2753	528834	GCAGATCACCCACATT	e-e-e-d(10)-k-k-k	49	1030
2743	2758	528835	TAAAAGCAGATCACCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	1031

2809	2824	528836	CTAGCCACCCCCCCGCC	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	19	1032
2810	2825	528837	TCTAGCCACCCCCCGC	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	9	1033
2811	2826	528838	CTCTAGCCACCCCCCG	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	16	1034
2908	2923	528839	GGAGGCACTTGTCTAA	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	56	235
2909	2924	528840	AGGAGGCACTTGTCTA	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	62	1036
2910	2925	528841	CAGGAGGCACTTGTCT	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	52	1037
2911	2926	528842	CCAGGAGGCACTTGTC	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	59	1038
2932	2947	528843	GGCAGAAGGATGCCGC	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	35	1039
2945	2960	528844	GCTTACAGAAACAGGC	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	62	1040
2980	2995	528845	CAGGAGTATGTAGCTA	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	65	1041
2981	2996	528846	CCAGGAGTATGTAGCT	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	80	1042
2982	2997	528847	GCCAGGAGTATGTAGC	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	72	1043
2983	2998	528848	TGCCAGGAGTATGTAG	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	46	1044
2984	2999	528849	ATGCCAGGAGTATGTA	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	59	241
3001	3016	528850	CAAGGTTAAAAAGTGC	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	10	243
3008	3023	528851	ATGTCAGCAAGGTTAA	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	61	1045
3010	3025	528852	GGATGTCAGCAAGGTT	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	88	1046
3012	3027	528853	TTGGATGTCAGCAAGG	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	91	1047
3016	3031	518349	CTATTTGGATGTCAGC	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	85	245
3030	3045	528854	GATAGTCCTATCTTCT	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	42	1048
3091	3106	528855	ACAGTGTTTTTTGCCC	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	59	1049
3108	3123	528856	AGAAAGGCTATGCTGA	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	56	1050
3452	3467	528857	GAGGCTGTTAACTGAA	e-e-e-d$_{(10)}$-k-k-k	40	1051

3458	3473	528858	ACCAAGGAGGCTGTTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	26	1052
3474	3489	528859	GCTGAATGCTTAAAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	1053
4022	4037	518344	GCCACTGGATATCACC	e-e-e-d(10)-k-k-k	55	317

EJEMPLO 12: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 HUMANA EN CÉLULAS HUVEC

Los gápmeros del estudio que se describe en el Ejemplo 11, previamente, que exhiben inhibición *in vitro* significativa de STAT3 se probaron a diferentes dosis en células HuVEC. Se plaquearon las células a una densidad de 20,000 células por pocillo y se transfectaron usando electroporación con concentraciones de 23.4375 nM, 93.75 nM, 375.0 nM, y 1,500.0 nM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 12. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS199, que se describió previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 12 y se calculó mediante el gráfico de las concentraciones de los oligonucleótidos usados versus el porcentaje de inhibición de la expresión del ARNm de STAT3 conseguida para cada concentración, y registrando la concentración de oligonucleótido a la cual se consigue el 50% de inhibición de la expresión del ARNm de STAT3 en comparación con el control. Como se ilustra en la Tabla 12, los niveles de ARNm de STAT3 se redujeron de forma significativa en una forma dependiente de la dosis en las células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

TABLA 12

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de STAT3 humana en células HuVEC

ISIS N°	23.4375 nM	93.75 nM	375.0 nM	1500.0 nM	IC_{50} (μM)
518340	0	8	28	63	1.0
518349	13	30	68	90	0.2
528189	8	13	43	71	0.5
528204	4	24	53	79	0.3
528205	0	9	59	80	0.4
528208	0	19	56	84	0.3
528209	0	28	58	90	0.3
528210	0	16	49	87	0.3
528211	0	10	47	86	0.4
528212	0	16	42	83	0.4
528214	0	25	55	88	0.3
528215	3	16	53	82	0.3
528237	13	19	33	73	0.6
528245	3	16	53	78	0.4
528263	0	3	32	76	0.6
528264	9	0	19	50	>1.5
528268	0	7	25	63	1.0

528269	0	11	39	77	0.5
528270	5	9	48	79	0.4
528271	0	14	37	81	0.5
528327	0	0	26	72	0.8
528347	0	2	25	69	0.9
528357	0	17	36	69	0.6
528389	0	3	19	82	0.7
528501	0	17	40	69	0.6
528502	0	10	35	76	0.6
528503	3	1	38	70	0.7
528504	0	19	45	72	0.5
528505	0	7	41	73	0.6
528518	0	24	51	81	0.3
528534	0	8	32	72	0.7
528539	0	7	39	73	0.6
528557	0	9	26	53	>1.5
528565	4	12	31	57	1.3
528567	8	13	25	54	>1.5
528569	9	19	37	60	0.8
528574	5	17	32	62	0.9
528622	10	4	29	68	0.9
528623	0	13	24	62	1.1
528626	1	0	34	68	0.8
528627	22	19	30	64	1.0
528664	0	14	37	74	0.5
528675	0	10	28	62	1.0
528689	0	16	33	65	0.7
528691	0	3	34	61	0.9
528695	1	4	36	66	0.8
528697	3	15	39	72	0.5
528710	13	16	28	63	1.0
528711	8	13	14	62	>1.5
528726	0	8	36	72	0.6

528757	4	10	29	76	0.6
528758	1	5	28	62	1.1
528772	0	2	21	63	1.2
528773	9	8	28	70	0.8
528791	4	9	41	69	0.6
528822	0	0	40	46	>1.5
528833	0	23	47	82	0.4
528846	10	19	49	85	0.3
528847	0	19	45	75	0.4
528852	5	33	66	93	0.2
528853	19	46	77	95	0.1

EJEMPLO 13: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DE STAT3 HUMANA EN CÉLULAS HUVEC

Se diseñaron oligonucleótidos antisentido contra un ácido nucleico de STAT3 humana y se probaron para su efecto sobre la expresión del ARNm de STAT3 humana *in vitro*. Los oligonucleótidos antisentido quiméricos de las Tablas 13 y 14 son gápmeros de 16 o 17 nucleótidos de longitud que tienen diversas modificaciones químicas. Cada gápmero comprende un segmento espaciador central que consiste en nueve o diez 2'-desoxinucleósidos y está flanqueado a ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por extensiones que comprenden 1, 2, 3, 4, o 5 nucleótidos cada uno. Cada uno de los nucleótidos en las extensiones comprenden una modificación con azúcar 2'-MOE o una modificación con azúcar cEt. Los motivos de gápmero incluyen 3-10-3, 4-9-3, 2-10-4, 1-10-5, y 3-10-4. La columna de la química de Tablas 13 y 14 provee el motivo de azúcar de cada gápmero, en donde 'e' indica un nucleósido 2'-MOE, 'k' indica un nucleósido de etilo (cEt) constreñido, y 'd' indica un 2'- desoxinucleósido. Las uniones internucleosídicas a lo largo de cada gápmero son uniones fosforotioato (P=S). Todos los residuos de citosina a lo largo de cada gápmero son 5-metilcitosinas.

La potencia de los oligonucleótidos antisentido quiméricos se comparó con los ISIS 481464, ISIS 518344, e ISIS 518349 (que se describieron previamente en la presente).

Las células HuVEC cultivadas a una densidad de 20,000 células por pocillo se transfectaron usando electroporación con 1,000 nM de oligonucleótido antisentido. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de cebadores y sonda para humano RTS199, que se describió previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

"Sitio de inicio de blanco en humano" indica el nucleósido ubicado más hacia 5' contra el que está dirigido el gápmero en la secuencia génica humana. "Sitio de finalización de blanco en humano" indica el nucleósido ubicado más hacia 3' contra el que está dirigido el gápmero en la secuencia génica humana. Cada gápmero que se lista en la Tabla 13 se dirige contra el ARNm de STAT3 humana, designada en la presente como SEQ ID Nº 1 (No. de Acceso a GENBANK NM_139276.2). Cada gápmero que se lista en la Tabla 14 se dirige contra la secuencia genómica de STAT3 humana, designada en la presente como SEQ ID Nº 2 (el complemento del No. de Acceso a GENBANK NT_010755.14 truncado entre los nucleótidos 4185000 y 4264000).

TABLA 13

Niveles de inhibición del ARNm de STAT3 humana por oligonucleótidos antisentido quiméricos contra la SEQ ID Nº 1

Sitio de inicio en Humano	Sitio de Finalización en Humano	ISIS N°	Secuencia	Química	% de inhibición	SEQ ID Nº
728	743	530423	AGATTCTCTACCACTT	k-d(10)-k-e-k-e-e	70	1054
729	745	530053	GGAGATTCTCTACCACT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	84	1055
729	744	530373	GAGATTCTCTACCACT	e-k-d(10)-k-e-k-e	85	1056
730	745	530121	GGAGATTCTCTACCAC	e-k-k-d(10)-k-k-e	77	53
730	745	530168	GGAGATTCTCTACCAC	e-e-k-d(10)-k-k-e	75	53
730	745	530218	GGAGATTCTCTACCAC	e-d-k-d(10)-k-k-e	61	53
730	745	530268	GGAGATTCTCTACCAC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	76	53
730	745	530318	GGAGATTCTCTACCAC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	27	53
786	801	530424	ATCTTGCATGTCTCCT	k-d(10)-k-e-k-e-e	42	1057
787	803	530058	AGATCTTGCATGTCTCC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	73	1058
787	802	530374	GATCTTGCATGTCTCC	e-k-d(10)-k-e-k-e	71	647
788	803	530122	AGATCTTGCATGTCTC	e-k-k-d(10)-k-k-e	80	57
788	803	530169	AGATCTTGCATGTCTC	e-e-k-d(10)-k-k-e	72	57
788	803	530219	AGATCTTGCATGTCTC	e-d-k-d(10)-k-k-e	55	57
788	803	530269	AGATCTTGCATGTCTC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	76	57
788	803	530319	AGATCTTGCATGTCTC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	30	57
892	907	528400	CCGCCAGCTCACTCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	57	66
893	908	528401	CCCGCCAGCTCACTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	57	1059
894	909	528402	CCCCGCCAGCTCACTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	1060

897	912	528403	AAGCCCCGCCAGCTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	72	1061
898	913	528404	AAAGCCCCGCCAGCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	52	1062
899	914	528405	AAAAGCCCCGCCAGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	1063
900	915	528406	CAAAAGCCCCGCCAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	29	1064
901	916	528407	ACAAAAGCCCCGCCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	1065
903	918	528408	TGACAAAAGCCCCGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	1066
904	919	528409	CTGACAAAAGCCCCGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	1067
905	920	528410	GCTGACAAAAGCCCCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1068
906	921	528411	CGCTGACAAAAGCCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	49	1069
907	922	528412	TCGCTGACAAAAGCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1070
908	923	528413	ATCGCTGACAAAAGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	1071
909	924	528414	CATCGCTGACAAAAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	1072
911	926	528415	TCCATCGCTGACAAAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	11	1073
912	927	528416	CTCCATCGCTGACAAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	1074
913	928	528417	ACTCCATCGCTGACAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1075
914	929	528418	TACTCCATCGCTGACA	e-e-e-d(10)-k-k-k	19	1076
915	930	528419	GTACTCCATCGCTGAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	1077
916	931	528420	CGTACTCCATCGCTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	35	1078
930	945	528421	GAGAGTTTTCTGCACG	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	1079
932	947	528422	GTGAGAGTTTTCTGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1080
951	966	528423	GTCAGCCAGCTCCTCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	49	1081
962	977	528424	CGCCTCTTCCAGTCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	1082
964	979	528425	GCCGCCTCTTCCAGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	44	1083

965	980	528426	TGCCGCCTCTTCCAGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	1084
970	985	528427	TCTGTTGCCGCCTCTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	1085
971	986	528428	ATCTGTTGCCGCCTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	1086
972	987	528429	AATCTGTTGCCGCCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	23	1087
973	988	528430	CAATCTGTTGCCGCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	1088
974	989	528431	GCAATCTGTTGCCGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	48	1089
975	990	528432	GGCAATCTGTTGCCGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	1090
976	991	528433	AGGCAATCTGTTGCCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1091
977	992	528434	CAGGCAATCTGTTGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	8	1092
978	993	528435	GCAGGCAATCTGTTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	13	1093
982	997	528436	CAATGCAGGCAATCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	1094
983	998	528437	CCAATGCAGGCAATCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	26	1095
984	999	528438	TCCAATGCAGGCAATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	1096
985	1000	528439	CTCCAATGCAGGCAAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	2	1097
986	1001	528440	CCTCCAATGCAGGCAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	1098
1003	1018	528441	GGCAGATGTTGGGCGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	8	1099
1004	1019	528442	AGGCAGATGTTGGGCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1100
1005	1020	528443	TAGGCAGATGTTGGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	1	1101
1006	1021	528444	CTAGGCAGATGTTGGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1102
1007	1022	528445	TCTAGGCAGATGTTGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	7	1103
1008	1023	528446	ATCTAGGCAGATGTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	3	1104
1010	1025	528447	CGATCTAGGCAGATGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	72
1011	1026	528448	CCGATCTAGGCAGATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	13	1105

1013	1028	528449	AGCCGATCTAGGCAGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	4	1106
1014	1029	528450	TAGCCGATCTAGGCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	11	1107
1015	1030	528451	CTAGCCGATCTAGGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	5	1108
1016	1031	528452	TCTAGCCGATCTAGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	5	1109
1017	1032	528453	TTCTAGCCGATCTAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	24	1110
1018	1033	528454	TTTCTAGCCGATCTAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	29	1111
1019	1034	528455	TTTTCTAGCCGATCTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	1112
1020	1035	528456	GTTTTCTAGCCGATCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	1113
1022	1037	528457	CAGTTTTCTAGCCGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	50	1114
1023	1038	528458	CCAGTTTTCTAGCCGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	70	1115
1024	1039	528459	TCCAGTTTTCTAGCCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	56	1116
1025	1040	528460	ATCCAGTTTTCTAGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	1117
1029	1044	528461	CGTTATCCAGTTTTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	47	1118
1043	1058	528462	GATTCTGCTAATGACG	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	1119
1044	1059	528463	AGATTCTGCTAATGAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	1120
1048	1063	528464	GTTGAGATTCTGCTAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	1121
1049	1064	528465	AGTTGAGATTCTGCTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	48	1122
1056	1071	528466	GGTCTGAAGTTGAGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	1123
1058	1073	528467	CGGGTCTGAAGTTGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	44	1124
1059	1074	528468	ACGGGTCTGAAGTTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	1125
1060	1075	528469	GACGGGTCTGAAGTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	1126
1061	1076	528470	TGACGGGTCTGAAGTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	34	1127
1062	1077	528471	TTGACGGGTCTGAAGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	19	1128

1063	1078	528472	GTTGACGGGTCTGAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	1129
1064	1079	528473	TGTTGACGGGTCTGAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	1130
1065	1080	528474	TTGTTGACGGGTCTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	55	1131
1066	1081	528475	TTTGTTGACGGGTCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	63	1132
1067	1082	528476	ATTTGTTGACGGGTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	65	1133
1899	1914	530425	GCCCTTGCCAGCCATG	k-d(10)-k-e-k-e-e	73	1134
1900	1916	530054	AAGCCCTTGCCAGCCAT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	75	1135
1900	1915	530375	AGCCCTTGCCAGCCAT	e-k-d(10)-k-e-k-e	77	1136
1901	1916	530123	AAGCCCTTGCCAGCCA	e-k-k-d(10)-k-k-e	86	144
1901	1916	530170	AAGCCCTTGCCAGCCA	e-e-k-d(10)-k-k-e	87	144
1901	1916	530220	AAGCCCTTGCCAGCCA	e-d-k-d(10)-k-k-e	74	144
1901	1916	530270	AAGCCCTTGCCAGCCA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	87	144
1901	1916	530320	AAGCCCTTGCCAGCCA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	17	144
1946	1961	530426	TTTTTCACAAGGTCAA	k-d(10)-k-e-k-e-e	55	1137
1947	1963	530059	ACTTTTTCACAAGGTCA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	73	1138
1947	1962	530376	CTTTTTCACAAGGTCA	e-k-d(10)-k-e-k-e	77	1139
1948	1963	530124	ACTTTTTCACAAGGTC	e-k-k-d(10)-k-k-e	79	153
1948	1963	530171	ACTTTTTCACAAGGTC	e-e-k-d(10)-k-k-e	69	153
1948	1963	530221	ACTTTTTCACAAGGTC	e-d-k-d(10)-k-k-e	64	153
1948	1963	530271	ACTTTTTCACAAGGTC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	73	153
1948	1963	530321	ACTTTTTCACAAGGTC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	44	153
2204	2219	530427	ATGATCTTATAGCCCA	k-d(10)-k-e-k-e-e	43	931
2205	2221	530060	CCATGATCTTATAGCCC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	77	1140

2205	2220	530377	CATGATCTTATAGCCC	e-k-d(10)-k-e-k-e	66	932
2206	2221	530125	CCATGATCTTATAGCC	e-k-k-d(10)-k-k-e	65	175
2206	2221	530172	CCATGATCTTATAGCC	e-e-k-d(10)-k-k-e	59	175
2206	2221	530222	CCATGATCTTATAGCC	e-d-k-d(10)-k-k-e	48	175
2206	2221	530272	CCATGATCTTATAGCC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	63	175
2206	2221	530322	CCATGATCTTATAGCC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	55	175
2679	2694	530428	TAGCAGAAGTAGGAGA	k-d(10)-k-e-k-e-e	49	1141
2680	2696	530061	GATAGCAGAAGTAGGAG	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	49	1142
2680	2695	530378	ATAGCAGAAGTAGGAG	e-k-d(10)-k-e-k-e	48	1143
2681	2696	530126	GATAGCAGAAGTAGGA	e-k-k-d(10)-k-k-e	70	223
2681	2696	530173	GATAGCAGAAGTAGGA	e-e-k-d(10)-k-k-e	62	223
2681	2696	530223	GATAGCAGAAGTAGGA	e-d-k-d(10)-k-k-e	44	223
2681	2696	530273	GATAGCAGAAGTAGGA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	63	223
2681	2696	530323	GATAGCAGAAGTAGGA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	63	223
3012	3027	530513	TTGGATGTCAGCAAGG	k-d(10)-k-e-k-e-e	88	1047
3013	3028	530507	TTTGGATGTCAGCAAG	e-k-d(10)-k-e-k-e	86	1144
3013	3028	530514	TTTGGATGTCAGCAAG	k-d(10)-k-e-k-e-e	80	1144
3014	3029	530430	ATTTGGATGTCAGCAA	k-d(10)-k-e-k-e-e	87	1145
3014	3029	530468	ATTTGGATGTCAGCAA	e-k-k-d(10)-k-k-e	81	1145
3014	3029	530476	ATTTGGATGTCAGCAA	e-e-k-d(10)-k-k-e	82	1145
3014	3029	530484	ATTTGGATGTCAGCAA	e-d-k-d(10)-k-k-e	74	1145
3014	3029	530492	ATTTGGATGTCAGCAA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	83	1145
3014	3029	530500	ATTTGGATGTCAGCAA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	56	1145

3014	3029	530508	ATTTGGATGTCAGCAA	e-k-d(10)-k-e-k-e	83	1145
3015	3031	530062	CTATTTGGATGTCAGCA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	94	1146
3015	3030	530380	TATTTGGATGTCAGCA	e-k-d(10)-k-e-k-e	94	1147
3015	3030	530469	TATTTGGATGTCAGCA	e-k-k-d(10)-k-k-e	91	1147
3015	3030	530477	TATTTGGATGTCAGCA	e-e-k-d(10)-k-k-e	87	1147
3015	3030	530485	TATTTGGATGTCAGCA	e-d-k-d(10)-k-k-e	87	1147
3015	3030	530493	TATTTGGATGTCAGCA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	81	1147
3015	3030	530501	TATTTGGATGTCAGCA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	74	1147
3015	3030	530515	TATTTGGATGTCAGCA	k-d(10)-k-e-k-e-e	87	1147
3016	3031	481464	CTATTTGGATGTCAGC	k-k-k-d(10)-k-k-k	93	245
3016	3031	518349	CTATTTGGATGTCAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	58	245
3016	3031	519637	CTATTTGGATGTCAGC	e-k-k-d(10)-k-k-e	96	245
3016	3031	530175	CTATTTGGATGTCAGC	e-e-k-d(10)-k-k-e	93	245
3016	3031	530225	CTATTTGGATGTCAGC	e-d-k-d(10)-k-k-e	85	245
3016	3031	530275	CTATTTGGATGTCAGC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	91	245
3016	3031	530325	CTATTTGGATGTCAGC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	91	245
3017	3032	530470	TCTATTTGGATGTCAG	e-k-k-d(10)-k-k-e	91	1148
3017	3032	530478	TCTATTTGGATGTCAG	e-e-k-d(10)-k-k-e	87	1148
3017	3032	530486	TCTATTTGGATGTCAG	e-d-k-d(10)-k-k-e	84	1148
3017	3032	530494	TCTATTTGGATGTCAG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	60	1148
3017	3032	530502	TCTATTTGGATGTCAG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	64	1148
3017	3032	530509	TCTATTTGGATGTCAG	e-k-d(10)-k-e-k-e	80	1148
3018	3033	530471	TTCTATTTGGATGTCA	e-k-k-d(10)-k-k-e	83	1149

3018	3033	530479	TTCTATTTGGATGTCA	e-e-k-d(10)-k-k-e	74	1149
3018	3033	530487	TTCTATTTGGATGTCA	e-d-k-d(10)-k-k-e	71	1149
3018	3033	530495	TTCTATTTGGATGTCA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	68	1149
3018	3033	530503	TTCTATTTGGATGTCA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	53	1149
3459	3474	530431	CACCAAGGAGGCTGTT	k-d(10)-k-e-k-e-e	44	1150
3460	3476	530055	AGCACCAAGGAGGCTGT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	45	1151
3460	3475	530381	GCACCAAGGAGGCTGT	e-k-d(10)-k-e-k-e	74	1152
3461	3476	530128	AGCACCAAGGAGGCTG	e-k-k-d(10)-k-k-e	52	257
3461	3476	530176	AGCACCAAGGAGGCTG	e-e-k-d(10)-k-k-e	66	257
3461	3476	530226	AGCACCAAGGAGGCTG	e-d-k-d(10)-k-k-e	51	257
3461	3476	530276	AGCACCAAGGAGGCTG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	70	257
3461	3476	530326	AGCACCAAGGAGGCTG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	52	257
3527	3542	528860	GGTTTGACCTGAAGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	58	1153
3528	3543	528861	GGGTTTGACCTGAAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	1154
3529	3544	528862	AGGGTTTGACCTGAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	57	1155
3530	3545	528863	AAGGGTTTGACCTGAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	43	1156
3531	3546	528864	TAAGGGTTTGACCTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	50	1157
3532	3547	528865	TTAAGGGTTTGACCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	1158
3547	3562	528866	GCAGCTTCAGATGTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	60	1159
3548	3563	528867	TGCAGCTTCAGATGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	47	1160
3583	3598	530388	CTTAAACCTTCCTATT	k-d(10)-k-e-k-e-e	14	1161
3584	3599	530338	CCTTAAACCTTCCTAT	e-k-d(10)-k-e-k-e	47	1162
3585	3600	530086	TCCTTAAACCTTCCTA	e-k-k-d(10)-k-k-e	58	273

3585	3600	530133	TCCTTAAACCTTCCTA	e-e-k-d(10)-k-k-e	53	273
3585	3600	530183	TCCTTAAACCTTCCTA	e-d-k-d(10)-k-k-e	52	273
3585	3600	530233	TCCTTAAACCTTCCTA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	29	273
3585	3600	530283	TCCTTAAACCTTCCTA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	32	273
3590	3605	528868	GATTCTCCTTAAACCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	1163
3591	3606	530389	AGATTCTCCTTAAACC	k-d(10)-k-e-k-e-e	44	1164
3592	3607	530339	TAGATTCTCCTTAAAC	e-k-d(10)-k-e-k-e	41	1165
3593	3608	530087	TTAGATTCTCCTTAAA	e-k-k-d(10)-k-k-e	43	1166
3593	3608	530134	TTAGATTCTCCTTAAA	e-e-k-d(10)-k-k-e	28	1166
3593	3608	530184	TTAGATTCTCCTTAAA	e-d-k-d(10)-k-k-e	13	1166
3593	3608	530234	TTAGATTCTCCTTAAA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	15	1166
3593	3608	530284	TTAGATTCTCCTTAAA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	14	1166
3595	3610	530390	GCTTAGATTCTCCTTA	k-d(10)-k-e-k-e-e	83	1167
3596	3611	530340	TGCTTAGATTCTCCTT	e-k-d(10)-k-e-k-e	89	1168
3597	3612	528869	ATGCTTAGATTCTCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	83	1169
3597	3612	530088	ATGCTTAGATTCTCCT	e-k-k-d(10)-k-k-e	90	1169
3597	3612	530135	ATGCTTAGATTCTCCT	e-e-k-d(10)-k-k-e	91	1169
3597	3612	530185	ATGCTTAGATTCTCCT	e-d-k-d(10)-k-k-e	85	1169
3597	3612	530235	ATGCTTAGATTCTCCT	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	28	1169
3597	3612	530285	ATGCTTAGATTCTCCT	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	86	1169
3597	3612	530391	ATGCTTAGATTCTCCT	k-d(10)-k-e-k-e-e	79	1169
3598	3614	530021	AAATGCTTAGATTCTCC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	87	1170
3598	3613	530341	AATGCTTAGATTCTCC	e-k-d(10)-k-e-k-e	88	1171

3599	3614	530089	AAATGCTTAGATTCTC	e-k-k-d(10)-k-k-e	71	1172
3599	3614	530136	AAATGCTTAGATTCTC	e-e-k-d(10)-k-k-e	66	1172
3599	3614	530186	AAATGCTTAGATTCTC	e-d-k-d(10)-k-k-e	51	1172
3599	3614	530236	AAATGCTTAGATTCTC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	74	1172
3599	3614	530286	AAATGCTTAGATTCTC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	56	1172
3682	3697	528870	GTAAGCACCCTCTGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	26	1173
3684	3699	528871	TTGTAAGCACCCTCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	1174
3686	3701	528872	GGTTGTAAGCACCCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	47	1175
3687	3702	528873	AGGTTGTAAGCACCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	1176
3688	3703	528874	AAGGTTGTAAGCACCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	54	1177
3690	3705	528875	TCAAGGTTGTAAGCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	1178
3691	3706	528876	GTCAAGGTTGTAAGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	1179
3692	3707	528877	AGTCAAGGTTGTAAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	1180
3694	3709	528878	GGAGTCAAGGTTGTAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	6	1181
3695	3710	528879	GGGAGTCAAGGTTGTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1182
3714	3729	530392	GATCAAGTCCAGGGAG	k-d(10)-k-e-k-e-e	47	1183
3715	3731	530022	CAGATCAAGTCCAGGGA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	80	1184
3715	3730	530342	AGATCAAGTCCAGGGA	e-k-d(10)-k-e-k-e	70	1185
3715	3730	530393	AGATCAAGTCCAGGGA	k-d(10)-k-e-k-e-e	46	1185
3716	3732	530023	GCAGATCAAGTCCAGGG	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	74	1186
3716	3731	530090	CAGATCAAGTCCAGGG	e-k-k-d(10)-k-k-e	78	1187
3716	3731	530137	CAGATCAAGTCCAGGG	e-e-k-d(10)-k-k-e	76	1187
3716	3731	530187	CAGATCAAGTCCAGGG	e-d-k-d(10)-k-k-e	68	1187

3716	3731	530237	CAGATCAAGTCCAGGG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	36	1187
3716	3731	530287	CAGATCAAGTCCAGGG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	56	1187
3716	3731	530343	CAGATCAAGTCCAGGG	e-k-d(10)-k-e-k-e	68	1187
3716	3731	530394	CAGATCAAGTCCAGGG	k-d(10)-k-e-k-e-e-e	49	1187
3717	3732	518343	GCAGATCAAGTCCAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	5	1188
3717	3733	530024	AGCAGATCAAGTCCAGG	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	79	1189
3717	3732	530091	GCAGATCAAGTCCAGG	e-k-k-d(10)-k-k-e	81	1188
3717	3732	530138	GCAGATCAAGTCCAGG	e-e-k-d(10)-k-k-e	81	1188
3717	3732	530188	GCAGATCAAGTCCAGG	e-d-k-d(10)-k-k-e	78	1188
3717	3732	530238	GCAGATCAAGTCCAGG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	29	1188
3717	3732	530288	GCAGATCAAGTCCAGG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	69	1188
3717	3732	530344	GCAGATCAAGTCCAGG	e-k-d(10)-k-e-k-e	85	1188
3718	3733	530092	AGCAGATCAAGTCCAG	e-k-k-d(10)-k-k-e	85	1190
3718	3733	530139	AGCAGATCAAGTCCAG	e-e-k-d(10)-k-k-e	79	1190
3718	3733	530189	AGCAGATCAAGTCCAG	e-d-k-d(10)-k-k-e	77	1190
3718	3733	530239	AGCAGATCAAGTCCAG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	61	1190
3718	3733	530289	AGCAGATCAAGTCCAG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	75	1190
3720	3735	528880	ACAGCAGATCAAGTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	65	1191
3721	3736	528881	AACAGCAGATCAAGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	44	1192
3737	3752	528882	ACAACCTAGCCTCTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1193
3738	3753	528883	AACAACCTAGCCTCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	46	1194
3740	3755	528884	GAAACAACCTAGCCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	1195
3741	3756	528885	AGAAACAACCTAGCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	1196

3742	3757	528886	CAGAAACAACCTAGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	1197
3755	3770	528887	GATAAGGCACCCACAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	1198
3756	3771	528888	TGATAAGGCACCCACA	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	1199
3757	3772	528889	CTGATAAGGCACCCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	1200
3759	3774	528890	CCCTGATAAGGCACCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	1201
3760	3775	528891	GCCCTGATAAGGCACC	e-e-e-d(10)-k-k-k	49	1202
3765	3780	528892	TCCCAGCCCTGATAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1203
3767	3782	528893	TATCCCAGCCCTGATA	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1204
3770	3785	528894	AAGTATCCCAGCCCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	1205
3771	3786	528895	GAAGTATCCCAGCCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1206
3772	3787	528896	AGAAGTATCCCAGCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1207
3773	3788	528897	CAGAAGTATCCCAGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	1208
3892	3907	528898	TGAGACCAGGATTCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	1209
3896	3911	528899	GTCCTGAGACCAGGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	19	1210
3977	3992	528900	AGCTCAACCAGACACG	e-e-e-d(10)-k-k-k	54	311
3979	3994	528901	TGAGCTCAACCAGACA	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	1211
3984	3999	528902	TTCCCTGAGCTCAACC	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	1212
3992	4007	528903	GAACCATATTCCCTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	313
3995	4010	528904	TAAGAACCATATTCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	1213
4022	4037	518344	GCCACTGGATATCACC	e-e-e-d(10)-k-k-k	89	317
4067	4082	528905	TAAGCCTTTGCCCTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	64	1214
4068	4083	528906	GTAAGCCTTTGCCCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	53	1215
4069	4084	528907	AGTAAGCCTTTGCCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	1216

4070	4085	528908	CAGTAAGCCTTTGCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	1217
4072	4087	528909	ATCAGTAAGCCTTTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	53	1218
4073	4088	528910	TATCAGTAAGCCTTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	47	1219
4077	4092	528911	AGTTTATCAGTAAGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	58	1220
4083	4098	528912	GACTCAAGTTTATCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	1221
4085	4100	528913	CAGACTCAAGTTTATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1222
4086	4101	528914	GCAGACTCAAGTTTAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1223
4087	4102	528915	GGCAGACTCAAGTTTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	1	1224
4088	4103	528916	GGGCAGACTCAAGTTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1225
4089	4104	528917	AGGGCAGACTCAAGTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	1226
4091	4106	528918	CGAGGGCAGACTCAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	2	1227
4093	4108	528919	TACGAGGGCAGACTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	324
4094	4109	528920	ATACGAGGGCAGACTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	1228
4095	4110	528921	CATACGAGGGCAGACT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1229
4096	4111	528922	TCATACGAGGGCAGAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	8	1230
4098	4113	528923	CCTCATACGAGGGCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	2	1231
4099	4114	528924	CCCTCATACGAGGGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	2	1232
4100	4115	528925	ACCCTCATACGAGGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1233
4225	4240	528926	TACGCACAGGAGAGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	1233
4226	4241	528927	ATACGCACAGGAGAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1234
4227	4242	528928	CATACGCACAGGAGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	6	1235
4228	4243	528929	CCATACGCACAGGAGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	4	1236
4229	4244	528930	CCCATACGCACAGGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	1237

4230	4245	528931	TCCCATACGCACAGGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1238
4231	4246	528932	TTCCCATACGCACAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	1239
4232	4247	528933	GTTCCCATACGCACAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	1240
4233	4248	528934	TGTTCCCATACGCACA	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	1241
4234	4249	528935	GTGTTCCCATACGCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	1242
4234	4249	530395	GTGTTCCCATACGCAC	k-d(10)-k-e-k-e-e	71	1242
4235	4250	528936	GGTGTTCCCATACGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	71	1243
4235	4251	530025	AGGTGTTCCCATACGCA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	90	1244
4235	4250	530345	GGTGTTCCCATACGCA	e-k-d(10)-k-e-k-e	93	1243
4235	4250	530396	GGTGTTCCCATACGCA	k-d(10)-k-e-k-e-e	71	1243
4236	4251	528937	AGGTGTTCCCATACGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	73	1245
4236	4252	530026	TAGGTGTTCCCATACGC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	87	1246
4236	4251	530093	AGGTGTTCCCATACGC	e-k-k-d(10)-k-k-e	95	1245
4236	4251	530140	AGGTGTTCCCATACGC	e-e-k-d(10)-k-k-e	89	1245
4236	4251	530190	AGGTGTTCCCATACGC	e-d-k-d(10)-k-k-e	82	1245
4236	4251	530240	AGGTGTTCCCATACGC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	50	1245
4236	4251	530290	AGGTGTTCCCATACGC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	69	1245
4236	4251	530346	AGGTGTTCCCATACGC	e-k-d(10)-k-e-k-e	89	1245
4237	4252	528938	TAGGTGTTCCCATACG	e-e-e-d(10)-k-k-k	72	336
4237	4252	530094	TAGGTGTTCCCATACG	e-k-k-d(10)-k-k-e	88	336
4237	4252	530141	TAGGTGTTCCCATACG	e-e-k-d(10)-k-k-e	80	336
4237	4252	530191	TAGGTGTTCCCATACG	e-d-k-d(10)-k-k-e	74	336
4237	4252	530241	TAGGTGTTCCCATACG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	53	336

4237	4252	530291	TAGGTGTTCCCATACG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	68	336
4238	4253	528939	CTAGGTGTTCCCATAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1247
4239	4254	528940	GCTAGGTGTTCCCATA	e-e-e-d(10)-k-k-k	62	1248
4240	4255	528941	TGCTAGGTGTTCCCAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	49	1249
4242	4257	528942	CGTGCTAGGTGTTCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	77	1250
4304	4319	528943	CAAGGTGGTTTTGAGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	1251
4305	4320	528944	GCAAGGTGGTTTTGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	344
4320	4335	528945	CTCTGATCAGCTGAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	74	1252
4321	4336	528946	ACTCTGATCAGCTGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	56	1253
4362	4377	528947	GAGACCAGCTAATTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	1254
4395	4410	528948	CATCTTAGAGAAGGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	59	1255
4435	4450	528949	TCAACTGTCTCCAGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	67	1256
4435	4450	530397	TCAACTGTCTCCAGGC	k-d(10)-k-e-k-e-e	60	1256
4436	4451	528950	ATCAACTGTCTCCAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	57	1257
4436	4452	530027	CATCAACTGTCTCCAGG	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	56	1258
4436	4451	530347	ATCAACTGTCTCCAGG	e-k-d(10)-k-e-k-e	49	1257
4437	4452	530095	CATCAACTGTCTCCAG	e-k-k-d(10)-k-k-e	40	354
4437	4452	530142	CATCAACTGTCTCCAG	e-e-k-d(10)-k-k-e	43	354
4437	4452	530192	CATCAACTGTCTCCAG	e-d-k-d(10)-k-k-e	42	354
4437	4452	530242	CATCAACTGTCTCCAG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	0	354
4437	4452	530292	CATCAACTGTCTCCAG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	36	354
4437	4452	530398	CATCAACTGTCTCCAG	k-d(10)-k-e-k-e-e	28	354
4438	4454	530028	CACATCAACTGTCTCCA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	57	1259

4438	4453	530348	ACATCAACTGTCTCCA	e-k-d(10)-k-e-k-e	58	1260
4439	4454	530096	CACATCAACTGTCTCC	e-k-k-d(10)-k-k-e	72	356
4439	4454	530143	CACATCAACTGTCTCC	e-e-k-d(10)-k-k-e	74	356
4439	4454	530193	CACATCAACTGTCTCC	e-d-k-d(10)-k-k-e	62	356
4439	4454	530243	CACATCAACTGTCTCC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	34	356
4439	4454	530293	CACATCAACTGTCTCC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	59	356
4441	4456	528951	GACACATCAACTGTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	16	1261
4475	4490	528952	GAAGAGTGTTGCTGGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	57	1262
4477	4492	528953	CTGAAGAGTGTTGCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	46	1263
4479	4494	528954	TACTGAAGAGTGTTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	1264
4485	4500	530510	ATTATGTACTGAAGAG	k-d(10)-k-e-k-e-e	53	1265
4486	4501	530504	TATTATGTACTGAAGA	e-k-d(10)-k-e-k-e	25	1266
4486	4501	530511	TATTATGTACTGAAGA	k-d(10)-k-e-k-e-e	31	1266
4487	4502	530432	TTATTATGTACTGAAG	k-d(10)-k-e-k-e-e	15	1267
4487	4502	530463	TTATTATGTACTGAAG	e-k-k-d(10)-k-k-e	20	1267
4487	4502	530472	TTATTATGTACTGAAG	e-e-k-d(10)-k-k-e	17	1267
4487	4502	530480	TTATTATGTACTGAAG	e-d-k-d(10)-k-k-e	4	1267
4487	4502	530488	TTATTATGTACTGAAG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	13	1267
4487	4502	530496	TTATTATGTACTGAAG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	0	1267
4487	4502	530505	TTATTATGTACTGAAG	e-k-d(10)-k-e-k-e	37	1267
4488	4504	530063	GCTTATTATGTACTGAA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	74	1268
4488	4503	530382	CTTATTATGTACTGAA	e-k-d(10)-k-e-k-e	17	1269
4488	4503	530465	CTTATTATGTACTGAA	e-k-k-d(10)-k-k-e	63	1269

4488	4503	530473	CTTATTATGTACTGAA	e-e-k-d(10)-k-k-e	45	1269
4488	4503	530481	CTTATTATGTACTGAA	e-d-k-d(10)-k-k-e	14	1269
4488	4503	530489	CTTATTATGTACTGAA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	13	1269
4488	4503	530497	CTTATTATGTACTGAA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	7	1269
4488	4503	530512	CTTATTATGTACTGAA	k-d(10)-k-e-k-e-e	21	1269
4489	4504	519638	GCTTATTATGTACTGA	e-k-k-d(10)-k-k-e	86	362
4489	4504	530177	GCTTATTATGTACTGA	e-e-k-d(10)-k-k-e	71	362
4489	4504	530227	GCTTATTATGTACTGA	e-d-k-d(10)-k-k-e	51	362
4489	4504	530277	GCTTATTATGTACTGA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	70	362
4489	4504	530327	GCTTATTATGTACTGA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	61	362
4490	4505	530466	AGCTTATTATGTACTG	e-k-k-d(10)-k-k-e	82	1270
4490	4505	530474	AGCTTATTATGTACTG	e-e-k-d(10)-k-k-e	62	1270
4490	4505	530482	AGCTTATTATGTACTG	e-d-k-d(10)-k-k-e	53	1270
4490	4505	530490	AGCTTATTATGTACTG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	42	1270
4490	4505	530498	AGCTTATTATGTACTG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	45	1270
4490	4505	530506	AGCTTATTATGTACTG	e-k-d(10)-k-e-k-e	70	1270
4491	4506	530467	AAGCTTATTATGTACT	e-k-k-d(10)-k-k-e	50	1271
4491	4506	530475	AAGCTTATTATGTACT	e-e-k-d(10)-k-k-e	26	1271
4491	4506	530483	AAGCTTATTATGTACT	e-d-k-d(10)-k-k-e	19	1271
4491	4506	530491	AAGCTTATTATGTACT	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	13	1271
4491	4506	530499	AAGCTTATTATGTACT	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	15	1271
4492	4507	528955	TAAGCTTATTATGTAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1272
4499	4514	528956	TATCAGTTAAGCTTAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1273

4502	4517	528957	GTTTATCAGTTAAGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	1274
4539	4554	530433	CAATGGTAAGCCCAAG	k-d(10)-k-e-k-e-e	62	1275
4540	4555	528958	CCAATGGTAAGCCCAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	66	1276
4540	4556	530056	CCCAATGGTAAGCCCAA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	73	1277
4540	4555	530383	CCAATGGTAAGCCCAA	e-k-d(10)-k-e-k-e	64	1276
4541	4556	518345	CCCAATGGTAAGCCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	80	366
4541	4556	519636	CCCAATGGTAAGCCCA	e-k-k-d(10)-k-k-e	90	366
4541	4556	530178	CCCAATGGTAAGCCCA	e-e-k-d(10)-k-k-e	86	366
4541	4556	530228	CCCAATGGTAAGCCCA	e-d-k-d(10)-k-k-e	77	366
4541	4556	530278	CCCAATGGTAAGCCCA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	86	366
4541	4556	530328	CCCAATGGTAAGCCCA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	80	366
4542	4557	528959	ACCCAATGGTAAGCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	73	1277
4544	4559	528960	AAACCCAATGGTAAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	43	1278
4545	4560	528961	TAAACCCAATGGTAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	1279
4546	4561	528962	TTAAACCCAATGGTAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	13	1280
4547	4562	528963	TTTAAACCCAATGGTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	2	1281
4554	4569	528964	CCTATGATTTAAACCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	17	1282
4558	4573	528965	GGTCCCTATGATTTAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	1283
4559	4574	528966	AGGTCCCTATGATTTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1284
4615	4630	528967	CCTAAGGCCATGAACT	e-e-e-d(10)-k-k-k	19	374
4616	4631	528968	ACCTAAGGCCATGAAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	1285
4617	4632	528969	TACCTAAGGCCATGAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	1286
4618	4633	528970	CTACCTAAGGCCATGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	55	1287

4619	4634	528971	GCTACCTAAGGCCATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	66	1288
4620	4635	528972	TGCTACCTAAGGCCAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	56	1289
4621	4636	528973	ATGCTACCTAAGGCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	71	1290
4622	4637	528974	CATGCTACCTAAGGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	58	1291
4623	4638	528975	ACATGCTACCTAAGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	34	1292
4636	4651	528976	GTTAAGACCAGATACA	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	1293
4637	4652	528977	AGTTAAGACCAGATAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	1294
4638	4653	528978	GAGTTAAGACCAGATA	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	1295
4639	4654	528979	AGAGTTAAGACCAGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	62	1296
4644	4659	530399	CAATCAGAGTTAAGAC	k-d(10)-k-e-k-e-e	36	1297
4645	4661	530029	TACAATCAGAGTTAAGA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	29	1298
4645	4660	530349	ACAATCAGAGTTAAGA	e-k-d(10)-k-e-k-e	33	1299
4646	4661	528980	TACAATCAGAGTTAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	378
4646	4661	530097	TACAATCAGAGTTAAG	e-k-k-d(10)-k-k-e	41	378
4646	4661	530144	TACAATCAGAGTTAAG	e-e-k-d(10)-k-k-e	16	378
4646	4661	530194	TACAATCAGAGTTAAG	e-d-k-d(10)-k-k-e	28	378
4646	4661	530244	TACAATCAGAGTTAAG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	0	378
4646	4661	530294	TACAATCAGAGTTAAG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	7	378
4648	4663	528981	GCTACAATCAGAGTTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	52	1300
4649	4664	528982	TGCTACAATCAGAGTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	47	1301
4650	4665	528983	TTGCTACAATCAGAGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	44	1302
4662	4677	530400	CTCTCAGAACTTTTGC	k-d(10)-k-e-k-e-e	65	1303
4663	4679	530030	TCCTCTCAGAACTTTTG	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	47	1304

4663	4678	530350	CCTCTCAGAACTTTTG	e-k-d(10)-k-e-k-e	54	1305
4664	4679	530098	TCCTCTCAGAACTTTT	e-k-k-d(10)-k-k-e	42	380
4664	4679	530145	TCCTCTCAGAACTTTT	e-e-k-d(10)-k-k-e	38	380
4664	4679	530195	TCCTCTCAGAACTTTT	e-d-k-d(10)-k-k-e	43	380
4664	4679	530245	TCCTCTCAGAACTTTT	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	28	380
4664	4679	530295	TCCTCTCAGAACTTTT	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	39	380
4770	4785	528984	CCCACGGGATTCCCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1306
4771	4786	528985	ACCCACGGGATTCCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	1307
4772	4787	528986	AACCCACGGGATTCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	47	1308
4773	4788	528987	CAACCCACGGGATTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1309
4774	4789	528988	GCAACCCACGGGATTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	48	1310
4775	4790	528989	AGCAACCCACGGGATT	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	1311
4777	4792	528990	TAAGCAACCCACGGGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	1312
4778	4793	528991	GTAAGCAACCCACGGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	47	1313
4779	4794	528992	GGTAAGCAACCCACGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	1314
4780	4795	528993	AGGTAAGCAACCCACG	e-e-e-d(10)-k-k-k	54	1315
4780	4795	530434	AGGTAAGCAACCCACG	k-d(10)-k-e-k-e-e	51	1315
4781	4796	528994	TAGGTAAGCAACCCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	53	1316
4781	4797	530064	GTAGGTAAGCAACCCAC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	53	1317
4781	4796	530384	TAGGTAAGCAACCCAC	e-k-d(10)-k-e-k-e	48	1316
4782	4797	528995	GTAGGTAAGCAACCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	64	388
4782	4797	530129	GTAGGTAAGCAACCCA	e-k-k-d(10)-k-k-e	79	388
4782	4797	530179	GTAGGTAAGCAACCCA	e-e-k-d(10)-k-k-e	74	388

4782	4797	530229	GTAGGTAAGCAACCCA	e-d-k-d(10)-k-k-e	64	388
4782	4797	530279	GTAGGTAAGCAACCCA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	55	388
4782	4797	530329	GTAGGTAAGCAACCCA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	61	388
4784	4799	528996	AGGTAGGTAAGCAACC	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	1318
4788	4803	528997	TTATAGGTAGGTAAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	1319
4792	4807	528998	CACCTTATAGGTAGGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1320
4794	4809	528999	ACCACCTTATAGGTAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	1321
4797	4812	529000	TAAACCACCTTATAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1322
4798	4813	529001	ATAAACCACCTTATAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	7	1323
4810	4825	529002	GGACAGCAGCTTATAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	1324
4811	4826	529003	AGGACAGCAGCTTATA	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	1325
4811	4826	530401	AGGACAGCAGCTTATA	k-d(10)-k-e-k-e-e	41	1325
4812	4827	529004	CAGGACAGCAGCTTAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	1326
4812	4828	530031	CCAGGACAGCAGCTTAT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	58	1327
4812	4827	530351	CAGGACAGCAGCTTAT	e-k-d(10)-k-e-k-e	58	1326
4812	4827	530402	CAGGACAGCAGCTTAT	k-d(10)-k-e-k-e-e	60	1326
4813	4829	530032	GCCAGGACAGCAGCTTA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	74	1328
4813	4828	530099	CCAGGACAGCAGCTTA	e-k-k-d(10)-k-k-e	73	1329
4813	4828	530146	CCAGGACAGCAGCTTA	e-e-k-d(10)-k-k-e	70	1329
4813	4828	530196	CCAGGACAGCAGCTTA	e-d-k-d(10)-k-k-e	67	1329
4813	4828	530246	CCAGGACAGCAGCTTA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	39	1329
4813	4828	530296	CCAGGACAGCAGCTTA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	67	1329
4813	4828	530352	CCAGGACAGCAGCTTA	e-k-d(10)-k-e-k-e	67	1329

4814	4829	530100	GCCAGGACAGCAGCTT	e-k-k-d(10)-k-k-e	77	1330
4814	4829	530147	GCCAGGACAGCAGCTT	e-e-k-d(10)-k-k-e	84	1330
4814	4829	530197	GCCAGGACAGCAGCTT	e-d-k-d(10)-k-k-e	71	1330
4814	4829	530247	GCCAGGACAGCAGCTT	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	53	1330
4814	4829	530297	GCCAGGACAGCAGCTT	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	75	1330
4814	4829	530403	GCCAGGACAGCAGCTT	k-d(10)-k-e-k-e-e	77	1330
4815	4831	530033	TGGCCAGGACAGCAGCT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	65	1331
4815	4830	530353	GGCCAGGACAGCAGCT	e-k-d(10)-k-e-k-e	83	1332
4816	4831	530101	TGGCCAGGACAGCAGC	e-k-k-d(10)-k-k-e	59	1333
4816	4831	530148	TGGCCAGGACAGCAGC	e-e-k-d(10)-k-k-e	79	1333
4816	4831	530198	TGGCCAGGACAGCAGC	e-d-k-d(10)-k-k-e	54	1333
4816	4831	530248	TGGCCAGGACAGCAGC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	32	1333
4816	4831	530298	TGGCCAGGACAGCAGC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	73	1333
4827	4842	530404	TTTGAATGCAGTGGCC	k-d(10)-k-e-k-e-e	67	1334
4828	4844	530034	AATTTGAATGCAGTGGC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	69	1335
4828	4843	530354	ATTTGAATGCAGTGGC	e-k-d(10)-k-e-k-e	85	1336
4828	4843	530405	ATTTGAATGCAGTGGC	k-d(10)-k-e-k-e-e	55	1336
4829	4845	530035	GAATTTGAATGCAGTGG	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	69	1337
4829	4844	530102	AATTTGAATGCAGTGG	e-k-k-d(10)-k-k-e	71	1338
4829	4844	530149	AATTTGAATGCAGTGG	e-e-k-d(10)-k-k-e	70	1338
4829	4844	530199	AATTTGAATGCAGTGG	e-d-k-d(10)-k-k-e	58	1338
4829	4844	530249	AATTTGAATGCAGTGG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	47	1338
4829	4844	530299	AATTTGAATGCAGTGG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	47	1338

4829	4844	530355	AATTTGAATGCAGTGG	e-k-d(10)-k-e-k-e	72	1338
4830	4845	530103	GAATTTGAATGCAGTG	e-k-k-d(10)-k-k-e	77	390
4830	4845	530150	GAATTTGAATGCAGTG	e-e-k-d(10)-k-k-e	73	390
4830	4845	530200	GAATTTGAATGCAGTG	e-d-k-d(10)-k-k-e	63	390
4830	4845	530250	GAATTTGAATGCAGTG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	59	390
4830	4845	530300	GAATTTGAATGCAGTG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	65	390
4842	4857	530435	AAGTACACATTGGAAT	k-d(10)-k-e-k-e-e	62	1339
4843	4859	530057	TGAAGTACACATTGGAA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	69	1340
4843	4858	530385	GAAGTACACATTGGAA	e-k-d(10)-k-e-k-e	70	1341
4844	4859	529005	TGAAGTACACATTGGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	64	392
4844	4859	530130	TGAAGTACACATTGGA	e-k-k-d(10)-k-k-e	85	392
4844	4859	530180	TGAAGTACACATTGGA	e-e-k-d(10)-k-k-e	82	392
4844	4859	530230	TGAAGTACACATTGGA	e-d-k-d(10)-k-k-e	65	392
4844	4859	530280	TGAAGTACACATTGGA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	75	392
4844	4859	530330	TGAAGTACACATTGGA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	52	392
4852	4867	529006	TTACACTATGAAGTAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	16	1342
4929	4944	529007	AGTTAAAGTAGATACA	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1343
4934	4949	529008	CTGGAAGTTAAAGTAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	397
4943	4958	529009	CGTTTATTTCTGGAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	52	1344
4957	4972	529010	CGGTTCCTATATAACG	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	1345
4958	4973	529011	ACGGTTCCTATATAAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	1346

TABLA 14

Niveles de inhibición del ARNm de STAT3 humana por oligonucleótidos antisentido quiméricos contra la SEQ ID Nº 2

Sitio de inicio en Humano	Sitio de Finalización en Humano	ISIS N°	Secuencia	Química	% de inhibición	SEQ ID Nº
1359	1374	529012	GTCATCCCGAAGAGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	34	1347
1386	1401	529013	CCCGAGTCCCTTCCGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	1348
1390	1405	529014	GCGCCCCGAGTCCCTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	53	1349
1412	1427	529015	CGAAGAACGAAACTTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	8	1350
1418	1433	529016	TTTCTCCGAAGAACGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	1351
1461	1476	529017	CGAGTGCGCCCTCGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	52	1352
1548	1563	529018	GTGACAGTCGCTCCGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	1353
1549	1564	529019	CGTGACAGTCGCTCCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	1354
1590	1605	529020	GCGCTTTCCGACCCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	1355
1790	1805	529021	GTACCGGTCTGTCAAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	23	1356
1794	1809	529022	AAGAGTACCGGTCTGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	69	1357
1796	1811	529023	GAAAGAGTACCGGTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	72	1358
1906	1921	529024	CTGGCTTGACGGGTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	64	1359
1907	1922	529025	GCTGGCTTGACGGGTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	73	1360
1966	1981	529026	CCGACTTTACCAGGTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	78	1361
1968	1983	529027	GGCCGACTTTACCAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	92	1362
1972	1987	529028	TTCTGGCCGACTTTAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	13	1363
2031	2046	529029	CGTCCTATGCAATTAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	24	1364
2039	2054	529030	GTTCATTCCGTCCTAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	1365

2198	2213	529031	GACGGTTTGAATCTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	1366
2201	2216	529032	GGCGACGGTTTGAATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	1367
2204	2219	529033	TTGGGCGACGGTTTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	1368
2207	2222	529034	AACTTGGGCGACGGTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	54	1369
2253	2268	529035	CGACCTGATATGGCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	56	1370
2255	2270	529036	AACGACCTGATATGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	52	1371
2257	2272	529037	ACAACGACCTGATATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	24	1372
2338	2353	530406	ATACAGTAAGACCAGC	k-d(10)-k-e-k-e-e	65	1373
2339	2355	530036	ACATACAGTAAGACCAG	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	58	1374
2339	2354	530356	CATACAGTAAGACCAG	e-k-d(10)-k-e-k-e	65	1375
2340	2355	530104	ACATACAGTAAGACCA	e-k-k-d(10)-k-k-e	67	1376
2340	2355	530151	ACATACAGTAAGACCA	e-e-k-d(10)-k-k-e	64	1376
2340	2355	530201	ACATACAGTAAGACCA	e-d-k-d(10)-k-k-e	42	1376
2340	2355	530251	ACATACAGTAAGACCA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	58	1376
2340	2355	530301	ACATACAGTAAGACCA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	56	1376
2383	2398	530407	AAAATTTACAACCCAT	k-d(10)-k-e-k-e-e	9	1377
2384	2400	530037	CAAAAATTTACAACCCA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	42	1378
2384	2399	530357	AAAAATTTACAACCCA	e-k-d(10)-k-e-k-e	34	1379
2385	2400	530105	CAAAAATTTACAACCC	e-k-k-d(10)-k-k-e	40	1380
2385	2400	530152	CAAAAATTTACAACCC	e-e-k-d(10)-k-k-e	33	1380
2385	2400	530202	CAAAAATTTACAACCC	e-d-k-d(10)-k-k-e	10	1380
2385	2400	530252	CAAAAATTTACAACCC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	29	1380
2385	2400	530302	CAAAAATTTACAACCC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	14	1380

2408	2423	530408	AATGCTTTATCAGCAC	k-d(10)-k-e-k-e-e	36	1381
2409	2425	530038	CCAATGCTTTATCAGCA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	71	1382
2409	2424	530358	CAATGCTTTATCAGCA	e-k-d(10)-k-e-k-e	46	1383
2410	2425	530106	CCAATGCTTTATCAGC	e-k-k-d(10)-k-k-e	70	1384
2410	2425	530153	CCAATGCTTTATCAGC	e-e-k-d(10)-k-k-e	50	1384
2410	2425	530203	CCAATGCTTTATCAGC	e-d-k-d(10)-k-k-e	43	1384
2410	2425	530253	CCAATGCTTTATCAGC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	33	1384
2410	2425	530303	CCAATGCTTTATCAGC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	40	1384
2669	2684	530409	ACTAAAATCAAGGCTC	k-d(10)-k-e-k-e-e	42	1385
2670	2686	530039	AGACTAAAATCAAGGCT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	73	1386
2670	2685	530359	GACTAAAATCAAGGCT	e-k-d(10)-k-e-k-e	82	1387
2671	2686	530107	AGACTAAAATCAAGGC	e-k-k-d(10)-k-k-e	77	1388
2671	2686	530154	AGACTAAAATCAAGGC	e-e-k-d(10)-k-k-e	57	1388
2671	2686	530204	AGACTAAAATCAAGGC	e-d-k-d(10)-k-k-e	28	1388
2671	2686	530254	AGACTAAAATCAAGGC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	3	1388
2671	2686	530304	AGACTAAAATCAAGGC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	22	1388
2703	2718	530429	AATGGTTCTTTGTGAT	k-d(10)-k-e-k-e-e	60	1389
2704	2720	530065	CTAATGGTTCTTTGTGA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	70	1390
2704	2719	530379	TAATGGTTCTTTGTGA	e-k-d(10)-k-e-k-e	54	1391
2705	2720	530127	CTAATGGTTCTTTGTG	e-k-k-d(10)-k-k-e	80	411
2705	2720	530174	CTAATGGTTCTTTGTG	e-e-k-d(10)-k-k-e	69	411
2705	2720	530224	CTAATGGTTCTTTGTG	e-d-k-d(10)-k-k-e	32	411
2705	2720	530274	CTAATGGTTCTTTGTG	e-d-k-d(9)-k-k-e	38	411

2705	2720	530324	CTAATGGTTCTTTGTG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	32	411
5000	5015	530410	CTGAAATTCCTTGGTC	k-d(10)-k-e-k-e-e	53	1392
5001	5017	530040	AACTGAAATTCCTTGGT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	67	1393
5001	5016	530360	ACTGAAATTCCTTGGT	e-k-d(10)-k-e-k-e	70	1394
5002	5017	530108	AACTGAAATTCCTTGG	e-k-k-d(10)-k-k-e	70	1395
5002	5017	530155	AACTGAAATTCCTTGG	e-e-k-d(10)-k-k-e	53	1395
5002	5017	530205	AACTGAAATTCCTTGG	e-d-k-d(10)-k-k-e	44	1395
5002	5017	530255	AACTGAAATTCCTTGG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	33	1395
5002	5017	530305	AACTGAAATTCCTTGG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	22	1395
5699	5714	530411	ACTCTTTCAGTGGTTT	k-d(10)-k-e-k-e-e	91	1396
5700	5716	530041	GTACTCTTTCAGTGGTT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	89	1397
5700	5715	530361	TACTCTTTCAGTGGTT	e-k-d(10)-k-e-k-e	88	1398
5701	5716	530109	GTACTCTTTCAGTGGT	e-k-k-d(10)-k-k-e	89	1399
5701	5716	530156	GTACTCTTTCAGTGGT	e-e-k-d(10)-k-k-e	91	1399
5701	5716	530206	GTACTCTTTCAGTGGT	e-d-k-d(10)-k-k-e	89	1399
5701	5716	530256	GTACTCTTTCAGTGGT	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	33	1399
5701	5716	530306	GTACTCTTTCAGTGGT	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	83	1399
5883	5898	529038	CTACACTTTACGCTTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	1400
6474	6489	530436	AATTCATTCTTCCATA	k-d(10)-k-e-k-e-e	49	1401
6475	6491	530066	GAAATTCATTCTTCCAT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	82	1402
6475	6490	530386	AAATTCATTCTTCCAT	e-k-d(10)-k-e-k-e	53	1403
6476	6491	530131	GAAATTCATTCTTCCA	e-k-k-d(10)-k-k-e	97	413
6476	6491	530181	GAAATTCATTCTTCCA	e-e-k-d(10)-k-k-e	82	413

6476	6491	530231	GAAATTCATTCTTCCA	e-d-k-d(10)-k-k-e	75	413
6476	6491	530281	GAAATTCATTCTTCCA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	69	413
6476	6491	530331	GAAATTCATTCTTCCA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	53	413
6846	6861	529039	TTAAAGAGTTGCGGTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	1404
6847	6862	529040	ATTAAAGAGTTGCGGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	34	1405
8078	8093	530412	AGATTTACCTTCCTTA	k-d(10)-k-e-k-e-e	50	1406
8079	8095	530042	GCAGATTTACCTTCCTT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	78	1407
8079	8094	530362	CAGATTTACCTTCCTT	e-k-d(10)-k-e-k-e	76	1408
8080	8095	530110	GCAGATTTACCTTCCT	e-k-k-d(10)-k-k-e	84	1409
8080	8095	530157	GCAGATTTACCTTCCT	e-e-k-d(10)-k-k-e	69	1409
8080	8095	530207	GCAGATTTACCTTCCT	e-d-k-d(10)-k-k-e	55	1409
8080	8095	530257	GCAGATTTACCTTCCT	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	39	1409
8080	8095	530307	GCAGATTTACCTTCCT	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	77	1409
9123	9138	530413	GCCCCTATGTATAAGC	k-d(10)-k-e-k-e-e	73	1410
9124	9140	530043	CTGCCCCTATGTATAAG	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	42	1411
9124	9139	530363	TGCCCCTATGTATAAG	e-k-d(10)-k-e-k-e	25	1412
9125	9140	530111	CTGCCCCTATGTATAA	e-k-k-d(10)-k-k-e	35	1413
9125	9140	530158	CTGCCCCTATGTATAA	e-e-k-d(10)-k-k-e	36	1413
9125	9140	530208	CTGCCCCTATGTATAA	e-d-k-d(10)-k-k-e	14	1413
9125	9140	530258	CTGCCCCTATGTATAA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	5	1413
9125	9140	530308	CTGCCCCTATGTATAA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	25	1413
9862	9877	530414	TTCTTCCTGAGACACA	k-d(10)-k-e-k-e-e	61	1414
9863	9879	530044	GCTTCTTCCTGAGACAC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	78	1415

9863	9878	530364	CTTCTTCCTGAGACAC	e-k-d(10)-k-e-k-e	59	1416
9864	9879	530112	GCTTCTTCCTGAGACA	e-k-k-d(10)-k-k-e	84	1417
9864	9879	530159	GCTTCTTCCTGAGACA	e-e-k-d(10)-k-k-e	69	1417
9864	9879	530209	GCTTCTTCCTGAGACA	e-d-k-d(10)-k-k-e	54	1417
9864	9879	530259	GCTTCTTCCTGAGACA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	57	1417
9864	9879	530309	GCTTCTTCCTGAGACA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	46	1417
9864	9879	530415	GCTTCTTCCTGAGACA	k-d(10)-k-e-k-e-e	51	1417
9865	9881	530045	TGGCTTCTTCCTGAGAC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	73	1418
9865	9880	530365	GGCTTCTTCCTGAGAC	e-k-d(10)-k-e-k-e	78	1419
9866	9881	530113	TGGCTTCTTCCTGAGA	e-k-k-d(10)-k-k-e	60	1420
9866	9881	530160	TGGCTTCTTCCTGAGA	e-e-k-d(10)-k-k-e	54	1420
9866	9881	530210	TGGCTTCTTCCTGAGA	e-d-k-d(10)-k-k-e	28	1420
9866	9881	530260	TGGCTTCTTCCTGAGA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	0	1420
9866	9881	530310	TGGCTTCTTCCTGAGA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	26	1420
9873	9888	530416	CTCCTGTTGGCTTCTT	k-d(10)-k-e-k-e-e	57	1421
9874	9890	530046	TCCTCCTGTTGGCTTCT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	76	1422
9874	9889	530366	CCTCCTGTTGGCTTCT	e-k-d(10)-k-e-k-e	75	1423
9874	9889	530417	CCTCCTGTTGGCTTCT	k-d(10)-k-e-k-e-e	66	1423
9875	9891	530047	TTCCTCCTGTTGGCTTC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	75	1424
9875	9890	530114	TCCTCCTGTTGGCTTC	e-k-k-d(10)-k-k-e	80	1425
9875	9890	530161	TCCTCCTGTTGGCTTC	e-e-k-d(10)-k-k-e	81	1425
9875	9890	530211	TCCTCCTGTTGGCTTC	e-d-k-d(10)-k-k-e	73	1425
9875	9890	530261	TCCTCCTGTTGGCTTC	e-d-k-d(9)-k-k-e	78	1425

9875	9890	530311	TCCTCCTGTTGGCTTC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	82	1425
9875	9890	530367	TCCTCCTGTTGGCTTC	e-k-d(10)-k-e-k-e	80	1425
9876	9891	530115	TTCCTCCTGTTGGCTT	e-k-k-d(10)-k-k-e	74	1426
9876	9891	530162	TTCCTCCTGTTGGCTT	e-e-k-d(10)-k-k-e	68	1426
9876	9891	530212	TTCCTCCTGTTGGCTT	e-d-k-d(10)-k-k-e	58	1426
9876	9891	530262	TTCCTCCTGTTGGCTT	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	23	1426
9876	9891	530312	TTCCTCCTGTTGGCTT	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	52	1426
9876	9891	530418	TTCCTCCTGTTGGCTT	k-d(10)-k-e-k-e-e	59	1426
9877	9893	530048	GGTTCCTCCTGTTGGCT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	82	1427
9877	9892	530368	GTTCCTCCTGTTGGCT	e-k-d(10)-k-e-k-e	85	1428
9878	9893	530116	GGTTCCTCCTGTTGGC	e-k-k-d(10)-k-k-e	90	1429
9878	9893	530163	GGTTCCTCCTGTTGGC	e-e-k-d(10)-k-k-e	79	1429
9878	9893	530213	GGTTCCTCCTGTTGGC	e-d-k-d(10)-k-k-e	72	1429
9878	9893	530263	GGTTCCTCCTGTTGGC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	73	1429
9878	9893	530313	GGTTCCTCCTGTTGGC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	61	1429
9964	9979	529041	GTAATGTGCAGCAATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	53	1430
9991	10006	530711	ATGTGAGGGCACATTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	1431
10286	10301	529042	CCAAGCCGTTTATTTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	44	1432
10291	10306	529043	GGAAGCCAAGCCGTTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1433
11261	11276	530413	GCCCCTATGTATAAGC	k-d(10)-k-e-k-e-e	73	1410
11262	11278	530043	CTGCCCCTATGTATAAG	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	42	1411
11262	11277	530363	TGCCCCTATGTATAAG	e-k-d(10)-k-e-k-e	25	1412
11263	11278	530111	CTGCCCCTATGTATAA	e-k-k-d(10)-k-k-e	35	1413

11263	11278	530158	CTGCCCCTATGTATAA	e-e-k-d(10)-k-k-e	36	1413
11263	11278	530208	CTGCCCCTATGTATAA	e-d-k-d(10)-k-k-e	14	1413
11263	11278	530258	CTGCCCCTATGTATAA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	5	1413
11263	11278	530308	CTGCCCCTATGTATAA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	25	1413
12345	12360	530414	TTCTTCCTGAGACACA	k-d(10)-k-e-k-e-e	61	1414
12346	12362	530044	GCTTCTTCCTGAGACAC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	78	1415
12346	12361	530364	CTTCTTCCTGAGACAC	e-k-d(10)-k-e-k-e	59	1416
12347	12362	530112	GCTTCTTCCTGAGACA	e-k-k-d(10)-k-k-e	84	1417
12347	12362	530159	GCTTCTTCCTGAGACA	e-e-k-d(10)-k-k-e	69	1417
12347	12362	530209	GCTTCTTCCTGAGACA	e-d-k-d(10)-k-k-e	54	1417
12347	12362	530259	GCTTCTTCCTGAGACA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	57	1417
12347	12362	530309	GCTTCTTCCTGAGACA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	46	1417
12347	12362	530415	GCTTCTTCCTGAGACA	k-d(10)-k-e-k-e-e	51	1417
12348	12364	530045	TGGCTTCTTCCTGAGAC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	73	1418
12348	12363	530365	GGCTTCTTCCTGAGAC	e-k-d(10)-k-e-k-e	78	1419
12349	12364	530113	TGGCTTCTTCCTGAGA	e-k-k-d(10)-k-k-e	60	1420
12349	12364	530160	TGGCTTCTTCCTGAGA	e-e-k-d(10)-k-k-e	54	1420
12349	12364	530210	TGGCTTCTTCCTGAGA	e-d-k-d(10)-k-k-e	28	1420
12349	12364	530260	TGGCTTCTTCCTGAGA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	0	1420
12349	12364	530310	TGGCTTCTTCCTGAGA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	26	1420
12356	12371	530416	CTCCTGTTGGCTTCTT	k-d(10)-k-e-k-e-e	57	1421
12357	12373	530046	TCCTCCTGTTGGCTTCT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	76	1422
12357	12372	530366	CCTCCTGTTGGCTTCT	e-k-d(10)-k-e-k-e	75	1423

12357	12372	530417	CCTCCTGTTGGCTTCT	k-d(10)-k-e-k-e-e	66	1423
12358	12374	530047	TTCCTCCTGTTGGCTTC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	75	1424
12358	12373	530114	TCCTCCTGTTGGCTTC	e-k-k-d(10)-k-k-e	80	1425
12358	12373	530161	TCCTCCTGTTGGCTTC	e-e-k-d(10)-k-k-e	81	1425
12358	12373	530211	TCCTCCTGTTGGCTTC	e-d-k-d(10)-k-k-e	73	1425
12358	12373	530261	TCCTCCTGTTGGCTTC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	78	1425
12358	12373	530311	TCCTCCTGTTGGCTTC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	82	1425
12358	12373	530367	TCCTCCTGTTGGCTTC	e-k-d(10)-k-e-k-e	80	1425
12359	12374	530115	TTCCTCCTGTTGGCTT	e-k-k-d(10)-k-k-e	74	1426
12359	12374	530162	TTCCTCCTGTTGGCTT	e-e-k-d(10)-k-k-e	68	1426
12359	12374	530212	TTCCTCCTGTTGGCTT	e-d-k-d(10)-k-k-e	58	1426
12359	12374	530262	TTCCTCCTGTTGGCTT	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	23	1426
12359	12374	530312	TTCCTCCTGTTGGCTT	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	52	1426
12359	12374	530418	TTCCTCCTGTTGGCTT	k-d(10)-k-e-k-e-e	59	1426
12360	12376	530048	GGTTCCTCCTGTTGGCT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	82	1427
12360	12375	530368	GTTCCTCCTGTTGGCT	e-k-d(10)-k-e-k-e	85	1428
12361	12376	530116	GGTTCCTCCTGTTGGC	e-k-k-d(10)-k-k-e	90	1429
12361	12376	530163	GGTTCCTCCTGTTGGC	e-e-k-d(10)-k-k-e	79	1429
12361	12376	530213	GGTTCCTCCTGTTGGC	e-d-k-d(10)-k-k-e	72	1429
12361	12376	530263	GGTTCCTCCTGTTGGC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	73	1429
12361	12376	530313	GGTTCCTCCTGTTGGC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	61	1429
12586	12601	530710	TACAATTCCTGCCTGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	1434
15467	15482	530437	AGCTTTTCTATGAAAA	k-d(10)-k-e-k-e-e	5	1435

15468	15484	530067	CAAGCTTTTCTATGAAA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	53	1436
15468	15483	530387	AAGCTTTTCTATGAAA	e-k-d(10)-k-e-k-e	24	1437
15469	15484	530132	CAAGCTTTTCTATGAA	e-k-k-d(10)-k-k-e	74	423
15469	15484	530182	CAAGCTTTTCTATGAA	e-e-k-d(10)-k-k-e	48	423
15469	15484	530232	CAAGCTTTTCTATGAA	e-d-k-d(10)-k-k-e	21	423
15469	15484	530282	CAAGCTTTTCTATGAA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	19	423
15469	15484	530332	CAAGCTTTTCTATGAA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	20	423
16863	16878	530419	TAATTGTGTACTGGCA	k-d(10)-k-e-k-e-e	75	1438
16864	16880	530049	TATAATTGTGTACTGGC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	88	1439
16864	16879	530369	ATAATTGTGTACTGGC	e-k-d(10)-k-e-k-e	92	1440
16865	16880	530117	TATAATTGTGTACTGG	e-k-k-d(10)-k-k-e	73	1441
16865	16880	530164	TATAATTGTGTACTGG	e-e-k-d(10)-k-k-e	65	1441
16865	16880	530214	TATAATTGTGTACTGG	e-d-k-d(10)-k-k-e	37	1441
16865	16880	530264	TATAATTGTGTACTGG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	48	1441
16865	16880	530314	TATAATTGTGTACTGG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	42	1441
17385	17400	530709	TGGAGTAACAGGAACT	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	1442
21456	21471	530720	AAAGTTTCCCAATAGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	17	1443
22061	22076	529044	AGTCCTACCACGGCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	1444
24514	24529	529045	TGACGATGCTTGGATA	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	1445
24515	24530	529046	CTGACGATGCTTGGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	8	1446
24579	24594	529047	TCACTTTCCCTATACG	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	1447
25105	25120	530717	GTAGGTTGAGCAAGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	77	1448
26061	26076	530420	ACTTTAGCCCCTTCCA	k-d(10)-k-e-k-e-e	44	1449

26062	26078	530050	CAACTTTAGCCCCTTCC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	64	1450
26062	26077	530370	AACTTTAGCCCCTTCC	e-k-d(10)-k-e-k-e	55	1451
26063	26078	530118	CAACTTTAGCCCCTTC	e-k-k-d(10)-k-k-e	58	1452
26063	26078	530165	CAACTTTAGCCCCTTC	e-e-k-d(10)-k-k-e	38	1452
26063	26078	530215	CAACTTTAGCCCCTTC	e-d-k-d(10)-k-k-e	29	1452
26063	26078	530265	CAACTTTAGCCCCTTC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	3	1452
26063	26078	530315	CAACTTTAGCCCCTTC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	30	1452
26767	26782	529048	AATTCATCGAGCTAAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1453
37758	37773	529049	TGCCCCAATTAGGCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	1454
37759	37774	529050	TTGCCCCAATTAGGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	1455
41484	41499	530714	CCCTGTGGCTCCTTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	1456
41760	41775	529051	TACTGTCCTCGAGACA	e-e-e-d(10)-k-k-k	2	1457
42754	42769	530719	AGGAAAAGGAAGAATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	2	1458
42766	42781	529052	CGCATATGCCCTAGGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	7	1459
42768	42783	529053	GCCGCATATGCCCTAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	1460
42769	42784	529054	GGCCGCATATGCCCTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	51	1461
43072	43087	529055	CGGGTAAGTATACAGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	1462
43074	43089	529056	CACGGGTAAGTATACA	e-e-e-d(10)-k-k-k	4	1463
43075	43090	529057	TCACGGGTAAGTATAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	5	1464
43077	43092	529058	GCTCACGGGTAAGTAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	1465
45633	45648	529059	GTATACAATGGCCTTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	59	1466
46633	46648	529060	CGACCCAATCAGATGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	34	1467
47430	47445	530708	GGATAAAATACAAAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	1468

47617	47632	529061	GTTCCGAAAAAAACCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	59	1469
47619	47634	529062	GGGTTCCGAAAAAACC	e-e-e-d(10)-k-k-k	16	1470
47752	47767	530712	TGCAAACTTTTTCTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	1471
48092	48107	529063	ACCCGCTATCCACTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	1472
48402	48417	530421	CACTTTCCATTCTAGT	k-d(10)-k-e-k-e-e	20	1473
48403	48419	530051	CACACTTTCCATTCTAG	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	48	1474
48403	48418	530371	ACACTTTCCATTCTAG	e-k-d(10)-k-e-k-e	36	1475
48404	48419	530119	CACACTTTCCATTCTA	e-k-k-d(10)-k-k-e	47	1476
48404	48419	530166	CACACTTTCCATTCTA	e-e-k-d(10)-k-k-e	53	1476
48404	48419	530216	CACACTTTCCATTCTA	e-d-k-d(10)-k-k-e	34	1476
48404	48419	530266	CACACTTTCCATTCTA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	31	1476
48404	48419	530316	CACACTTTCCATTCTA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	34	1476
48429	48444	529064	AGCCCCTATGGTTACC	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	1477
48567	48582	529065	GTCTAGAGGCCTATCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	1478
48568	48583	529066	GGTCTAGAGGCCTATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	17	1479
49762	49777	530718	AGATGTTGGATGTCTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	46	1480
50692	50707	530423	AGATTCTCTACCACTT	k-d(10)-k-e-k-e-e	70	1054
50693	50709	530053	GGAGATTCTCTACCACT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	84	1055
50693	50708	530373	GAGATTCTCTACCACT	e-k-d(10)-k-e-k-e	85	1056
50694	50709	530121	GGAGATTCTCTACCAC	e-k-k-d(10)-k-k-e	77	53
50694	50709	530168	GGAGATTCTCTACCAC	e-e-k-d(10)-k-k-e	75	53
50694	50709	530218	GGAGATTCTCTACCAC	e-d-k-d(10)-k-k-e	61	53
50694	50709	530268	GGAGATTCTCTACCAC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	76	53

50694	50709	530318	GGAGATTCTCTACCAC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	73	53
50838	50853	529067	CCGCCTTAAGATCTAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	5	1481
51714	51729	529068	CCCTTACTCTCCGCAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	1482
51734	51749	529069	GGGAAGTGGTCCGACC	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1483
51757	51772	529070	CCGCAAGTGAGCGAGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	6	1484
51760	51775	529071	ATCCCGCAAGTGAGCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	11	1485
51763	51778	529072	GAAATCCCGCAAGTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1486
51905	51920	528400	CCGCCAGCTCACTCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	57	66
51906	51921	528401	CCCGCCAGCTCACTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	57	1059
51907	51922	528402	CCCCGCCAGCTCACTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	1060
51910	51925	528403	AAGCCCCGCCAGCTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	72	1060
51911	51926	528404	AAAGCCCCGCCAGCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	52	1062
51912	51927	528405	AAAAGCCCCGCCAGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	1063
51913	51928	528406	CAAAAGCCCCGCCAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	29	1064
51914	51929	528407	ACAAAAGCCCCGCCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	1065
51916	51931	528408	TGACAAAAGCCCCGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	1066
51917	51932	528409	CTGACAAAAGCCCCGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	1067
51918	51933	528410	GCTGACAAAAGCCCCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1068
51919	51934	528411	CGCTGACAAAAGCCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	49	1069
51920	51935	528412	TCGCTGACAAAAGCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1070
51921	51936	528413	ATCGCTGACAAAAGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	1071
51922	51937	528414	CATCGCTGACAAAAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	1072
51924	51939	528415	TCCATCGCTGACAAAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	11	1073

51925	51940	528416	CTCCATCGCTGACAAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	1074
51926	51941	528417	ACTCCATCGCTGACAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1075
51927	51942	528418	TACTCCATCGCTGACA	e-e-e-d(10)-k-k-k	19	1076
51928	51943	528419	GTACTCCATCGCTGAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	1077
51929	51944	528420	CGTACTCCATCGCTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	35	1078
51943	51958	528421	GAGAGTTTTCTGCACG	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	1079
51945	51960	528422	GTGAGAGTTTTCTGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1080
51964	51979	528423	GTCAGCCAGCTCCTCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	49	1081
51975	51990	528424	CGCCTCTTCCAGTCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	1082
51977	51992	528425	GCCGCCTCTTCCAGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	44	1083
51978	51993	528426	TGCCGCCTCTTCCAGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	1084
51983	51998	528427	TCTGTTGCCGCCTCTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	1085
51984	51999	528428	ATCTGTTGCCGCCTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	1086
51985	52000	528429	AATCTGTTGCCGCCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	23	1087
51986	52001	528430	CAATCTGTTGCCGCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	1088
51987	52002	528431	GCAATCTGTTGCCGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	48	1089
51988	52003	528432	GGCAATCTGTTGCCGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	1090
51989	52004	528433	AGGCAATCTGTTGCCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1091
51990	52005	528434	CAGGCAATCTGTTGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	8	1092
51991	52006	528435	GCAGGCAATCTGTTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	13	1093
51995	52010	528436	CAATGCAGGCAATCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	1094
51996	52011	528437	CCAATGCAGGCAATCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	26	1095
51997	52012	528438	TCCAATGCAGGCAATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	1096

51998	52013	528439	CTCCAATGCAGGCAAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	2	1097
51999	52014	528440	CCTCCAATGCAGGCAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	1098
52016	52031	528441	GGCAGATGTTGGGCGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	8	1099
52017	52032	528442	AGGCAGATGTTGGGCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1100
52018	52033	528443	TAGGCAGATGTTGGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	1	1101
52019	52034	528444	CTAGGCAGATGTTGGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1102
52020	52035	528445	TCTAGGCAGATGTTGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	7	1103
52021	52036	528446	ATCTAGGCAGATGTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	3	1104
52023	52038	528447	CGATCTAGGCAGATGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	72
52024	52039	528448	CCGATCTAGGCAGATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	13	1105
52026	52041	528449	AGCCGATCTAGGCAGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	4	1106
52027	52042	528450	TAGCCGATCTAGGCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	11	1107
52028	52043	528451	CTAGCCGATCTAGGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	5	1108
52029	52044	528452	TCTAGCCGATCTAGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	5	1109
52030	52045	528453	TTCTAGCCGATCTAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	24	1110
52031	52046	528454	TTTCTAGCCGATCTAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	29	1111
52032	52047	528455	TTTTCTAGCCGATCTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	1112
52033	52048	528456	GTTTTCTAGCCGATCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	1113
52035	52050	528457	CAGTTTTCTAGCCGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	50	1114
52036	52051	528458	CCAGTTTTCTAGCCGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	70	1115
52083	52098	529073	TCAATCTAGCTTTCGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	33	1487
52084	52099	529074	TTCAATCTAGCTTTCG	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	1488
52119	52134	529075	GTACCAATTCTGTGGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	33	1489

55441	55456	528462	GATTCTGCTAATGACG	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	1119
55442	55457	528463	AGATTCTGCTAATGAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	1120
55446	55461	528464	GTTGAGATTCTGCTAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	1121
55447	55462	528465	AGTTGAGATTCTGCTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	48	1122
55454	55469	528466	GGTCTGAAGTTGAGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	1123
55456	55471	528467	CGGGTCTGAAGTTGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	44	1124
55457	55472	528468	ACGGGTCTGAAGTTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	1125
55458	55473	528469	GACGGGTCTGAAGTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	1126
55459	55474	528470	TGACGGGTCTGAAGTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	34	1127
55460	55475	528471	TTGACGGGTCTGAAGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	19	1128
55461	55476	528472	GTTGACGGGTCTGAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	1129
55462	55477	528473	TGTTGACGGGTCTGAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	1130
55463	55478	528474	TTGTTGACGGGTCTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	55	1131
55464	55479	528475	TTTGTTGACGGGTCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	63	1132
55465	55480	528476	ATTTGTTGACGGGTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	65	1133
56208	56223	529076	GTAACACCTCACCCTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	1490
58396	58411	530715	TCTGCCACCCAGGTTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	1491
59836	59851	529077	TAAATTTCCGGGATCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	13	1492
64187	64202	529078	CCGGTCCCTTGTAAAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	1493
64289	64304	529079	GCCAACTCTAGGCGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	16	1494
64551	64566	529080	CGCAAGAGATCCCGGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1495
64552	64567	529081	TCGCAAGAGATCCCGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	16	1496
64959	64974	529082	TGATCACCTCGACTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	1497

66136	66151	530425	GCCCTTGCCAGCCATG	k-d(10)-k-e-k-e-e	73	1134
66137	66153	530054	AAGCCCTTGCCAGCCAT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	75	1135
66137	66152	530375	AGCCCTTGCCAGCCAT	e-k-d(10)-k-e-k-e	77	1136
66138	66153	530123	AAGCCCTTGCCAGCCA	e-k-k-d(10)-k-k-e	86	144
66138	66153	530170	AAGCCCTTGCCAGCCA	e-e-k-d(10)-k-k-e	87	144
66138	66153	530220	AAGCCCTTGCCAGCCA	e-d-k-d(10)-k-k-e	74	144
66138	66153	530270	AAGCCCTTGCCAGCCA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	87	144
66138	66153	530320	AAGCCCTTGCCAGCCA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	83	144
66183	66198	530426	TTTTTCACAAGGTCAA	k-d(10)-k-e-k-e-e	55	1137
66184	66200	530059	ACTTTTTCACAAGGTCA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	73	1138
66184	66199	530376	CTTTTTCACAAGGTCA	e-k-d(10)-k-e-k-e	77	1139
66185	66200	530124	ACTTTTTCACAAGGTC	e-k-k-d(10)-k-k-e	79	153
66185	66200	530171	ACTTTTTCACAAGGTC	e-e-k-d(10)-k-k-e	69	153
66185	66200	530221	ACTTTTTCACAAGGTC	e-d-k-d(10)-k-k-e	64	153
66185	66200	530271	ACTTTTTCACAAGGTC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	73	153
66185	66200	530321	ACTTTTTCACAAGGTC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	56	153
66875	66890	529083	GCCACCCTAGTGTTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	1498
67066	67081	530427	ATGATCTTATAGCCCA	k-d(10)-k-e-k-e-e	43	931
67067	67083	530060	CCATGATCTTATAGCCC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	77	1140
67067	67082	530377	CATGATCTTATAGCCC	e-k-d(10)-k-e-k-e	66	932
67068	67083	530125	CCATGATCTTATAGCC	e-k-k-d(10)-k-k-e	65	175
67068	67083	530172	CCATGATCTTATAGCC	e-e-k-d(10)-k-k-e	59	175
67068	67083	530222	CCATGATCTTATAGCC	e-d-k-d(10)-k-k-e	48	175

67068	67083	530272	CCATGATCTTATAGCC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	63	175
67068	67083	530322	CCATGATCTTATAGCC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	45	175
67270	67285	530716	TTTGCCTATCTATCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	11	1499
67346	67361	529084	CGGTCACCCCAACAAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	33	1500
69470	69485	529085	AAGGGCGATGGTAATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	4	1501
71614	71629	530422	GTACAATTGCTTCAAC	k-d(10)-k-e-k-e-e	46	1502
71615	71631	530052	CAGTACAATTGCTTCAA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	51	1503
71615	71630	530372	AGTACAATTGCTTCAA	e-k-d(10)-k-e-k-e	51	1504
71616	71631	530120	CAGTACAATTGCTTCA	e-k-k-d(10)-k-k-e	78	1505
71616	71631	530167	CAGTACAATTGCTTCA	e-e-k-d(10)-k-k-e	69	1505
71616	71631	530217	CAGTACAATTGCTTCA	e-d-k-d(10)-k-k-e	47	1505
71616	71631	530267	CAGTACAATTGCTTCA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	64	1505
71616	71631	530317	CAGTACAATTGCTTCA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	60	1505
72138	72153	530713	CTCATGCCAAGATTGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	26	1506
72299	72314	529086	AAGCCACTTACGGTGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1507
72874	72889	529087	CGTCTATTTCCAGTGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1508
73648	73663	529088	ACTAGTTCAGTTGTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1509
73866	73881	530428	TAGCAGAAGTAGGAGA	k-d(10)-k-e-k-e-e	49	1141
73867	73883	530061	GATAGCAGAAGTAGGAG	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	49	1142
73867	73882	530378	ATAGCAGAAGTAGGAG	e-k-d(10)-k-e-k-e	48	1143
73868	73883	530126	GATAGCAGAAGTAGGA	e-k-k-d(10)-k-k-e	70	223
73868	73883	530173	GATAGCAGAAGTAGGA	e-e-k-d(10)-k-k-e	62	223
73868	73883	530223	GATAGCAGAAGTAGGA	e-d-k-d(10)-k-k-e	44	223

73868	73883	530273	GATAGCAGAAGTAGGA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	63	223
73868	73883	530323	GATAGCAGAAGTAGGA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	37	223
74199	74214	530513	TTGGATGTCAGCAAGG	k-d(10)-k-e-k-e-e	88	1047
74200	74215	530507	TTTGGATGTCAGCAAG	e-k-d(10)-k-e-k-e	86	1144
74200	74215	530514	TTTGGATGTCAGCAAG	k-d(10)-k-e-k-e-e	80	1144
74201	74216	530430	ATTTGGATGTCAGCAA	k-d(10)-k-e-k-e-e	87	1145
74201	74216	530468	ATTTGGATGTCAGCAA	e-k-k-d(10)-k-k-e	81	1145
74201	74216	530476	ATTTGGATGTCAGCAA	e-e-k-d(10)-k-k-e	82	1145
74201	74216	530484	ATTTGGATGTCAGCAA	e-d-k-d(10)-k-k-e	74	1145
74201	74216	530492	ATTTGGATGTCAGCAA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	83	1145
74201	74216	530500	ATTTGGATGTCAGCAA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	56	1145
74201	74216	530508	ATTTGGATGTCAGCAA	e-k-d(10)-k-e-k-e	83	1145
74202	74218	530062	CTATTTGGATGTCAGCA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	94	1146
74202	74217	530380	TATTTGGATGTCAGCA	e-k-d(10)-k-e-k-e	94	1147
74202	74217	530469	TATTTGGATGTCAGCA	e-k-k-d(10)-k-k-e	91	1147
74202	74217	530477	TATTTGGATGTCAGCA	e-e-k-d(10)-k-k-e	87	1147
74202	74217	530485	TATTTGGATGTCAGCA	e-d-k-d(10)-k-k-e	87	1147
74202	74217	530493	TATTTGGATGTCAGCA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	81	1147
74202	74217	530501	TATTTGGATGTCAGCA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	74	1147
74202	74217	530515	TATTTGGATGTCAGCA	k-d(10)-k-e-k-e-e	87	1147
74203	74218	481464	CTATTTGGATGTCAGC	k-k-k-d(10)-k-k-k	93	245
74203	74218	518349	CTATTTGGATGTCAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	58	245
74203	74218	519637	CTATTTGGATGTCAGC	e-k-k-d(10)-k-k-e	96	245

74203	74218	530175	CTATTTGGATGTCAGC	e-e-k-d(10)-k-k-e	93	245
74203	74218	530225	CTATTTGGATGTCAGC	e-d-k-d(10)-k-k-e	85	245
74203	74218	530275	CTATTTGGATGTCAGC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	91	245
74203	74218	530325	CTATTTGGATGTCAGC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	91	245
74204	74219	530470	TCTATTTGGATGTCAG	e-k-k-d(10)-k-k-e	91	1148
74204	74219	530478	TCTATTTGGATGTCAG	e-e-k-d(10)-k-k-e	87	1148
74204	74219	530486	TCTATTTGGATGTCAG	e-d-k-d(10)-k-k-e	84	1148
74204	74219	530494	TCTATTTGGATGTCAG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	60	1148
74204	74219	530502	TCTATTTGGATGTCAG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	64	1148
74204	74219	530509	TCTATTTGGATGTCAG	e-k-d(10)-k-e-k-e	80	1148
74205	74220	530471	TTCTATTTGGATGTCA	e-k-k-d(10)-k-k-e	83	1149
74205	74220	530479	TTCTATTTGGATGTCA	e-e-k-d(10)-k-k-e	74	1149
74205	74220	530487	TTCTATTTGGATGTCA	e-d-k-d(10)-k-k-e	71	1149
74205	74220	530495	TTCTATTTGGATGTCA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	68	1149
74205	74220	530503	TTCTATTTGGATGTCA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	53	1149
74646	74661	530431	CACCAAGGAGGCTGTT	k-d(10)-k-e-k-e-e	44	1150
74647	74663	530055	AGCACCAAGGAGGCTGT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	45	1151
74647	74662	530381	GCACCAAGGAGGCTGT	e-k-d(10)-k-e-k-e	74	1152
74648	74663	530128	AGCACCAAGGAGGCTG	e-k-k-d(10)-k-k-e	52	257
74648	74663	530176	AGCACCAAGGAGGCTG	e-e-k-d(10)-k-k-e	66	257
74648	74663	530226	AGCACCAAGGAGGCTG	e-d-k-d(10)-k-k-e	51	257
74648	74663	530276	AGCACCAAGGAGGCTG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	70	257
74648	74663	530326	AGCACCAAGGAGGCTG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	52	257

74714	74729	528860	GGTTTGACCTGAAGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	58	1153
74715	74730	528861	GGGTTTGACCTGAAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	1154
74716	74731	528862	AGGGTTTGACCTGAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	57	1155
74717	74732	528863	AAGGGTTTGACCTGAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	43	1156
74718	74733	528864	TAAGGGTTTGACCTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	50	1157
74719	74734	528865	TTAAGGGTTTGACCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	1158
74734	74749	528866	GCAGCTTCAGATGTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	60	1159
74735	74750	528867	TGCAGCTTCAGATGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	47	1160
74770	74785	530388	CTTAAACCTTCCTATT	k-d(10)-k-e-k-e-e	14	1161
74771	74786	530338	CCTTAAACCTTCCTAT	e-k-d(10)-k-e-k-e	47	1162
74772	74787	530086	TCCTTAAACCTTCCTA	e-k-k-d(10)-k-k-e	58	273
74772	74787	530133	TCCTTAAACCTTCCTA	e-e-k-d(10)-k-k-e	53	273
74772	74787	530183	TCCTTAAACCTTCCTA	e-d-k-d(10)-k-k-e	52	273
74772	74787	530233	TCCTTAAACCTTCCTA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	29	273
74772	74787	530283	TCCTTAAACCTTCCTA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	32	273
74777	74792	528868	GATTCTCCTTAAACCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	1163
74778	74793	530389	AGATTCTCCTTAAACC	k-d(10)-k-e-k-e-e	44	1164
74779	74794	530339	TAGATTCTCCTTAAAC	e-k-d(10)-k-e-k-e	41	1165
74780	74795	530087	TTAGATTCTCCTTAAA	e-k-k-d(10)-k-k-e	43	1166
74780	74795	530134	TTAGATTCTCCTTAAA	e-e-k-d(10)-k-k-e	28	1166
74780	74795	530184	TTAGATTCTCCTTAAA	e-d-k-d(10)-k-k-e	13	1166
74780	74795	530234	TTAGATTCTCCTTAAA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	15	1166
74780	74795	530284	TTAGATTCTCCTTAAA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	14	1166

74782	74797	530390	GCTTAGATTCTCCTTA	k-d(10)-k-e-k-e-e	83	1167
74783	74798	530340	TGCTTAGATTCTCCTT	e-k-d(10)-k-e-k-e	89	1168
74784	74799	528869	ATGCTTAGATTCTCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	83	1169
74784	74799	530088	ATGCTTAGATTCTCCT	e-k-k-d(10)-k-k-e	90	1169
74784	74799	530135	ATGCTTAGATTCTCCT	e-e-k-d(10)-k-k-e	91	1169
74784	74799	530185	ATGCTTAGATTCTCCT	e-d-k-d(10)-k-k-e	85	1169
74784	74799	530235	ATGCTTAGATTCTCCT	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	28	1169
74784	74799	530285	ATGCTTAGATTCTCCT	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	86	1169
74784	74799	530391	ATGCTTAGATTCTCCT	k-d(10)-k-e-k-e-e	79	1169
74785	74801	530021	AAATGCTTAGATTCTCC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	87	1170
74785	74800	530341	AATGCTTAGATTCTCC	e-k-d(10)-k-e-k-e	88	1171
74786	74801	530089	AAATGCTTAGATTCTC	e-k-k-d(10)-k-k-e	71	1172
74786	74801	530136	AAATGCTTAGATTCTC	e-e-k-d(10)-k-k-e	66	1172
74786	74801	530186	AAATGCTTAGATTCTC	e-d-k-d(10)-k-k-e	51	1172
74786	74801	530236	AAATGCTTAGATTCTC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	74	1172
74786	74801	530286	AAATGCTTAGATTCTC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	56	1172
74869	74884	528870	GTAAGCACCCTCTGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	26	1173
74871	74886	528871	TTGTAAGCACCCTCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	1174
74873	74888	528872	GGTTGTAAGCACCCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	47	1175
74874	74889	528873	AGGTTGTAAGCACCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	1176
74875	74890	528874	AAGGTTGTAAGCACCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	54	1177
74877	74892	528875	TCAAGGTTGTAAGCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	1178
74878	74893	528876	GTCAAGGTTGTAAGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	1179

74879	74894	528877	AGTCAAGGTTGTAAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	1180
74881	74896	528878	GGAGTCAAGGTTGTAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	6	1181
74882	74897	528879	GGGAGTCAAGGTTGTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1182
74901	74916	530392	GATCAAGTCCAGGGAG	k-d(10)-k-e-k-e-e	47	1183
74902	74918	530022	CAGATCAAGTCCAGGGA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	80	1184
74902	74917	530342	AGATCAAGTCCAGGGA	e-k-d(10)-k-e-k-e	70	1185
74902	74917	530393	AGATCAAGTCCAGGGA	k-d(10)-k-e-k-e-e	46	1185
74903	74919	530023	GCAGATCAAGTCCAGGG	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	74	1186
74903	74918	530090	CAGATCAAGTCCAGGG	e-k-k-d(10)-k-k-e	78	1187
74903	74918	530137	CAGATCAAGTCCAGGG	e-e-k-d(10)-k-k-e	76	1187
74903	74918	530187	CAGATCAAGTCCAGGG	e-d-k-d(10)-k-k-e	68	1187
74903	74918	530237	CAGATCAAGTCCAGGG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	36	1187
74903	74918	530287	CAGATCAAGTCCAGGG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	56	1187
74903	74918	530343	CAGATCAAGTCCAGGG	e-k-d(10)-k-e-k-e	68	1187
74903	74918	530394	CAGATCAAGTCCAGGG	k-d(10)-k-e-k-e-e	49	1187
74904	74919	518343	GCAGATCAAGTCCAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	5	1188
74904	74920	530024	AGCAGATCAAGTCCAGG	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	79	1189
74904	74919	530091	GCAGATCAAGTCCAGG	e-k-k-d(10)-k-k-e	81	1188
74904	74919	530138	GCAGATCAAGTCCAGG	e-e-k-d(10)-k-k-e	81	1188
74904	74919	530188	GCAGATCAAGTCCAGG	e-d-k-d(10)-k-k-e	78	1188
74904	74919	530238	GCAGATCAAGTCCAGG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	29	1188
74904	74919	530288	GCAGATCAAGTCCAGG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	69	1188
74904	74919	530344	GCAGATCAAGTCCAGG	e-k-d(10)-k-e-k-e	85	1188

74905	74920	530092	AGCAGATCAAGTCCAG	e-k-k-d(10)-k-k-e	85	1190
74905	74920	530139	AGCAGATCAAGTCCAG	e-e-k-d(10)-k-k-e	79	1190
74905	74920	530189	AGCAGATCAAGTCCAG	e-d-k-d(10)-k-k-e	77	1190
74905	74920	530239	AGCAGATCAAGTCCAG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	61	1190
74905	74920	530289	AGCAGATCAAGTCCAG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	75	1190
74907	74922	528880	ACAGCAGATCAAGTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	65	1191
74908	74923	528881	AACAGCAGATCAAGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	44	1192
74924	74939	528882	ACAACCTAGCCTCTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1193
74925	74940	528883	AACAACCTAGCCTCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	46	1194
74927	74942	528884	GAAACAACCTAGCCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	1195
74928	74943	528885	AGAAACAACCTAGCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	1196
74929	74944	528886	CAGAAACAACCTAGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	1197
74942	74957	528887	GATAAGGCACCCACAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	1198
74943	74958	528888	TGATAAGGCACCCACA	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	1199
74944	74959	528889	CTGATAAGGCACCCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	1200
74946	74961	528890	CCCTGATAAGGCACCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	1201
74947	74962	528891	GCCCTGATAAGGCACC	e-e-e-d(10)-k-k-k	49	1202
74952	74967	528892	TCCCAGCCCTGATAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1203
74954	74969	528893	TATCCCAGCCCTGATA	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1204
74957	74972	528894	AAGTATCCCAGCCCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	1205
74958	74973	528895	GAAGTATCCCAGCCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1206
74959	74974	528896	AGAAGTATCCCAGCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1207
74960	74975	528897	CAGAAGTATCCCAGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	1208

75079	75094	528898	TGAGACCAGGATTCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	1209
75083	75098	528899	GTCCTGAGACCAGGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	19	1210
75164	75179	528900	AGCTCAACCAGACACG	e-e-e-d(10)-k-k-k	54	311
75166	75181	528901	TGAGCTCAACCAGACA	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	1211
75171	75186	528902	TTCCCTGAGCTCAACC	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	1212
75179	75194	528903	GAACCATATTCCCTGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	313
75182	75197	528904	TAAGAACCATATTCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	1213
75209	75224	518344	GCCACTGGATATCACC	e-e-e-d(10)-k-k-k	89	317
75254	75269	528905	TAAGCCTTTGCCCTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	64	1214
75255	75270	528906	GTAAGCCTTTGCCCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	53	1215
75256	75271	528907	AGTAAGCCTTTGCCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	1216
75257	75272	528908	CAGTAAGCCTTTGCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	1217
75259	75274	528909	ATCAGTAAGCCTTTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	53	1218
75260	75275	528910	TATCAGTAAGCCTTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	47	1219
75264	75279	528911	AGTTTATCAGTAAGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	58	1220
75270	75285	528912	GACTCAAGTTTATCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	37	1221
75272	75287	528913	CAGACTCAAGTTTATC	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1222
75273	75288	528914	GCAGACTCAAGTTTAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1223
75274	75289	528915	GGCAGACTCAAGTTTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	1	1224
75275	75290	528916	GGGCAGACTCAAGTTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1225
75276	75291	528917	AGGGCAGACTCAAGTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	9	1226
75278	75293	528918	CGAGGGCAGACTCAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	2	1227
75280	75295	528919	TACGAGGGCAGACTCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	324

75281	75296	528920	ATACGAGGGCAGACTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	14	1228
75282	75297	528921	CATACGAGGGCAGACT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1229
75283	75298	528922	TCATACGAGGGCAGAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	8	1230
75285	75300	528923	CCTCATACGAGGGCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	2	1231
75286	75301	528924	CCCTCATACGAGGGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	2	1232
75287	75302	528925	ACCCTCATACGAGGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1233
75412	75427	528926	TACGCACAGGAGAGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	1233
75413	75428	528927	ATACGCACAGGAGAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1234
75414	75429	528928	CATACGCACAGGAGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	6	1235
75415	75430	528929	CCATACGCACAGGAGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	4	1236
75416	75431	528930	CCCATACGCACAGGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	1237
75417	75432	528931	TCCCATACGCACAGGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1238
75418	75433	528932	TTCCCATACGCACAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	1239
75419	75434	528933	GTTCCCATACGCACAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	1240
75420	75435	528934	TGTTCCCATACGCACA	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	1241
75421	75436	528935	GTGTTCCCATACGCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	20	1242
75421	75436	530395	GTGTTCCCATACGCAC	k-d(10)-k-e-k-e-e	71	1242
75422	75437	528936	GGTGTTCCCATACGCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	71	1243
75422	75438	530025	AGGTGTTCCCATACGCA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	90	1244
75422	75437	530345	GGTGTTCCCATACGCA	e-k-d(10)-k-e-k-e	93	1243
75422	75437	530396	GGTGTTCCCATACGCA	k-d(10)-k-e-k-e-e	71	1243
75423	75438	528937	AGGTGTTCCCATACGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	73	1245
75423	75439	530026	TAGGTGTTCCCATACGC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	87	1246

75423	75438	530093	AGGTGTTCCCATACGC	e-k-k-d(10)-k-k-e	95	1245
75423	75438	530140	AGGTGTTCCCATACGC	e-e-k-d(10)-k-k-e	89	1245
75423	75438	530190	AGGTGTTCCCATACGC	e-d-k-d(10)-k-k-e	82	1245
75423	75438	530240	AGGTGTTCCCATACGC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	50	1245
75423	75438	530290	AGGTGTTCCCATACGC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	69	1245
75423	75438	530346	AGGTGTTCCCATACGC	e-k-d(10)-k-e-k-e	89	1245
75424	75439	528938	TAGGTGTTCCCATACG	e-e-e-d(10)-k-k-k	72	336
75424	75439	530094	TAGGTGTTCCCATACG	e-k-k-d(10)-k-k-e	88	336
75424	75439	530141	TAGGTGTTCCCATACG	e-e-k-d(10)-k-k-e	80	336
75424	75439	530191	TAGGTGTTCCCATACG	e-d-k-d(10)-k-k-e	74	336
75424	75439	530241	TAGGTGTTCCCATACG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	53	336
75424	75439	530291	TAGGTGTTCCCATACG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	68	336
75425	75440	528939	CTAGGTGTTCCCATAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1247
75426	75441	528940	GCTAGGTGTTCCCATA	e-e-e-d(10)-k-k-k	62	1248
75427	75442	528941	TGCTAGGTGTTCCCAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	49	1249
75429	75444	528942	CGTGCTAGGTGTTCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	77	1250
75491	75506	528943	CAAGGTGGTTTTGAGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	1251
75492	75507	528944	GCAAGGTGGTTTTGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	28	344
75507	75522	528945	CTCTGATCAGCTGAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	74	1252
75508	75523	528946	ACTCTGATCAGCTGAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	56	1253
75549	75564	528947	GAGACCAGCTAATTTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	1254
75582	75597	528948	CATCTTAGAGAAGGTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	59	1255
75622	75637	528949	TCAACTGTCTCCAGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	67	1256

75622	75637	530397	TCAACTGTCTCCAGGC	k-d(10)-k-e-k-e-e	60	1256
75623	75638	528950	ATCAACTGTCTCCAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	57	1257
75623	75639	530027	CATCAACTGTCTCCAGG	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	56	1258
75623	75638	530347	ATCAACTGTCTCCAGG	e-k-d(10)-k-e-k-e	49	1257
75624	75639	530095	CATCAACTGTCTCCAG	e-k-k-d(10)-k-k-e	40	354
75624	75639	530142	CATCAACTGTCTCCAG	e-e-k-d(10)-k-k-e	43	354
75624	75639	530192	CATCAACTGTCTCCAG	e-d-k-d(10)-k-k-e	42	354
75624	75639	530242	CATCAACTGTCTCCAG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	0	354
75624	75639	530292	CATCAACTGTCTCCAG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	36	354
75624	75639	530398	CATCAACTGTCTCCAG	k-d(10)-k-e-k-e-e	28	354
75625	75641	530028	CACATCAACTGTCTCCA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	57	1259
75625	75640	530348	ACATCAACTGTCTCCA	e-k-d(10)-k-e-k-e	58	1260
75626	75641	530096	CACATCAACTGTCTCC	e-k-k-d(10)-k-k-e	72	356
75626	75641	530143	CACATCAACTGTCTCC	e-e-k-d(10)-k-k-e	74	356
75626	75641	530193	CACATCAACTGTCTCC	e-d-k-d(10)-k-k-e	62	356
75626	75641	530243	CACATCAACTGTCTCC	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	34	356
75626	75641	530293	CACATCAACTGTCTCC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	59	356
75628	75643	528951	GACACATCAACTGTCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	16	1261
75662	75677	528952	GAAGAGTGTTGCTGGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	57	1262
75664	75679	528953	CTGAAGAGTGTTGCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	46	1263
75666	75681	528954	TACTGAAGAGTGTTGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	1264
75672	75687	530510	ATTATGTACTGAAGAG	k-d(10)-k-e-k-e-e	53	1265
75673	75688	530504	TATTATGTACTGAAGA	e-k-d(10)-k-e-k-e	25	1266

75673	75688	530511	TATTATGTACTGAAGA	k-d(10)-k-e-k-e-e	31	1266
75674	75689	530432	TTATTATGTACTGAAG	k-d(10)-k-e-k-e-e	15	1267
75674	75689	530463	TTATTATGTACTGAAG	e-k-k-d(10)-k-k-e	20	1267
75674	75689	530472	TTATTATGTACTGAAG	e-e-k-d(10)-k-k-e	17	1267
75674	75689	530480	TTATTATGTACTGAAG	e-d-k-d(10)-k-k-e	4	1267
75674	75689	530488	TTATTATGTACTGAAG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	13	1267
75674	75689	530496	TTATTATGTACTGAAG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	0	1267
75674	75689	530505	TTATTATGTACTGAAG	e-k-d(10)-k-e-k-e	37	1267
75675	75691	530063	GCTTATTATGTACTGAA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	74	1268
75675	75690	530382	CTTATTATGTACTGAA	e-k-d(10)-k-e-k-e	17	1269
75675	75690	530465	CTTATTATGTACTGAA	e-k-k-d(10)-k-k-e	63	1269
75675	75690	530473	CTTATTATGTACTGAA	e-e-k-d(10)-k-k-e	45	1269
75675	75690	530481	CTTATTATGTACTGAA	e-d-k-d(10)-k-k-e	14	1269
75675	75690	530489	CTTATTATGTACTGAA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	13	1269
75675	75690	530497	CTTATTATGTACTGAA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	7	1269
75675	75690	530512	CTTATTATGTACTGAA	k-d(10)-k-e-k-e-e	21	1269
75676	75691	519638	GCTTATTATGTACTGA	e-k-k-d(10)-k-k-e	86	362
75676	75691	530177	GCTTATTATGTACTGA	e-e-k-d(10)-k-k-e	71	362
75676	75691	530227	GCTTATTATGTACTGA	e-d-k-d(10)-k-k-e	51	362
75676	75691	530277	GCTTATTATGTACTGA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	70	362
75676	75691	530327	GCTTATTATGTACTGA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	61	362
75677	75692	530466	AGCTTATTATGTACTG	e-k-k-d(10)-k-k-e	82	1270
75677	75692	530474	AGCTTATTATGTACTG	e-e-k-d(10)-k-k-e	62	1270

75677	75692	530482	AGCTTATTATGTACTG	e-d-k-d(10)-k-k-e	53	1270
75677	75692	530490	AGCTTATTATGTACTG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	42	1270
75677	75692	530498	AGCTTATTATGTACTG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	45	1270
75677	75692	530506	AGCTTATTATGTACTG	e-k-d(10)-k-e-k-e	70	1270
75678	75693	530467	AAGCTTATTATGTACT	e-k-k-d(10)-k-k-e	50	1271
75678	75693	530475	AAGCTTATTATGTACT	e-e-k-d(10)-k-k-e	26	1271
75678	75693	530483	AAGCTTATTATGTACT	e-d-k-d(10)-k-k-e	19	1271
75678	75693	530491	AAGCTTATTATGTACT	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	13	1271
75678	75693	530499	AAGCTTATTATGTACT	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	15	1271
75679	75694	528955	TAAGCTTATTATGTAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1272
75686	75701	528956	TATCAGTTAAGCTTAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1273
75689	75704	528957	GTTTATCAGTTAAGCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	1274
75726	75741	530433	CAATGGTAAGCCCAAG	k-d(10)-k-e-k-e-e	62	1275
75727	75742	528958	CCAATGGTAAGCCCAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	66	1276
75727	75743	530056	CCCAATGGTAAGCCCAA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	73	1277
75727	75742	530383	CCAATGGTAAGCCCAA	e-k-d(10)-k-e-k-e	64	1276
75728	75743	518345	CCCAATGGTAAGCCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	80	366
75728	75743	519636	CCCAATGGTAAGCCCA	e-k-k-d(10)-k-k-e	90	366
75728	75743	530178	CCCAATGGTAAGCCCA	e-e-k-d(10)-k-k-e	86	366
75728	75743	530228	CCCAATGGTAAGCCCA	e-d-k-d(10)-k-k-e	77	366
75728	75743	530278	CCCAATGGTAAGCCCA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	86	366
75728	75743	530328	CCCAATGGTAAGCCCA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	80	366
75729	75744	528959	ACCCAATGGTAAGCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	73	1277

75731	75746	528960	AAACCCAATGGTAAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	43	1278
75732	75747	528961	TAAACCCAATGGTAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	1279
75733	75748	528962	TTAAACCCAATGGTAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	13	1280
75734	75749	528963	TTTAAACCCAATGGTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	2	1281
75741	75756	528964	CCTATGATTTAAACCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	17	1282
75745	75760	528965	GGTCCCTATGATTTAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	31	1283
75746	75761	528966	AGGTCCCTATGATTTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1284
75802	75817	528967	CCTAAGGCCATGAACT	e-e-e-d(10)-k-k-k	19	374
75803	75818	528968	ACCTAAGGCCATGAAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	1285
75804	75819	528969	TACCTAAGGCCATGAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	1286
75805	75820	528970	CTACCTAAGGCCATGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	55	1287
75806	75821	528971	GCTACCTAAGGCCATG	e-e-e-d(10)-k-k-k	66	1288
75807	75822	528972	TGCTACCTAAGGCCAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	56	1289
75808	75823	528973	ATGCTACCTAAGGCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	71	1290
75809	75824	528974	CATGCTACCTAAGGCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	58	1291
75810	75825	528975	ACATGCTACCTAAGGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	34	1292
75823	75838	528976	GTTAAGACCAGATACA	e-e-e-d(10)-k-k-k	45	1293
75824	75839	528977	AGTTAAGACCAGATAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	1294
75825	75840	528978	GAGTTAAGACCAGATA	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	1295
75826	75841	528979	AGAGTTAAGACCAGAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	62	1296
75831	75846	530399	CAATCAGAGTTAAGAC	k-d(10)-k-e-k-e-e	36	1297
75832	75848	530029	TACAATCAGAGTTAAGA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	29	1298
75832	75847	530349	ACAATCAGAGTTAAGA	e-k-d(10)-k-e-k-e	33	1299

75833	75848	528980	TACAATCAGAGTTAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	378
75833	75848	530097	TACAATCAGAGTTAAG	e-k-k-d(10)-k-k-e	41	378
75833	75848	530144	TACAATCAGAGTTAAG	e-e-k-d(10)-k-k-e	16	378
75833	75848	530194	TACAATCAGAGTTAAG	e-d-k-d(10)-k-k-e	28	378
75833	75848	530244	TACAATCAGAGTTAAG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	0	378
75833	75848	530294	TACAATCAGAGTTAAG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	7	378
75835	75850	528981	GCTACAATCAGAGTTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	52	1300
75836	75851	528982	TGCTACAATCAGAGTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	47	1301
75837	75852	528983	TTGCTACAATCAGAGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	44	1302
75849	75864	530400	CTCTCAGAACTTTTGC	k-d(10)-k-e-k-e-e	65	1303
75850	75866	530030	TCCTCTCAGAACTTTTG	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	47	1304
75850	75865	530350	CCTCTCAGAACTTTTG	e-k-d(10)-k-e-k-e	54	1305
75851	75866	530098	TCCTCTCAGAACTTTT	e-k-k-d(10)-k-k-e	42	380
75851	75866	530145	TCCTCTCAGAACTTTT	e-e-k-d(10)-k-k-e	38	380
75851	75866	530195	TCCTCTCAGAACTTTT	e-d-k-d(10)-k-k-e	43	380
75851	75866	530245	TCCTCTCAGAACTTTT	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	28	380
75851	75866	530295	TCCTCTCAGAACTTTT	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	39	380
75957	75972	528984	CCCACGGGATTCCCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1306
75958	75973	528985	ACCCACGGGATTCCCT	e-e-e-d(10)-k-k-k	36	1307
75959	75974	528986	AACCCACGGGATTCCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	47	1308
75960	75975	528987	CAACCCACGGGATTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	39	1309
75961	75976	528988	GCAACCCACGGGATTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	48	1310
75962	75977	528989	AGCAACCCACGGGATT	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	1311

75964	75979	528990	TAAGCAACCCACGGGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	27	1312
75965	75980	528991	GTAAGCAACCCACGGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	47	1313
75966	75981	528992	GGTAAGCAACCCACGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	42	1314
75967	75982	528993	AGGTAAGCAACCCACG	e-e-e-d(10)-k-k-k	54	1315
75967	75982	530434	AGGTAAGCAACCCACG	k-d(10)-k-e-k-e-e	51	1315
75968	75983	528994	TAGGTAAGCAACCCAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	53	1316
75968	75984	530064	GTAGGTAAGCAACCCAC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	53	1317
75968	75983	530384	TAGGTAAGCAACCCAC	e-k-d(10)-k-e-k-e	48	1316
75969	75984	528995	GTAGGTAAGCAACCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	64	388
75969	75984	530129	GTAGGTAAGCAACCCA	e-k-k-d(10)-k-k-e	79	388
75969	75984	530179	GTAGGTAAGCAACCCA	e-e-k-d(10)-k-k-e	74	388
75969	75984	530229	GTAGGTAAGCAACCCA	e-d-k-d(10)-k-k-e	64	388
75969	75984	530279	GTAGGTAAGCAACCCA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	55	388
75969	75984	530329	GTAGGTAAGCAACCCA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	61	388
75971	75986	528996	AGGTAGGTAAGCAACC	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	1318
75975	75990	528997	TTATAGGTAGGTAAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	1319
75979	75994	528998	CACCTTATAGGTAGGT	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1320
75981	75996	528999	ACCACCTTATAGGTAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	15	1321
75984	75999	529000	TAAACCACCTTATAGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1322
75985	76000	529001	ATAAACCACCTTATAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	7	1323
75997	76012	529002	GGACAGCAGCTTATAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	12	1324
75998	76013	529003	AGGACAGCAGCTTATA	e-e-e-d(10)-k-k-k	40	1325
75998	76013	530401	AGGACAGCAGCTTATA	k-d(10)-k-e-k-e-e	41	1325

75999	76014	529004	CAGGACAGCAGCTTAT	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	1326
75999	76015	530031	CCAGGACAGCAGCTTAT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	58	1327
75999	76014	530351	CAGGACAGCAGCTTAT	e-k-d(10)-k-e-k-e	58	1326
75999	76014	530402	CAGGACAGCAGCTTAT	k-d(10)-k-e-k-e-e	60	1326
76000	76016	530032	GCCAGGACAGCAGCTTA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	74	1328
76000	76015	530099	CCAGGACAGCAGCTTA	e-k-k-d(10)-k-k-e	73	1329
76000	76015	530146	CCAGGACAGCAGCTTA	e-e-k-d(10)-k-k-e	70	1329
76000	76015	530196	CCAGGACAGCAGCTTA	e-d-k-d(10)-k-k-e	67	1329
76000	76015	530246	CCAGGACAGCAGCTTA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	39	1329
76000	76015	530296	CCAGGACAGCAGCTTA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	67	1329
76000	76015	530352	CCAGGACAGCAGCTTA	e-k-d(10)-k-e-k-e	67	1329
76001	76016	530100	GCCAGGACAGCAGCTT	e-k-k-d(10)-k-k-e	77	1330
76001	76016	530147	GCCAGGACAGCAGCTT	e-e-k-d(10)-k-k-e	84	1330
76001	76016	530197	GCCAGGACAGCAGCTT	e-d-k-d(10)-k-k-e	71	1330
76001	76016	530247	GCCAGGACAGCAGCTT	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	53	1330
76001	76016	530297	GCCAGGACAGCAGCTT	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	75	1330
76001	76016	530403	GCCAGGACAGCAGCTT	k-d(10)-k-e-k-e-e	77	1330
76002	76018	530033	TGGCCAGGACAGCAGCT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	65	1331
76002	76017	530353	GGCCAGGACAGCAGCT	e-k-d(10)-k-e-k-e	83	1332
76003	76018	530101	TGGCCAGGACAGCAGC	e-k-k-d(10)-k-k-e	59	1333
76003	76018	530148	TGGCCAGGACAGCAGC	e-e-k-d(10)-k-k-e	79	1333
76003	76018	530198	TGGCCAGGACAGCAGC	e-d-k-d(10)-k-k-e	54	1333
76003	76018	530248	TGGCCAGGACAGCAGC	e-d-k-d(9)-k-k-e	32	1333

76003	76018	530298	TGGCCAGGACAGCAGC	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	73	1333
76014	76029	530404	TTTGAATGCAGTGGCC	k-d(10)-k-e-k-e-e	67	1334
76015	76031	530034	AATTTGAATGCAGTGGC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	69	1335
76015	76030	530354	ATTTGAATGCAGTGGC	e-k-d(10)-k-e-k-e	85	1336
76015	76030	530405	ATTTGAATGCAGTGGC	k-d(10)-k-e-k-e-e	55	1336
76016	76032	530035	GAATTTGAATGCAGTGG	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	69	1337
76016	76031	530102	AATTTGAATGCAGTGG	e-k-k-d(10)-k-k-e	71	1338
76016	76031	530149	AATTTGAATGCAGTGG	e-e-k-d(10)-k-k-e	70	1338
76016	76031	530199	AATTTGAATGCAGTGG	e-d-k-d(10)-k-k-e	58	1338
76016	76031	530249	AATTTGAATGCAGTGG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	47	1338
76016	76031	530299	AATTTGAATGCAGTGG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	47	1338
76016	76031	530355	AATTTGAATGCAGTGG	e-k-d(10)-k-e-k-e	72	1338
76017	76032	530103	GAATTTGAATGCAGTG	e-k-k-d(10)-k-k-e	77	390
76017	76032	530150	GAATTTGAATGCAGTG	e-e-k-d(10)-k-k-e	73	390
76017	76032	530200	GAATTTGAATGCAGTG	e-d-k-d(10)-k-k-e	63	390
76017	76032	530250	GAATTTGAATGCAGTG	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	59	390
76017	76032	530300	GAATTTGAATGCAGTG	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	65	390
76029	76044	530435	AAGTACACATTGGAAT	k-d(10)-k-e-k-e-e	62	1339
76030	76046	530057	TGAAGTACACATTGGAA	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	69	1340
76030	76045	530385	GAAGTACACATTGGAA	e-k-d(10)-k-e-k-e	70	1341
76031	76046	529005	TGAAGTACACATTGGA	e-e-e-d(10)-k-k-k	64	392
76031	76046	530130	TGAAGTACACATTGGA	e-k-k-d(10)-k-k-e	85	392
76031	76046	530180	TGAAGTACACATTGGA	e-e-k-d(10)-k-k-e	82	392

76031	76046	530230	TGAAGTACACATTGGA	e-d-k-d(10)-k-k-e	65	392
76031	76046	530280	TGAAGTACACATTGGA	e-d-d-k-d(9)-k-k-e	75	392
76031	76046	530330	TGAAGTACACATTGGA	e-e-e-e-d(9)-k-k-e	52	392
76039	76054	529006	TTACACTATGAAGTAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	16	1342
76116	76131	529007	AGTTAAAGTAGATACA	e-e-e-d(10)-k-k-k	0	1343
76121	76136	529008	CTGGAAGTTAAAGTAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	397
76130	76145	529009	CGTTTATTTCTGGAAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	52	1344
76144	76159	529010	CGGTTCCTATATAACG	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	1345
76145	76160	529011	ACGGTTCCTATATAAC	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	1346

EJEMPLO 14: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 HUMANA EN CÉLULAS HUVEC

Los gápmeros del estudio que se describe en el Ejemplo 13 que exhiben inhibición *in vitro* significativa de STAT3 se probaron a diferentes dosis en células HuVEC. Se plaquearon las células a una densidad de 20,000 células por pocillo y se transfectaron usando electroporación con concentraciones de 39.1 nM, 156.3 nM, 625.0 nM, y 2,500.0 nM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 15. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS199, que se describió previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 15. Como se ilustra en la Tabla 15, los niveles de ARNm de STAT3 se redujeron de forma significativa en una forma dependiente de la dosis en las células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

TABLA 15

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de STAT3 humana en células HuVEC

ISIS N°	39.1 nM	156.3nM	625.0 nM	2500.0 nM	IC_{50} (μM)
481464	6	51	84	94	0.2
518345	0	9	56	84	0.6
518349	16	3	47	83	0.6
519636	16	41	75	89	0.2
519637	24	43	84	94	0.2
519638	6	34	70	92	0.3
528403	0	4	39	77	0.9
528458	0	15	46	81	0.7
528475	1	10	51	76	0.7
528476	0	11	42	80	0.7
528869	25	19	67	86	0.3
528880	0	3	45	76	0.8
528937	0	1	49	82	0.8
528938	0	9	50	82	0.7
528942	0	20	59	88	0.5
528959	0	4	55	79	0.7
529022	0	0	52	81	0.8
529023	0	0	53	90	0.6
529024	0	0	47	80	0.8

529025	0	11	50	90	0.6
529026	0	31	73	96	0.4
529027	0	7	36	80	0.9
530021	6	30	69	92	0.3
530025	10	33	73	92	0.3
530026	3	18	52	80	0.6
530041	0	28	72	91	0.4
530048	0	22	53	83	0.5
530049	2	16	69	92	0.4
530053	0	16	66	90	0.5
530062	4	56	85	94	0.2
530066	0	12	46	84	0.7
530088	2	39	77	93	0.3
530091	3	12	59	84	0.5
530092	7	27	65	85	0.4
530093	7	46	79	96	0.2
530094	0	17	63	89	0.5
530109	9	30	72	94	0.3
530110	0	23	61	83	0.5
530112	0	13	42	90	0.6
530114	0	21	62	79	0.6
530116	22	40	71	92	0.2
530123	8	19	72	93	0.3
530130	0	33	64	89	0.4
530131	4	34	81	93	0.3
530135	22	38	79	94	0.2
530138	6	23	57	86	0.4
530140	4	22	62	91	0.4
530147	0	15	51	83	0.6
530156	7	41	81	96	0.2
530161	0	20	46	78	0.7
530170	0	29	67	90	0.4
530175	37	52	84	95	0.1

530178	8	24	70	86	0.4
530180	0	0	61	82	0.6
530181	0	27	52	86	0.5
530185	0	22	54	86	0.5
530190	17	17	60	87	0.4
530206	8	29	73	93	0.3
530225	0	27	67	91	0.4
530228	11	16	64	86	0.4
530261	5	25	57	91	0.4
530270	7	11	62	91	0.4
530275	14	34	73	91	0.3
530278	1	27	60	85	0.4
530285	5	20	61	82	0.5
530306	3	14	66	85	0.5
530311	6	27	59	86	0.4
530320	3	17	56	85	0.5
530325	5	35	70	92	0.3
530328	4	34	61	87	0.4
530340	8	34	74	90	0.3
530341	2	23	77	89	0.4
530344	16	20	64	89	0.4
530345	15	35	77	94	0.2
530346	5	24	66	92	0.4
530353	7	25	57	83	0.5
530354	2	24	60	81	0.5
530359	0	4	44	89	0.7
530361	13	30	59	92	0.3
530365	0	0	45	88	0.7
530367	0	15	49	88	0.5
530368	0	27	64	89	0.4
530369	10	28	78	95	0.3
530373	13	29	64	92	0.3
530375	0	14	53	90	0.5

530380	8	40	80	94	0.2
530390	11	21	66	90	0.4
530391	20	7	49	86	0.5
530411	5	19	81	95	0.3
530430	0	8	53	91	0.6
530466	0	4	53	87	0.6
530468	4	17	65	90	0.4
530469	8	38	86	94	0.2
530470	5	39	78	91	0.3
530471	0	21	69	91	0.4
530476	7	9	32	89	0.7
530477	0	12	64	87	0.5
530478	0	14	59	90	0.5
530485	0	10	61	85	0.5
530486	0	17	64	80	0.5
530492	0	25	71	89	0.4
530493	4	23	58	88	0.4
530507	5	17	65	82	0.5
530508	0	14	56	89	0.5
530509	0	17	54	86	0.5
530513	6	24	74	91	0.3
530514	1	7	52	78	0.7
530515	0	19	73	89	0.4

EJEMPLO 15: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DE STAT3 HUMANA EN CÉLULAS HUVEC

Se diseñaron otros oligonucleótidos antisentido contra un ácido nucleico de STAT3 y se probaron para su efectos sobre el ARNm de STAT3 *in vitro*. Las células HuVEC cultivadas a una densidad de 20,000 células por pocillo se transfectaron usando electroporación con 1,000 nM de oligonucleótido antisentido. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de cebadores y sonda para humano RTS199, que se describió previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos en la Tabla 16 son gápmeros 3-10-3 desoxi, MOE y gápmeros cEt o 3-10-4 desoxi, MOE y cEt. Los gápmeros 3-10-3 tienen 16 nucleósidos de longitud, en donde el segmento espaciador central comprende diez 2'-desoxinucleósidos y está flanqueado a ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por extensiones que comprenden 3 nucleótidos cada una. Los gápmeros 3-10-4 tienen 17 nucleósidos de longitud, en donde el segmento espaciador central

comprende diez 2'-desoxinucleósidos y está flanqueado en la dirección 5' por una extensión que comprende 3 nucleósidos y en la dirección 3' por una extensión que comprende 4 nucleósidos. Las uniones internucleosídicas a lo largo de cada gápmero son uniones fosforotioato (P=S). Todos los residuos de citosina a lo largo de cada gápmero son 5-metilcitosinas. La columna de la química de Tabla 16 presenta el motivo de azúcar de cada gápmero, en donde 'e' indica un nucleósido 2'-MOE, 'k' indica un nucleósido de etilo (cEt) constreñido, y 'd' indica un 2'-desoxinucleósido.

"Sitio de inicio de blanco en humano" indica el nucleósido ubicado más hacia 5' contra el que está dirigido el gápmero en la secuencia génica humana. "Sitio de finalización de blanco en humano" indica el nucleósido ubicado más hacia 3' contra el que está dirigido el gápmero en la secuencia génica humana. Cada gápmero que se lista en la Tabla 16 se dirige contra el ARNm de STAT3 humana, designada en la presente como SEQ ID Nº 1 (No. de Acceso a GENBANK NM_139276.2). Cada gápmero que se lista en la Tabla 17 se dirige contra secuencia genómica de STAT3 humana, designada en la presente como SEQ ID Nº 2 (el complemento del No. de Acceso a GENBANK NT_010755.14 truncado entre los nucleótidos 4185000 to 4264000).

TABLA 16

Niveles de inhibición del ARNm de STAT3 humana por oligonucleótidos antisentido quiméricos contra la SEQ ID Nº 1

Sitio de inicio en Humano	Sitio de Finalización en Humano	ISIS N°	Secuencia	Química	% de inhibición	SEQ ID Nº
730	745	530011	GGAGATTCTCTACCAC	k-k-k-d(10)-e-e-e	73	53
1901	1916	529974	AAGCCCTTGCCAGCCA	e-e-e-d(10)-k-k-k	83	144
1901	1916	530012	AAGCCCTTGCCAGCCA	k-k-k-d(10)-e-e-e	73	144
2206	2221	530015	CCATGATCTTATAGCC	k-k-k-d(10)-e-e-e	38	175
3016	3031	481464	CTATTTGGATGTCAGC	k-k-k-d(10)-k-k-k	94	245
3461	3476	529975	AGCACCAAGGAGGCTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	54	257
3461	3476	530013	AGCACCAAGGAGGCTG	k-k-k-d(10)-e-e-e	58	257
3584	3600	530018	TCCTTAAACCTTCCTAT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	46	1510
3585	3600	529944	TCCTTAAACCTTCCTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	44	273
3585	3600	529977	TCCTTAAACCTTCCTA	k-k-k-d(10)-e-e-e	66	273
3592	3608	530019	TTAGATTCTCCTTAAAC	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	43	1511
3593	3608	529945	TTAGATTCTCCTTAAA	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1166
3593	3608	529978	TTAGATTCTCCTTAAA	k-k-k-d(10)-e-e-e	49	1166
3596	3612	530020	ATGCTTAGATTCTCCTT	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	85	1512
3597	3612	529979	ATGCTTAGATTCTCCT	k-k-k-d(10)-e-e-e	86	1169
3599	3614	529946	AAATGCTTAGATTCTC	e-e-e-d(10)-k-k-k	46	1172
3599	3614	529980	AAATGCTTAGATTCTC	k-k-k-d(10)-e-e-e	25	1172
3716	3731	529947	CAGATCAAGTCCAGGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	68	1187
3716	3731	529981	CAGATCAAGTCCAGGG	k-k-k-d(10)-e-e-e	83	1187

3718	3733	529948	AGCAGATCAAGTCCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	75	1190
3718	3733	529982	AGCAGATCAAGTCCAG	k-k-k-d(10)-e-e-e	84	1190
4236	4251	529983	AGGTGTTCCCATACGC	k-k-k-d(10)-e-e-e	96	1245
4237	4252	529984	TAGGTGTTCCCATACG	k-k-k-d(10)-e-e-e	91	336
4437	4452	529949	CATCAACTGTCTCCAG	e-e-e-d(10)-k-k-k	48	354
4437	4452	529985	CATCAACTGTCTCCAG	k-k-k-d(10)-e-e-e	37	354
4439	4454	529950	CACATCAACTGTCTCC	e-e-e-d(10)-k-k-k	58	356
4439	4454	529986	CACATCAACTGTCTCC	k-k-k-d(10)-e-e-e	72	356
4646	4661	529987	TACAATCAGAGTTAAG	k-k-k-d(10)-e-e-e	0	378
4664	4679	529951	TCCTCTCAGAACTTTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	380
4664	4679	529988	TCCTCTCAGAACTTTT	k-k-k-d(10)-e-e-e	40	380
4782	4797	530016	GTAGGTAAGCAACCCA	k-k-k-d(10)-e-e-e	60	388
4813	4828	529952	CCAGGACAGCAGCTTA	e-e-e-d(10)-k-k-k	65	1329
4813	4828	529989	CCAGGACAGCAGCTTA	k-k-k-d(10)-e-e-e	63	1329
4814	4829	529953	GCCAGGACAGCAGCTT	e-e-e-d(10)-k-k-k	65	1330
4814	4829	529990	GCCAGGACAGCAGCTT	k-k-k-d(10)-e-e-e	75	1330
4816	4831	529954	TGGCCAGGACAGCAGC	e-e-e-d(10)-k-k-k	79	1333
4816	4831	529991	TGGCCAGGACAGCAGC	k-k-k-d(10)-e-e-e	52	1333
4829	4844	529955	AATTTGAATGCAGTGG	e-e-e-d(10)-k-k-k	52	1338
4829	4844	529992	AATTTGAATGCAGTGG	k-k-k-d(10)-e-e-e	23	1338
4830	4845	529956	GAATTTGAATGCAGTG	e-e-e-d(10)-k-k-k	60	390
4830	4845	529993	GAATTTGAATGCAGTG	k-k-k-d(10)-e-e-e	51	390
4844	4859	530014	TGAAGTACACATTGGA	k-k-k-d(10)-e-e-e	67	392

TABLA 17

Niveles de inhibición del ARNm de STAT3 humana por oligonucleótidos antisentido quiméricos contra la SEQ ID Nº 2

Sitio de inicio en Humano	Sitio de Finalización en Humano	ISIS N°	Secuencia	Química	% de inhibición	SEQ ID Nº
74203	74218	CTATTTGGATGTCAGC	481464	k-k-k-d(10)-k-k-k	94	245
74772	74787	TCCTTAAACCTTCCTA	529944	e-e-e-d(10)-k-k-k	44	273
74780	74795	TTAGATTCTCCTTAAA	529945	e-e-e-d(10)-k-k-k	22	1166
74786	74801	AAATGCTTAGATTCTC	529946	e-e-e-d(10)-k-k-k	46	1172
74903	74918	CAGATCAAGTCCAGGG	529947	e-e-e-d(10)-k-k-k	68	1187
74905	74920	AGCAGATCAAGTCCAG	529948	e-e-e-d(10)-k-k-k	75	1190
75624	75639	CATCAACTGTCTCCAG	529949	e-e-e-d(10)-k-k-k	48	354
75626	75641	CACATCAACTGTCTCC	529950	e-e-e-d(10)-k-k-k	58	356
75851	75866	TCCTCTCAGAACTTTT	529951	e-e-e-d(10)-k-k-k	38	380
76000	76015	CCAGGACAGCAGCTTA	529952	e-e-e-d(10)-k-k-k	65	1329
76001	76016	GCCAGGACAGCAGCTT	529953	e-e-e-d(10)-k-k-k	65	1330
76003	76018	TGGCCAGGACAGCAGC	529954	e-e-e-d(10)-k-k-k	79	1333
76016	76031	AATTTGAATGCAGTGG	529955	e-e-e-d(10)-k-k-k	52	1338
76017	76032	GAATTTGAATGCAGTG	529956	e-e-e-d(10)-k-k-k	60	390
2340	2355	ACATACAGTAAGACCA	529957	e-e-e-d(10)-k-k-k	21	1376
2385	2400	CAAAAATTTACAACCC	529958	e-e-e-d(10)-k-k-k	10	1380
2410	2425	CCAATGCTTTATCAGC	529959	e-e-e-d(10)-k-k-k	51	1384
2671	2686	AGACTAAAATCAAGGC	529960	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	1388
5002	5017	AACTGAAATTCCTTGG	529961	e-e-e-d(10)-k-k-k	52	1395

5701	5716	GTACTCTTTCAGTGGT	529962	e-e-e-d(10)-k-k-k	91	1399
8080	8095	GCAGATTTACCTTCCT	529963	e-e-e-d(10)-k-k-k	55	1409
9125	9140	CTGCCCCTATGTATAA	529964	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	1413
11263	11278	CTGCCCCTATGTATAA	529964	e-e-e-d(10)-k-k-k	18	1413
9864	9879	GCTTCTTCCTGAGACA	529965	e-e-e-d(10)-k-k-k	52	1417
12347	12362	GCTTCTTCCTGAGACA	529965	e-e-e-d(10)-k-k-k	52	1417
9866	9881	TGGCTTCTTCCTGAGA	529966	e-e-e-d(10)-k-k-k	51	1420
12349	12364	TGGCTTCTTCCTGAGA	529966	e-e-e-d(10)-k-k-k	51	1420
9875	9890	TCCTCCTGTTGGCTTC	529967	e-e-e-d(10)-k-k-k	80	1425
12358	12373	TCCTCCTGTTGGCTTC	529967	e-e-e-d(10)-k-k-k	80	1425
9876	9891	TTCCTCCTGTTGGCTT	529968	e-e-e-d(10)-k-k-k	56	1426
12359	12374	TTCCTCCTGTTGGCTT	529968	e-e-e-d(10)-k-k-k	56	1426
9878	9893	GGTTCCTCCTGTTGGC	529969	e-e-e-d(10)-k-k-k	69	1429
12361	12376	GGTTCCTCCTGTTGGC	529969	e-e-e-d(10)-k-k-k	69	1429
16865	16880	TATAATTGTGTACTGG	529970	e-e-e-d(10)-k-k-k	41	1441
26063	26078	CAACTTTAGCCCCTTC	529971	e-e-e-d(10)-k-k-k	32	1452
48404	48419	CACACTTTCCATTCTA	529972	e-e-e-d(10)-k-k-k	30	1476
71616	71631	CAGTACAATTGCTTCA	529973	e-e-e-d(10)-k-k-k	49	1505
66138	66153	AAGCCCTTGCCAGCCA	529974	e-e-e-d(10)-k-k-k	83	144
74648	74663	AGCACCAAGGAGGCTG	529975	e-e-e-d(10)-k-k-k	54	257
2705	2720	CTAATGGTTCTTTGTG	529976	e-e-e-d(10)-k-k-k	25	411
74772	74787	TCCTTAAACCTTCCTA	529977	k-k-k-d(10)-e-e-e	66	273
74780	74795	TTAGATTCTCCTTAAA	529978	k-k-k-d(10)-e-e-e	49	1166

74784	74799	ATGCTTAGATTCTCCT	529979	k-k-k-d(10)-e-e-e	86	1169
74786	74801	AAATGCTTAGATTCTC	529980	k-k-k-d(10)-e-e-e	25	1172
74903	74918	CAGATCAAGTCCAGGG	529981	k-k-k-d(10)-e-e-e	83	1187
74905	74920	AGCAGATCAAGTCCAG	529982	k-k-k-d(10)-e-e-e	84	1190
75423	75438	AGGTGTTCCCATACGC	529983	k-k-k-d(10)-e-e-e	96	1245
75424	75439	TAGGTGTTCCCATACG	529984	k-k-k-d(10)-e-e-e	91	336
75624	75639	CATCAACTGTCTCCAG	529985	k-k-k-d(10)-e-e-e	37	354
75626	75641	CACATCAACTGTCTCC	529986	k-k-k-d(10)-e-e-e	72	356
75833	75848	TACAATCAGAGTTAAG	529987	k-k-k-d(10)-e-e-e	0	378
75851	75866	TCCTCTCAGAACTTTT	529988	k-k-k-d(10)-e-e-e	40	380
76000	76015	CCAGGACAGCAGCTTA	529989	k-k-k-d(10)-e-e-e	63	1329
76001	76016	GCCAGGACAGCAGCTT	529990	k-k-k-d(10)-e-e-e	75	1330
76003	76018	TGGCCAGGACAGCAGC	529991	k-k-k-d(10)-e-e-e	52	1333
76016	76031	AATTTGAATGCAGTGG	529992	k-k-k-d(10)-e-e-e	23	1338
76017	76032	GAATTTGAATGCAGTG	529993	k-k-k-d(10)-e-e-e	51	390
2340	2355	ACATACAGTAAGACCA	529994	k-k-k-d(10)-e-e-e	44	1376
2385	2400	CAAAAATTTACAACCC	529995	k-k-k-d(10)-e-e-e	0	1380
2410	2425	CCAATGCTTTATCAGC	529996	k-k-k-d(10)-e-e-e	65	1384
2671	2686	AGACTAAAATCAAGGC	529997	k-k-k-d(10)-e-e-e	44	1388
5002	5017	AACTGAAATTCCTTGG	529998	k-k-k-d(10)-e-e-e	35	1395
5701	5716	GTACTCTTTCAGTGGT	529999	k-k-k-d(10)-e-e-e	91	1399
8080	8095	GCAGATTTACCTTCCT	530000	k-k-k-d(10)-e-e-e	80	1409
9125	9140	CTGCCCCTATGTATAA	530001	k-k-k-d(10)-e-e-e	21	1413

11263	11278	CTGCCCCTATGTATAA	530001	k-k-k-d(10)-e-e-e	21	1413
9864	9879	GCTTCTTCCTGAGACA	530002	k-k-k-d(10)-e-e-e	74	1417
12347	12362	GCTTCTTCCTGAGACA	530002	k-k-k-d(10)-e-e-e	74	1417
9866	9881	TGGCTTCTTCCTGAGA	530003	k-k-k-d(10)-e-e-e	67	1420
12349	12364	TGGCTTCTTCCTGAGA	530003	k-k-k-d(10)-e-e-e	67	1420
9875	9890	TCCTCCTGTTGGCTTC	530004	k-k-k-d(10)-e-e-e	83	1425
12358	12373	TCCTCCTGTTGGCTTC	530004	k-k-k-d(10)-e-e-e	83	1425
9876	9891	TTCCTCCTGTTGGCTT	530005	k-k-k-d(10)-e-e-e	77	1426
12359	12374	TTCCTCCTGTTGGCTT	530005	k-k-k-d(10)-e-e-e	77	1426
9878	9893	GGTTCCTCCTGTTGGC	530006	k-k-k-d(10)-e-e-e	89	1427
12361	12376	GGTTCCTCCTGTTGGC	530006	k-k-k-d(10)-e-e-e	89	1427
16865	16880	TATAATTGTGTACTGG	530007	k-k-k-d(10)-e-e-e	21	1441
26063	26078	CAACTTTAGCCCCCTTC	530008	k-k-k-d(10)-e-e-e	58	1452
48404	48419	CACACTTTCCATTCTA	530009	k-k-k-d(10)-e-e-e	59	1476
71616	71631	CAGTACAATTGCTTCA	530010	k-k-k-d(10)-e-e-e	75	1505
50694	50709	GGAGATTCTCTACCAC	530011	k-k-k-d(10)-e-e-e	73	53
66138	66153	AAGCCCTTGCCAGCCA	530012	k-k-k-d(10)-e-e-e	73	144
74648	74663	AGCACCAAGGAGGCTG	530013	k-k-k-d(10)-e-e-e	58	257
76031	76046	TGAAGTACACATTGGA	530014	k-k-k-d(10)-e-e-e	67	392
67068	67083	CCATGATCTTATAGCC	530015	k-k-k-d(10)-e-e-e	38	175
75969	75984	GTAGGTAAGCAACCCA	530016	k-k-k-d(10)-e-e-e	60	388
2705	2720	CTAATGGTTCTTTGTG	530017	k-k-k-d(10)-e-e-e	46	411
74771	74787	TCCTTAAACCTTCCTAT	530018	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	46	1510

74779	74795	TTAGATTCTCCTTAAAC	530019	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	43	1511
74783	74799	ATGCTTAGATTCTCCTT	530020	e-e-k-d(10)-k-e-k-e	85	1512

EJEMPLO 16: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 HUMANA EN CÉLULAS HUVEC

Los gápmeros del estudio que se describe en el Ejemplo 15 que exhiben inhibición *in vitro* significativa de STAT3 se probaron a diferentes dosis en células HuVEC. Se plaquearon las células a una densidad de 20,000 células por pocillo y se transfectaron usando electroporación con concentraciones de 39.1 nM, 156.3 nM, 625.0 nM, y 2,500.0 nM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 18. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS199, que se describió previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 18. Como se ilustra en la Tabla 18, los niveles de ARNm de STAT3 se redujeron de forma significativa en una forma dependiente de la dosis en las células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

TABLA 18

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de STAT3 humana en células HuVEC

ISIS N°	39.1 nM	156.3 nM	625.0 nM	2500.0 nM	IC_{50} (μM)
481464	41	78	92	91	0.04
529962	30	51	86	95	0.12
529979	0	43	81	95	0.27
529982	0	0	70	90	0.56
529983	31	67	87	94	0.08
529984	17	44	83	97	0.19
529999	29	51	83	96	0.13
530006	18	38	77	94	0.22
530020	2	39	75	92	0.28

EJEMPLO 17: EFECTO DE ISIS OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO CONTRA STAT3 EN EL TRATAMIENTO DE UN MODELO DE XENOINJERTO DE CÁNCER DE MAMA HUMANO POR MDA-MB-231

Los ratones BALB/c inoculados con células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 se trataron con ISIS 481464 e ISIS 481549. El ISIS 481549 reacciona en forma cruzada con la secuencia de ratón (o sea, hidridiza con la secuencia de ratón). Se evaluó el crecimiento tumoral y la tolerabilidad de los oligonucleótidos en los ratones.

TRATAMIENTO

El estudio se llevó a cabo en Pharmaron Inc (Beijing, República Popular China). Los ratones BALB/c se obtuvieron de Beijing HFK Bio-Technology Co., Ltd. Las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 se mantuvieron *in vitro* como cultivo en monocapa en Medio L-15 de Leibovitz suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 100 U/mL de penicilina, 100 μg/mL de estreptomicina, y 2 mM de L-glutamina. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 en aire. Las células tumorales se subcultivaron de rutina dos veces por semana con tratamiento de tripsina-EDTA. Las células creciendo en fase exponencial se cosecharon

y contaron para la inoculación de los tumores.

Tres grupos de ocho ratones hembra BALB/c de entre 6 y 8 semanas de edad asignados al azar se inocularon cada uno en el flanco derecho con fragmentos de tumor de MDA-MB-231 (3 mm x 2 mm x 2 mm, que se generaron a partir de pasajes de inoculación tumoral) para desarrollo tumoral. El tratamiento con oligonucleótidos antisentido comenzó en el día 11 después de la inoculación tumoral cuando el tamaño tumoral medio alcanzó aproximadamente 100 mm^3. Dos de los grupos se inyectaron por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas con 25 mg/kg de ISIS 481464 o ISIS 481549. Un grupo control de ratones se inyectó por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas con PBS.

Todos los procedimientos relacionados con la manipulación, cuidado y tratamiento de animales, se llevaron a cabo de acuerdo a las guías aprobadas por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Se revisaron de rutina los animales para ver cualquier efecto del crecimiento tumoral sobre el comportamiento normal, tales como la movilidad, consumo de alimento, cambios de peso corporal y cualquier otro efecto anormal.

ANÁLISIS DEL ARN

Se extrajo el ARN del tejido tumoral para análisis por PCR en tiempo real de los niveles de ARNm de STAT3 humana usando el juego de sonda y cebadores RTS199, que se describió previamente en la presente. Los niveles de ARNm de STAT3 murina también se midieron usando el juego de sonda y cebadores mSTAT3_LTS00664 (secuencia directa CGACAGCTTCCCCATGGA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1513; secuencia reversa ATGCCCAGTCTTGACTCTCAATC, designada en la presente como SEQ ID Nº 1514; secuencia de sonda CTGCGGCAGTTCCTGGCACCTT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1515). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación al control con PBS, normalizados a ciclofilina. Como se muestra en la Tabla 19, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido ISIS resultó en la reducción del ARNm de STAT3 tanto humana como murina en comparación con el control con PBS.

TABLA 19

Porcentaje de inhibición de ARNm de STAT3 en los grupos de tratamiento en relación al control con PBS en el modelo de xenoinjerto con MDA-MB-231

ISIS N°	STAT3 humana	STAT3 murina
481464	25	16
481549	22	44

EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL

Se midió el tamaño tumoral dos veces por semana en dos dimensiones usando un calibre. Los volúmenes tumorales se calcularon usando la fórmula: $V = 0.536 \times a \times b^2$, en donde a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. El tamaño tumoral se utilizó para los cálculos de los valores de T-C y T_V/C_V. T-C se calculó con T como la mediana de tiempo (en días) que se requiere para que los tumores en los grupos de tratamiento alcancen un tamaño predeterminado (900 mm^3), y C como la mediana de tiempo (en días) para que los tumores del grupo control alcancen el mismo tamaño. El valor de T_V/C_V (expresado como porcentaje) es una indicación de la eficacia antitumoral de los oligonucleótidos ISIS, en donde T_V y C_V fueron el volumen medio de los grupos tratados y control, respectivamente, en un día dado (día 32).

Los resultados se presentan en las Tablas 20 y 21. Los datos indican que el tratamiento con ISIS 481464 e ISIS 481549 previnieron de forma significativa el crecimiento tumoral.

TABLA 20

Efecto de inhibición antisentido de STAT3 sobre el crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto con MDA-MB-231

Día	PBS	ISIS 481464	ISIS 481549
11	103	104	104
15	185	142	158
18	292	200	205
22	519	305	326
25	745	430	436
29	1,332	643	688
32	1,741	921	984

TABLA 21

Efecto de inhibición antisentido de STAT3 sobre la inhibición del el crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto con MDA-MB-231

Tratamiento	Tamano tumoral (mm^3) en el día 32	T_V/C_V (%)	T-C a 900 mm^3
PBS	1,741	-	-
ISIS 481464	921	53	6
ISIS 481549	984	57	5

MEDIDAS DE PESO CORPORAL

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS sobre la salud general de los animales, se midieron los pesos corporales en forma regular durante el periodo de tratamiento. Los datos se presentan en la Tabla 22 e indican que el tratamiento con alguno de ISIS 481464 o ISIS 481549 no causa ganancia o pérdida de peso significativa.

TABLA 22

Medidas de peso corporal de ratones en el modelo de xenoinjerto con MDA-MB-231

	Día 11	Día 15	Día 18	Día 22	Día 25	Día 29	Día 32
PBS	21.8	22.2	22.5	22.5	22.9	23.4	24.0
ISIS 481464	22.3	22.8	23.0	23.2	23.8	23.9	24.9
ISIS 481549	22.2	22.5	23.0	23.3	23.7	23.7	24.6

EJEMPLO 18: EFECTO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO ISIS CONTRA STAT3 EN EL TRATAMIENTO DE UN MODELO DE XENOINJERTO DE CARCINOMA EPIDERMOIDE HUMANO POR A431

Los ratones BALB/c inoculados con células de cáncer epidermoide humano A431 se trataron con ISIS 481464 e ISIS 481549. El ISIS 481549 reacciona en forma cruzada con la secuencia de ratón (o sea, hidridiza con la secuencia de ratón). Se evaluó el efecto del tratamiento sobre el crecimiento tumoral y la tolerabilidad en los ratones.

TRATAMIENTO

El estudio se llevó a cabo en Pharmaron Inc (Beijing, República Popular China). Los ratones BALB/c se obtuvieron de Beijing HFK Bio-Technology Co., Ltd. Las células de carcinoma epidermoide humano A431 se mantuvieron *in vitro* como cultivo en monocapa en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de

estreptomicina, y 2 mM de L-glutamina. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 en aire. Las células tumorales se subcultivaron de rutina dos veces por semana con tratamiento de tripsina-EDTA. Se cosecharon las células creciendo en fase de crecimiento exponencial y se contaron para la inoculación tumoral.

Tres grupos de ocho ratones hembra BALB/c de entre 6 y 8 semanas de edad asignados al azar se inocularon cada uno por vía subcutánea con 5 x 10^6 células tumorales A431 para desarrollo tumoral. El tratamiento con oligonucleótidos antisentido comenzó en el día 8 después de la inoculación tumoral cuando el tamaño tumoral medio alcanzó aproximadamente 95 mm^3. Dos de los grupos se inyectaron por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 4 semanas con 25 mg/kg de ISIS 481464 o ISIS 481549. Un grupo control de ratones se inyectó por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 4 semanas con PBS.

Todos los procedimientos relacionados con la manipulación, cuidado y tratamiento de animales, se llevaron a cabo de acuerdo a las guías aprobadas por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Al momento del monitoreo de rutina, los animales se revisaron para cualquier efecto del crecimiento tumoral sobre el comportamiento normal, tales como la movilidad, consumo de alimento, cambios de peso corporal y cualquier otro efecto anormal.

ANÁLISIS DEL ARN

Se extrajo el ARN del tejido tumoral para análisis por PCR en tiempo real de los niveles de ARNm de STAT3 humana usando el juego de sonda y cebadores RTS199, que se describió previamente en la presente. Los niveles de ARNm de STAT3 murina también se midieron usando el juego de sonda y cebadores mSTAT3_LTS00664, que se describió previamente en la presente. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación al control con PBS, normalizados a ciclofilina. Como se muestra en la Tabla 23, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido ISIS resultó en la reducción del ARNm de STAT3 tanto humana como murina en comparación con el control con PBS.

TABLA 23

Inhibición de ARNm de STAT3 en los grupos de tratamiento en relación al control con PBS en el modelo de xenoinjerto con A431

ISIS N°	STAT3 humana	STAT3 murina
481464	63	26
481549	29	38

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Se extrajeron proteínas a partir de los lisados tumorales para análisis por transferencia Western los niveles de la proteína STAT3 humana con anticuerpo monoclonal contra STAT3 (Cell Signaling Technology, Cat #9135). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación al control con PBS, normalizados a la proteína de control interno, COX-II. Como se muestra en la Tabla 24, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido ISIS resultó en la reducción de los niveles de la proteína STAT3 en comparación con el control con PBS.

TABLA 24

Inhibición de los niveles de proteína STAT3 en los grupos de tratamiento en relación al control con PBS en el modelo de xenoinjerto con A431

ISIS N°	% de reducción
481464	99
481549	22

EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL

Se midió el tamaño tumoral dos veces por semana en dos dimensiones usando un calibre, y los

volúmenes tumorales se calcularon usando la fórmula: $V = 0.5 \times a \times b^2$, en donde *a* y *b* son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. El tamaño tumoral se utilizó para los cálculos de los valores de T-C y T_V/C_V. T-C se calculó con T como la mediana de tiempo (en días) que se requiere para que los tumores en los grupos de tratamiento alcancen un tamaño predeterminado (800 mm^3), y C como la mediana de tiempo (en días) para que los tumores del grupo control alcancen el mismo tamaño. El valor de T_V/C_V (expresado como porcentaje) es una indicación de la eficacia antitumoral de los oligonucleótidos ISIS, en donde T_V y C_V fueron el volumen medio de los grupos tratados y control, respectivamente, en un día dado (día 33).

Los resultados se presentan en las Tablas 25 y 26. Los datos indican que el tratamiento con alguno de ISIS 481464 o ISIS 481549 previnieron de forma significativa el crecimiento tumoral.

TABLA 25

Efecto de inhibición antisentido de STAT3 sobre el crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto con A431

Días	PBS	ISIS 481464	ISIS 481549
8	94	95	95
14	178	157	132
17	308	261	202
21	528	412	304
24	682	552	426
28	875	698	555
31	1,071	898	716
33	1,210	1,030	858

TABLA 26

Efecto de inhibición antisentido de STAT3 sobre la inhibición del el crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto con A431

Tratamiento	Tamaño tumoral (mm^3) en el día 33	T_V/C_V (%)	T-C a 800 mm^3
PBS	1,210	-	-
ISIS 481464	1,030	85	3
ISIS 481549	858	71	6

MEDIDAS DE PESO CORPORAL

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS sobre la salud general de los animales, se midieron los pesos corporales en forma regular durante el periodo de tratamiento. Los datos se presentan en la Tabla 27 e indican que el tratamiento con alguno de ISIS 481464 o ISIS 481549 no afecta la salud general de los ratones.

TABLA 27

Medidas de peso corporal de ratones en el modelo de xenoinjerto con A431

	Día 8	Día 14	Día 17	Día 21	Día 24	Día 28	Día 31	Día 33

PBS	20	20	20	21	21	21	22	22
ISIS 481464	20	21	21	21	21	22	22	23
ISIS 481549	20	20	21	21	21	22	22	22

EJEMPLO 19: EFECTO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO ISIS CONTRA STAT3 EN EL TRATAMIENTO DE UN MODELO DE XENOINJERTO DE CÁNCER DE PULMÓN A CÉLULAS NO PEQUEÑAS HUMANO (NSCLC) POR NCI-H460

Los ratones BALB/c inoculados con NCI-H460 humanas de NSCLC humano se trataron con ISIS 491464, que se dirige contra STAT3 humana, e ISIS 481549, que se dirige contra STAT3 tanto humana como murina. Se evaluó el efecto del tratamiento sobre el crecimiento tumoral y la tolerabilidad en los ratones.

TRATAMIENTO

El estudio se llevó a cabo en Pharmaron Inc (Beijing, República Popular China). Los ratones BALB/c se obtuvieron de Beijing HFK Bio-Technology Co., Ltd. Las células de NSCLC humano NCI-H460 se mantuvieron *in vitro* como cultivo en monocapa en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, y 2 mM de L-glutamina. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 en aire. Las células tumorales se subcultivaron de rutina dos veces por semana con tratamiento de tripsina-EDTA. Se cosecharon las células creciendo en fase de crecimiento exponencial y se contaron para la inoculación tumoral.

Tres grupos de ocho ratones hembra BALB/c de entre 6 y 8 semanas de edad asignados al azar se inocularon cada uno por vía subcutánea con 2 x 10^6 células tumorales NCI-H460 para desarrollo tumoral. El tratamiento con oligonucleótidos antisentido comenzó en el día 6 después de la inoculación tumoral cuando el tamaño tumoral medio alcanzó aproximadamente 100 mm^3. Dos de los grupos se inyectaron por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas con 25 mg/kg de ISIS 481464 o ISIS 481549. El tercer grupo de ratones se inyectó por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas con PBS, y sirvió como grupo control.

Todos los procedimientos relacionados con la manipulación, cuidado y tratamiento de animales, se llevaron a cabo de acuerdo a las guías aprobadas por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Al momento del monitoreo de rutina, los animales se revisaron para cualquier efecto del crecimiento tumoral sobre el comportamiento normal, tales como la movilidad, consumo de alimento, cambios de peso corporal y cualquier otro efecto anormal.

ANÁLISIS DEL ARN

Se extrajo el ARN del tejido tumoral para análisis por PCR en tiempo real de los niveles de ARNm de STAT3 humana usando el juego de sonda y cebadores RTS199, que se describió previamente en la presente. Los niveles de ARNm de STAT3 murina también se midieron usando el juego de sonda y cebadores mSTAT3_LTS00664, que se describió previamente en la presente. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación al control con PBS, normalizados a ciclofilina. Como se muestra en la Tabla 28, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido ISIS resultó en la reducción del ARNm de STAT3 tanto humana como murina en comparación con el control con PBS.

TABLA 28

Inhibición de ARNm de STAT3 en los grupos de tratamiento en relación al control con PBS en el modelo de xenoinjerto por NCI-H460

ISIS N°	STAT3 humana	STAT3 murina
481464	34	0
481549	20	35

EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL

Se midió el tamaño tumoral dos veces por semana en dos dimensiones usando un calibre, y los volúmenes tumorales se calcularon usando la fórmula: $V = 0.5 \times a \times b^2$, en donde *a* y *b* son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. El tamaño tumoral se utilizó para los cálculos de los valores de T-C y T_V/C_V. T-C se calculó con T como la mediana de tiempo (en días) que se requiere para que los tumores en los grupos de tratamiento alcancen un tamaño predeterminado (1,500 mm^3), y C como la mediana de tiempo (en días) para que los tumores del grupo control alcancen el mismo tamaño. El valor de T_V/C_V (expresado como porcentaje) es una indicación de la eficacia antitumoral de los oligonucleótidos ISIS, en donde T_V y C_V fueron el volumen medio de los grupos tratados y control, respectivamente, en un día dado (día 20).

Los resultados se presentan en las Tablas 29 y 30. Los datos indican que el tratamiento con alguno de ISIS 481464 o ISIS 481549 previnieron de forma significativa el crecimiento tumoral.

TABLA 29

Efecto de inhibición antisentido de STAT3 sobre el crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto por NCI-H460

Días	PBS	ISIS 481464	ISIS 481549
6	104	104	103
8	303	197	197
11	746	498	443
13	1,175	676	654
15	1,642	982	954
18	2,277	1,571	1,577
20	2,859	1,996	2,093
22	-	2,609	2,679

TABLA 30

Efecto de inhibición antisentido de STAT3 sobre la inhibición del el crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto por NCI-H460

Tratamiento	Tamaño tumoral (mm^3) en el día 20	T_V/C_V (%)	T-C a 1,500 mm^3
PBS	1,210	-	-
ISIS 481464	1,030	85	3
ISIS 481549	858	71	6

MEDIDAS DE PESO CORPORAL

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS sobre la salud general de los animales, se midieron los pesos corporales en forma regular durante el periodo de tratamiento. Los datos se presentan en la Tabla 31 e indican que el tratamiento con alguno de ISIS 481464 o ISIS 481549 no afecta la salud general de los ratones.

TABLA 31

Medidas de peso corporal de ratones en el modelo de xenoinjerto por NCI-H460

	Día 6	Día 8	Día 11	Día 13	Día 15	Día 18	Día 20	Día 22
PBS	20	20	20	20	20	20	21	-
ISIS 481464	20	20	20	20	19	19	20	20
ISIS 481549	20	20	20	20	20	19	20	20

EJEMPLO 20: EFECTO DE INHIBICIÓN ANTISENTIDO DE STAT3 HUMANA EN UN MODELO DE RATÓN CON GLIOBASTOMA ORTOTÓPICO HUMANO

Se trataron ratones NU/J implantados ortotópicamente con células de glioblastoma humano con ISIS 455291, un gápmero 5-10-5 MOE que tiene una secuencia de CAGCAGATCAAGTCCAGGGA (SEQ ID Nº 1590). Se evaluó el efecto del tratamiento sobre el crecimiento tumoral y la tolerabilidad en los ratones.

TRATAMIENTO

Treinta ratones NU/J se implantaron estereotácticamente en el lóbulo frontal derecho con 5 x 10^5 células U-87 MG-luc2. En el día 15 después de la implantación de las células tumorales, 15 de estos ratones se dosificaron intracanealmente con una inyección en bolo en el sitio de la implantación tumoral con 100 µg de ISIS 455291, que se disolvió en 2 µL de PBS. Los restantes 15 ratones se dosificaron intracanealmente con una inyección en bolo en el sitio de la implantación tumoral con 2 µL de PBS. El segundo grupo de ratones sirvió como grupo control.

ANÁLISIS

En el día 18 después de la implantación del tumor, cinco ratones de cada grupo se sacrificaron por inhalación de CO_2 y se recolectaron los cerebros para análisis del ARN. Se extrajo el ARN del tejido tumoral para análisis por PCR en tiempo real de los niveles de ARNm de STAT3 humana usando el juego de sonda y cebadores RTS199, que se describió previamente en la presente. El tratamiento con ISIS 455291 resultó en 27% de reducción de ARNm de STAT3 humana en el tejido tumoral en comparación con el control con PBS.

Los restantes ratones de cada grupo se monitorearon regularmente hasta las 2 semanas para análisis de supervivencia. La mediana de supervivencia para el grupo control con PBS fue 30.5 días. La mediana de supervivencia para los ratones tratados con oligonucleótidos ISIS fue de 35 días. El valor P fue de 0.2088.

EJEMPLO 21: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ISIS 481549 EN RATONES APC/MIN$^+$

Se evaluó el efecto del tratamiento con ISIS 481549 sobre los niveles de ARNm de STAT3 y los números de adenomas intestinales en el modelo de ratón APC/Min$^+$. La cepa de ratones APC/Min$^+$ tiene predisposición para formación de adenoma intestinal espontáneo a lo largo del tracto intestinal completo en una etapa temprana (Moser A.R. et al., Science 1990. 247: 322-324).

TRATAMIENTO

Dos grupos de 4 ratones APC/Min+ macho de nueve semanas de edad se inyectaron por vía subcutánea con 5 mg/kg o 25 mg/kg de ISIS 481549 administrados cinco veces por semana (dosis semanales totales de 25 mg/kg y 125 mg/kg, respectivamente) durante 4 semanas. Un grupo de 4 ratones APC/Min+ ratones macho de nueve semanas de edad se inyectó por vía subcutánea con 50 mg/kg de oligonucleótido control, ISIS 141923, administrados cinco veces por semana (dosis semanal total de 250 mg/kg) durante 4 semanas. Un grupo control de 4 ratones APC/Min+ ratones macho de nueve semanas de edad se inyectó por vía subcutánea con PBS administrados cinco veces por semana durante 4 semanas. Los ratones se sacrificaron con isofluorano seguido por dislocación cervical 48 horas después de la inyección final.

Se quitaron colon e intestino, se separaron uno de otro y se limpiaron. Se cortaron aproximadamente 5 cm del tracto intestinal superior y se homogeneizaron en 2.5 mL de solución amortiguadora RLT (Qiagen) con 1% de 2-mercaptoetanol (RLT-BMe) y se colocaron en hielo seco. Se cortó el colon a la mitad y se homogeneizó la mitad proximal del tejido en 2.5 mL de RLT-BMe y se colocó en hielo

seco. Se cortó una pieza pequeña del hígado (0.2 g) y se homogeneizó en RLT-BMe y se colocó en hielo seco.

ANÁLISIS DEL ARN

Se aisló ARN de los tejidos usando el conjunto de componentes PureLink™ Total RNA Purification (Invitrogen; #12173-011A), de acuerdo al protocolo del fabricante. La RT-PCR se llevó a cabo usando el sistema StepOnePlus (Applied Biosystems), de acuerdo al protocolo del fabricante. El juego de cebadores y sonda para murino mSTAT3_LTS000664 (cebador directo CGACAGCTTCCCCATGGA, designado en la presente como SEQ ID Nº 1513; cebador reverso ATGCCCAGTCTTGACTCTCAATC, designado en la presente como SEQ ID Nº 1514; sonda CTGCGGCAGTTCCTGGCACCTT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1515) se usó para medir los niveles de ARNm de STAT3. El nivel de ARNm del gen estándar interno, ciclofilina, se midió con el juego de cebadores y sonda mcyclo_24 (cebador directo TCGCCGCTTGCTGCA, designado en la presente como SEQ ID Nº 1516; cebador reverso ATCGGCCGTGATGTCGA, designado en la presente como SEQ ID Nº 1517; sonda CCATGGTCAACCCCACCGTGTTC, designada en la presente como SEQ ID Nº 1518) y se usó para normalizar los niveles de ARNm de STAT3.

El tratamiento con ISIS 481549 resultó en una reducción estadísticamente significativa de la expresión del ARNm de STAT3 en el hígado a 25 mg/kg/semana y 125 mg/kg/semana de dosificación en hígado, intestino delgado y colon (Tabla 32) en comparación con el control con PBS. Se determinaron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento y control usando la prueba *t* de Student de dos colas ($p<0.05$).

TABLA 32

Porcentaje de inhibición de la expresión de los niveles de ARNm de STAT3 en ratones APC/Min+

Tratamiento (mg/kg/semana)	Hígado	Intestino Delgado	Colon
ISIS 141923 (250)	0	0	0
ISIS 481549 (125)	98	73	82
ISIS 481549 (25)	79	41	32

ANÁLISIS DEL NÚMERO DE ADENOMAS

Se llevó a cabo el análisis histológico del intestino delgado para evaluar microscópicamente el número de adenomas. El tratamiento con ISIS 481549 a 125 mg/kg/semana resultó en una disminución estadísticamente significativa del número de tumores en comparación con el control con PBS (Tabla 33). Las diferencias significativas entre los grupos de tratamiento y control se determinaron usando la prueba *t* de Student de dos colas ($p<0.05$).

TABLA 33

Conteos de adenomas en ratones APC/Min+

Tratamiento (mg/kg/semana)	Conteo en colon
ISIS 141923 (250)	5
ISIS 481549 (125)	1
ISIS 481549 (25)	5
PBS	6

EJEMPLO 22: EFECTO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO CONTRA STAT3 EN EL TRATAMIENTO DE UN MODELO DE XENOINJERTO DE NSCLC POR PC-9

Los ratones BALB/c (Charles River) inoculados con la línea celular de cáncer de pulmón humano a células no pequeñas, PC-9, se trataron con ISIS 481549 e ISIS 481464. Se evaluó el crecimiento tumoral y la reducción del blanco STAT3 en los ratones.

TRATAMIENTO

Se inocularon ratones BALB/c hembra de entre seis y ocho semanas de edad por vía subcutánea con 7 x 10^6 células de NSCLC humano PC-9. Los ratones que mostraron un volumen de tumor medio de entre 150 y 200 mm^3 se seleccionaron y randomizaron en diferentes grupos de tratamiento. Dos grupos de 7 ratones se inyectaron por vía subcutánea con 25 mg/kg de ISIS 481549 o ISIS 481464 administrados cinco veces por semana (dosis semanales totales de 125 mg/kg) durante 6 semanas. Un grupo de 7 ratones se inyectaron por vía subcutánea con 25 mg/kg de ISIS 347526 (TCTTATGTTTCCGAACCGTT, ningún blanco humano o murino conocido, designada en la presente como SEQ ID Nº 1519) administrados cinco veces por semana (dosis semanales totales de 125 mg/kg) durante 6 semanas. 24 horas antes del sacrificio de los ratones se dio una dosis final de oligonucleótido antisentido.

ANÁLISIS DEL ARN

Se recolectaron los tumores y se aisló el ARN usando el conjunto de componentes Qiagen RNAeasy Mini Kit (#74106), de acuerdo al protocolo del fabricante. Se midieron los niveles de ARNm de STAT3 usando un instrumento ABI StepOnePlus RT-PCR con el juego de cebadores y sonda para STAT3 humana RTS2033 (cebador directo GAGGCCCGCCCAACA, designado en la presente como SEQ ID Nº 1520; cebador reverso TTCTGCTAATGACGTTATCCAGTTTT, designado en la presente como SEQ ID Nº 1521; sonda CTGCCTAGATCGGC, designada en la presente como SEQ ID Nº 1522). Los niveles de ARNm del gen estándar interno, GAPDH, se midieron con el juego de cebadores y sonda (cebador directo GAAGGTGAAGGTCGGAGTC, designado en la presente como SEQ ID Nº 1523; cebador reverso GAAGATGGTGATGGGATTTC, designado en la presente como SEQ ID Nº 1524; sonda CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC, designada en la presente como SEQ ID Nº 1525) y se usó para normalizar los niveles de ARN. Los resultados se presentan en la Tabla 34 e indican que los oligonucleótidos antisentido redujeron los niveles de ARNm de STAT3.

TABLA 34

Porcentaje de inhibición de la expresión de los niveles de ARNm de STAT3 en el modelo de xenoinjerto de NSCLC en comparación con el control ASO

Tratamiento (mg/kg)	% de inhibición
ISIS 481464 (25)	40
ISIS 481549 (25)	22

ANÁLISIS DE CRECIMIENTO TUMORAL

Se midieron los tumores regularmente a lo largo del periodo de estudio. La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se calculó usando la fórmula

TGI = [1-(X de grupo STAT3 ASO (final))-**X** de grupo STAT3 ASO (día 1))/(**X** de control grupo ASO (final)-X de control de grupo ASO (día 1))] x 100%, en donde **X** = volumen medio del tumor.

La diferencia entre el grupo de tratamiento y el grupo control se evaluó usando la prueba estadística de ANOVA. Los resultados se presentan en la Tabla 35. Los datos indican que el crecimiento tumoral se inhibió significativamente por ISIS 481464 con TGI de 97% al día 52. El tratamiento con ISIS 481549 inhibió el crecimiento tumoral por PC-9 en 78%.

TABLA 35

Medidas de crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto de NSCLC

Día	10	13	18	20	25	28	31	34	38	42	45	48	52
ISIS 481464	233	241	267	240	229	201	201	254	218	222	221	236	255

ISIS 481549	233	217	239	188	237	299	326	318	328	410	341	389	398
ISIS 347526	240	279	295	344	295	354	383	407	540	573	655	890	940

ANÁLISIS DE PESO CORPORAL

Se midieron los pesos corporales regularmente a lo largo del periodo de estudio. Los resultados se presentan en la Tabla 36 e indican que no hubo cambios significativos en el peso corporal de los grupos de tratamiento en comparación con los grupos control.

TABLA 36

Medidas de peso corporal en el modelo de xenoinjerto de NSCLC

Día	10	13	18	20	25	28	31	34	38	42	45	48	52
ISIS 481464	18.65	19.44	18.98	19.66	19.40	19.45	19.89	20.26	19.86	20.31	20.13	20.03	20.11
ISIS 481549	18.13	19.06	18.65	19.30	19.31	19.36	19.23	19.18	18.28	17.21	16.49	15.48	15.01
ISIS 347526	18.34	19.29	19.05	19.65	19.63	19.98	20.08	20.69	19.90	20.19	20.25	20.09	20.19

EJEMPLO 23: EFECTO DE ISIS 481464 EN EL TRATAMIENTO DE UN MODELO DE XENOINJERTO DE NSCLC MEDIANTE LG-476

Se inocularon ratones NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ (NSG; JAX #5557), que son inmunodeficientes, con la línea celular de cáncer de pulmón humano a células no pequeñas, LG-476 (Jackson Laboratory) y se trataron con ISIS 481464. Se evaluó el crecimiento tumoral y la reducción del blanco STAT3 en los ratones.

TRATAMIENTO

Se inocularon ratones NSG hembra de entre cuatro y seis semanas de edad por vía subcutánea con células de NSCLC humano LG-476 y se monitorearon tres veces por semana para observaciones clínicas, pesos corporales y volumen de tumor. Una vez que los tumores alcanzaron 1,000 mm^3, se recolectaron los tumores y se fragmentaron. Se implantaron fragmentos de tumor con medida de entre 3 y 5 mm^3 por vía subcutánea en el flanco trasero derecho de 30 ratones NSG. Se monitorearon los ratones tres times a semana. Cuando los tumores individuales alcanzaron un volumen de entre 200 y 250 mm^3, se asignaron los ratones al azar a 2 grupos y se inyectaron con 25 mg/kg de ISIS 481464 o PBS, administrados 5 veces por semana (dosis semanales de 125 mg/kg) durante 3 semanas. Se recolectaron los tumores 24 horas después de la última dosis.

ANÁLISIS DEL ARN

Se prepararon lisados de los tumores usando un instrumento ABI StepOnePlus RT-PCR con un juego de cebadores y sonda específicos para humanos RTS2033. Se midieron los niveles de ARNm del gen estándar interno, ciclofilina, con un juego de cebadores y sonda específicos para humano (cebador directo GACGGCGAGCCCTTGG, designado en la presente como SEQ ID Nº 1526; cebador reverso TGCTGTCTTTGGGACCTTGTC, designado en la presente como SEQ ID Nº 1527; sonda CCGCGTCTCCTTTGAGCTGTTTGC, designada en la presente como SEQ ID Nº 1528). Las diferencias significativas entre los grupos de tratamiento y control se determinaron usando la prueba t de Student de dos colas ($p<0.05$).

El tratamiento con ISIS 481464 resultó en 43% de reducción de los niveles de ARNm de STAT3 en la masa tumoral en comparación con el control con PBS (Figura 8), lo que fue estadísticamente significativo.

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Se prepararon lisados celulares totales homogeneizando el tumor en solución amortiguadora de ensayo de radio inmunoprecipitación (RIPA) enfriada en hielo con cóctel de inhibidores de proteasas. Se analizaron los lisados mediante transferencia western usando anticuerpo anti-STAT3

(Abcam Antibodies, #ab32500). También se marcaron las proteínas estándar interno citocromo oxidasa II (COXII; #ab79393) y survivina (#ab76424). Los niveles de STAT3 se normalizaron a proteína COXII o bien a proteína survivina y se cuantificaron usando ImageJ software.

El tratamiento con ISIS 481464 resultó en 50% de reducción en los niveles de proteína STAT3 en la masa tumoral en comparación con el control con PBS, lo cual fue estadísticamente significativo.

ANÁLISIS DE CRECIMIENTO TUMORAL

Se midieron los tumores regularmente a lo largo del periodo de estudio. El tratamiento con ISIS 481464 resultó en una disminución del volumen tumoral de aproximadamente 39% en comparación con el control con PBS.

EJEMPLO 24: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS PC9

El ISIS 481464, de los estudios que se describieron previamente, se probó además a diferentes dosis en células PC9, una línea de células de carcinoma de pulmón a células no pequeñas. Se plaquearon las células a una densidad de 3,000 células por pocillo. Se incubaron las células con concentraciones de 0.02 μM, 0.1 μM, 0.5 μM, 2.5 μM, y 10.0 μM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 37. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS2033 (secuencia directa GAGGCCCGCCCAACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1520; secuencia reversa TTCTGCTAATGACGTTATCCAGTTTT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1521; secuencia de sonda CTGCCTAGATCGGC, designada en la presente como SEQ ID Nº 1522) se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de beta-actina, un gen estándar interno, según la medida mediante el juego de cebadores y sonda para humano HTS5002 (secuencia directa CGGACTATGACTTAGTTGCGTTACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1529; secuencia reversa GCCATGCCAATCTCATCTTGT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1530; secuencia de sonda CCTTTCTTGACAAAACCTAACTTGCGCAGA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1531). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 37. Como se ilustra en la Tabla 37, el ISIS 481464 fue capaz de penetrar la membrana celular.

TABLA 37

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de STAT3 mediante captación libre de oligonucleótido ISIS en células PC9

ISIS N°	0.02 μM	0.1 μM	0.5 μM	2.5 μM	10.0 μM	IC_{50} (μM)
481464	20	51	84	94	96	0.19

EJEMPLO 25: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS C42B

El ISIS 481464, de los estudios que se describieron previamente, se probó además a diferentes dosis en células C42B, una línea celular de cáncer de próstata. Se plaquearon las células a una densidad de 3,000 células por pocillo. Se incubaron las células con concentraciones de 0.02 μM, 0.1 μM, 0.5 μM, 2.5 μM, y 10.0 μM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 38. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS2033 (secuencia directa GAGGCCCGCCCAACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1520; secuencia reversa TTCTGCTAATGACGTTATCCAGTTTT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1521; secuencia de sonda CTGCCTAGATCGGC, designada en la presente como SEQ ID Nº 1522) se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de beta-actina, un gen estándar

interno, según la medida mediante el juego de cebadores y sonda para humano HTS5002 (secuencia directa CGGACTATGACTTAGTTGCGTTACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1529; secuencia reversa GCCATGCCAATCTCATCTTGT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1530; secuencia de sonda CCTTTCTTGACAAAACCTAACTTGCGCAGA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1531). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 38. Como se ilustra en la Tabla 38, el ISIS 481464 fue capaz de penetrar la membrana celular.

TABLA 38

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de STAT3 mediante captación libre de oligonucleótido ISIS en células C42B

ISIS N°	0.02 µM	0.1 µM	0.5 µM	2.5 µM	10.0 µM	IC_{50} (µM)
481464	21	38	75	87	96	0.45

EJEMPLO 26: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS COLO201

El ISIS 481464, de los estudios que se describieron previamente, se probó además a diferentes dosis en células Colo201, una línea celular de cáncer colorrectal. Se plaquearon las células a una densidad de 3,000 células por pocillo. Se incubaron las células con concentraciones de 0.02 µM, 0.1 µM, 0.5 µM, 2.5 µM, y 10.0 µM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 39. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS2033 (secuencia directa GAGGCCCGCCCAACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1520; secuencia reversa TTCTGCTAATGACGTTATCCAGTTTT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1521; secuencia de sonda CTGCCTAGATCGGC, designada en la presente como SEQ ID Nº 1522) se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron al contenido de beta-actina, un gen estándar interno, según la medida mediante el juego de cebadores y sonda para humano HTS5002 (secuencia directa CGGACTATGACTTAGTTGCGTTACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1529; secuencia reversa GCCATGCCAATCTCATCTTGT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1530; secuencia de sonda CCTTTCTTGACAAAACCTAACTTGCGCAGA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1531). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 39. Como se ilustra en la Tabla 39, ISIS 481464 fue capaz de penetrar la membrana celular.

TABLA 39

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de STAT3 mediante captación libre de oligonucleótido ISIS en células Colo201

ISIS N°	0.02 µM	0.1 µM	0.5 µM	2.5 µM	10.0 µM	IC_{50} (µM)
481464	36	53	81	93	96	0.09

EJEMPLO 27: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS BT474M1

El ISIS 481464, de los estudios que se describieron previamente, se probó además a diferentes dosis en células BT474M1, una línea celular de cáncer de mama. Se plaquearon las células a una densidad de 3,000 células por pocillo. Se incubaron las células con concentraciones de 0.02 µM, 0.1 µM, 0.5 µM, 2.5 µM, y 10.0 µM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 40. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores

para STAT3 humana RTS2033 (secuencia directa GAGGCCCGCCCAACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1520; secuencia reversa TTCTGCTAATGACGTTATCCAGTTTT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1521; secuencia de sonda CTGCCTAGATCGGC, designada en la presente como SEQ ID Nº 1522) se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron al contenido de beta-actina, un gen estándar interno, según la medida mediante el juego de cebadores y sonda para humano HTS5002 (secuencia directa CGGACTATGACTTAGTTGCGTTACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1529; secuencia reversa GCCATGCCAATCTCATCTTGT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1530; secuencia de sonda CCTTTCTTGACAAAACCTAACTTGCGCAGA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1531). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 40. Como se ilustra en la Tabla 40, ISIS 481464 fue capaz de penetrar la membrana celular.

TABLA 40

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de STAT3 mediante captación libre de oligonucleótido ISIS en células BT474M1

ISIS N°	0.02 µM	0.1 µM	0.5 µM	2.5 µM	10.0 µM	IC_{50} (µM)
481464	13	25	74	94	95	0.24

EJEMPLO 28: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS H929

El ISIS 481464, de los estudios que se describieron previamente, se probó además a diferentes dosis en células H929, una línea celular de mieloma múltiple. Se plaquearon las células a una densidad de entre 10,000 y 12,000 células por pocillo. Se incubaron las células con concentraciones de 0.01 µM, 0.5 µM, 2.5 µM, y 10.0 µM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 41. Después de aproximadamente 72 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS2033 (secuencia directa GAGGCCCGCCCAACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1520; secuencia reversa TTCTGCTAATGACGTTATCCAGTTTT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1521; secuencia de sonda CTGCCTAGATCGGC, designada en la presente como SEQ ID Nº 1522) se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron al contenido de beta-actina, un gen estándar interno, según la medida mediante el juego de cebadores y sonda para humano HTS5002 (secuencia directa CGGACTATGACTTAGTTGCGTTACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1529; secuencia reversa GCCATGCCAATCTCATCTTGT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1530; secuencia de sonda CCTTTCTTGACAAAACCTAACTTGCGCAGA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1531). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 41. Como se ilustra en la Tabla 41, ISIS 481464 fue capaz de penetrar la membrana celular.

TABLA 41

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de STAT3 mediante captación libre de oligonucleótido ISIS por células H929

ISIS N°	0.1 µM	0.5 µM	2.5 µM	10.0 µM	IC_{50} (µM)
481464	91	95	95	95	0.04

EJEMPLO 29: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS MM1R

Se ensayó adicionalmente el ISIS 481464, de los estudios que se describieron previamente, a

diferentes dosis en células MM1R, una línea celular de mieloma múltiple. Se plaquearon las células a una densidad de entre 10,000 y 12,000 células por pocillo. Se incubaron las células con concentraciones de 0.01 μM, 0.5 μM, 2.5 μM y 10.0 μM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 42. Después de aproximadamente 72 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS2033 (secuencia directa GAGGCCCGCCCAACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1520; secuencia reversa TTCTGCTAATGACGTTATCCAGTTTT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1521; secuencia de sonda CTGCCTAGATCGGC, designada en la presente como SEQ ID Nº 1522) se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de beta-actina, un gen estándar interno, según la medida por el juego de cebadores y sonda humanos HTS5002 (secuencia directa CGGACTATGACTTAGTTGCGTTACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1529; secuencia reversa GCCATGCCAATCTCATCTTGT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1530; secuencia de sonda CCTTTCTTGACAAAACCTAACTTGCGCAGA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1531). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 42. Como se ilustra en la Tabla 42, el ISIS 481464 fue capaz de penetrar la membrana celular.

TABLA 42

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de STAT3 mediante captación libre de oligonucleótido ISIS por células MM1R

ISIS N°	0.1 μM	0.5 μM	2.5 μM	10.0 μM	IC_{50} (μM)
481464	91	96	95	95	0.04

EJEMPLO 30: EFECTO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO CONTRA STAT3 EN EL TRATAMIENTO DE UN MODELO DE XENOINJERTO DE CÁNCER DE OVARIO SK-OV3

Se inocularon ratones atímicos BALB/c con la línea celular de cáncer ovárico humano, SK-OV3 y se trataron con ISIS 481464 o ISIS 481549. El ISIS 481549 tiene reacción cruzada con la secuencia de ratón (es decir, hibridiza con la secuencia de ratón).

ESTUDIO 1

Se inyectaron células SK-OV3 de cáncer ovárico humano (aproximadamente 100 mm^3) intraperitonealmente en ratones atímicos. Diez días después, los ratones se inocularon por vía subcutánea con 25 mg/kg de ISIS 481464 o ISIS 481549, se administraron dos veces por semana durante 11 semanas. Los ratones se sacrificaron 24 horas después de la última dosis.

ANÁLISIS DE ARN

Los lisados se prepararon con el uso del conjunto de elementos para extracción de ARN (Invitrogen) para el análisis por RT-PCR de los niveles de ARNm de STAT3, usando el juego de cebadores y sonda humanos (RTS2033) y juego de cebadores y sonda de ratón (mSTAT3-LTS0664). Los resultados se presentan en la Tabla 43. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación al control de PBS. Los datos indican que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido ISIS dio como resultado la reducción del ARNm de humano y de ratón de STAT3 en comparación al control de PBS.

TABLA 43

Inhibición porcentual de ARNm de STAT3 en los grupos de tratamiento en relación al control de PBS en el modelo de xenoinjerto de SK-OV3

ISIS N°	STAT3 humana	STAT3 murina
481464	63	0

481549	21	61

ANÁLISIS DE PROTEÍNA

Los lisados se prepararon con solución amortiguada RIPA para análisis por transferencia western de los niveles de proteína STAT3, usando un anticuerpo dirigido contra STAT3 fosforilada (Cell Signaling). Los resultados se presentan en Figura 1. Los datos indican que el tratamiento con ISIS 481549 dio como resultado la reducción de la proteína STAT3 fosforilada en comparación al control de PBS.

ANÁLISIS DEL NIVEL DE IL-6

Los lisados se prepararon con el uso del conjunto de elementos para extracción de ARN (Invitrogen) para análisis por RT-PCR de los niveles de ARNm de IL-6, usando el juego de cebadores y sonda de ratón mIL6-LTS00629. Los resultados se presentan en la Tabla 44. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de IL-6, en relación al control de PBS. Los datos indican que el tratamiento con ISIS 481549 dio como resultado la reducción significativa de ambos ARNm de IL-6 en comparación al control de PBS.

TABLA 44

Inhibición porcentual de ARNm de IL-6 en los grupos de tratamiento en relación al control de PBS en el modelo de xenoinjerto de SK-OV3

ISIS N°	IL-6 (%) murina
481464	8
481549	54

ANÁLISIS DEL PESO DEL TUMOR

Se recolectaron los tumores. Se midió el peso de los tumores y los resultados se presentan en la Tabla 45. Los resultados se presentan como porcentaje del peso del tumor del control con PBS. Los datos indican que el tratamiento con ISIS 481549 dio como resultado la reducción significativa del peso del tumor en comparación al control de PBS.

TABLA 45

Disminución porcentual del peso del tumor en los grupos de tratamiento en relación al control de PBS en el modelo de xenoinjerto de SK-OV3

ISIS N°	Peso (%)
481464	58
481549	89

ESTUDIO 2

Se inocularon células SK-OV3 de cáncer ovárico humano (aproximadamente 100 mm^3) por vía subcutánea en ratones atímicos. Diez días después, los ratones se inocularon intraperitonealmente con 50 mg/kg de ISIS 481464 o 50 mg/kg de ISIS 481464 e ISIS 481549 en combinación, administrado cinco veces por semana durante 6 semanas. Se sacrificaron los ratones 24 horas después de la última dosis.

ANÁLISIS DEL VOLUMEN DEL TUMOR

Los tumores se midieron regularmente usando calibres Vernier y los volúmenes de los tumores se calcularon usando la fórmula, volumen del tumor = ½ (longitud x $ancho^2$). Los resultados se presentan en la Figura 2. Los datos indican que el tratamiento de los ratones con una combinación de ISIS 481464 e ISIS 481549 dio como resultado la inhibición significativa del crecimiento del tumor.

Ejemplo 31: Estudio de tolerabilidad de ISIS 481464 en monos cinomólogos

Se evaluó la eficacia y tolerabilidad de ISIS 481464 en monos cinomólogos.

TRATAMIENTO

Se asignaron monos cinomólogos naïve machos y hembra a cinco grupos de tratamiento. Tres grupos de 5 monos recibieron cada uno dosis de carga de 3 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg cada dos días durante la primera semana del estudio (a los días 1, 3, 5 y 7) seguido luego por administración una vez por semana (comenzando en el día 14). Un grupo control de 5 monos recibieron PBS cada dos días durante la primera semana del estudio (en los días 1, 3, 5 y 7) como la dosis de carga, seguido luego por administración una vez por semana (comenzando en el día 14). Estas dosis se administraron por infusión intravenosa durante una hora (i.v.). Un quinto grupo de 5 monos recibieron dosis de carga de 30 mg/kg administrados por vía subcutánea cada dos días durante la primera semana del estudio (en los días 1, 3, 5 y 7) seguido luego por la administración subcutánea (s.c.) una vez por semana (comenzando en el día 14).

Para las infusiones i.v., los animales se sujetaron, sin sedación, en una silla de sujeción. Se colocó un catéter en una de las venas cefálicas y se infundió una solución de ISIS 481464 en la dosis apropiada a una velocidad constante durante aproximadamente 1 hora usando una bomba de jeringa calibrada (Stoelting Co, EE.UU.). El sitio de dosificación se rotó entre los brazos derecho e izquierdo y el tiempo de dosificación fue registrado. La velocidad de infusión se seleccionó para administrar el volumen de dosis calculado y se monitoreó la precisión de las bombas y se registró para cada dosis. Al final del período de infusión, la solución de dosificación se cambió a PBS. En el caso de la administración s.c., las inyecciones se realizaron con rotación en el sentido de las agujas del reloj en 4 sitios en la espalda. Los sitios de inyección se mantuvieron afeitando periódicamente y por numeración permanente por tatuaje.

Se sacrificaron tres monos de cada grupo en el día 44, que fue aproximadamente 48 horas luego de la última dosis en el día 42. Los otros 2 monos de cada grupo están siendo observados para ver los efectos toxicológicos. Se realizó una eutanasia de los animales por exsanguinación luego de anestesia inducida por quetamina/xilazina y administración de pentobarbital sódico. Los protocolos descritos en el Ejemplo fueron aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

ANÁLISIS DE ARN

Se homogeneizó tejido hepático en 3 mL de solución amortiguada de lisis RLT (Qiagen) suplementada con 1% de 2-mercaptoethanol (Sigma). Se purificó ARN a partir del homogenato resultante usando placas de 96 pocillos de Qiagen RNeasy para purificación de ARN, de acuerdo al protocolo del fabricante. Luego de la purificación, las muestras de ARN se sometieron a análisis por RT-PCR usando un Perkin-Elmer ABI Prism 7700 Sequence Detection System y un juego de sondas cebadores para STAT3 RTS3235 (cebador directo AAGTTTATCTGTGTGACACCAACGA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1532; cebador reverso CTTCACCATTATTTCCAAACTGCAT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1533; sonda TGCCGATGTCCCCCCGCA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1534). Los niveles de ARNm de STAT3 se normalizaron a CiclofilinaA de mono, que se cuantificó usando el juego de cebadores y sonda mk_cycloA_2nd (cebador directo TGCTGGACCCAACACAAATG, designada en la presente como SEQ ID Nº 1535; cebador reverso TGCCATCCAACCACTCAGTC, designada en la presente como SEQ ID Nº 1536; sonda TTCCCAGTTTTTCATCTGCACTGCCAX, designada en la presente como SEQ ID Nº 1537).

El tratamiento con ISIS 481464 a concentraciones de dosis de 30 mg/kg por infusión i.v. o inyección s.c. dio como resultado una reducción estadísticamente significativa en el ARNm de la expresión de STAT3 en hígado (Tabla 46) en comparación al control de PBS. Las diferencias estadísticas entre el tratamiento y los grupos control se determinaron usando la prueba *t* de Student ($p<0.05$).

TABLA 46

Inhibición porcentual de los niveles de ARNm de STAT3 en monos cinomólogos

Tratamiento	% de inhibición
3 mg i.v.	0
10 mg i.v.	7
30 mg i.v.	52
30 mg s.c.	51

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

El tejido hepático se homogeneizó en 1 mL de solución amortiguada RIPA (Sigma) enfriada en hielo que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche). Los lisados totales se separaron por Bis-Tris PAGE (Invitrogen), se transfirieron a una membrana de PVDF y se realizó un Western blot usando anticuerpos primarios para STAT3 (Cell Signaling, #9132) y GAPDH (Advanced Immunochemicals, #06-1-G4-C5). Las bandas inmunoespecíficas se detectaron con el conjunto de elementos para detección Enhanced Chemiluminescence Plus (Amersham Biosciences) luego de la exposición a una placa radiográfica. La intensidad de las bandas luego se escaneó y se cuantificó usando el programa de computación ImageJ. Las diferencias estadísticas entre el tratamiento y los grupos control se determinaron usando la prueba *t* de Student ($p<0.05$).

Se produjo una disminución dependiente de la dosis en los niveles de proteína STAT3, como se muestra en la Tabla 47, con 33% y 82% de reducción a 3 mg/kg/semana y 10 mg/kg/semana respectivamente. La proteína STAT3 no se pudo detectar para 30 mg/kg/semana sin importar la ruta de dosificación.

TABLA 47

Inhibición porcentual de los niveles de proteína STAT3 en monos cinomólogos

Tratamiento	% de inhibición
3 mg i.v.	33
10 mg i.v.	82
30 mg i.v.	100
30 mg s.c.	100

FUNCIÓN HEPÁTICA

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se recolectaron muestras de sangre de todos los grupos de estudio. Las muestras de sangre se recolectaron por medio de venopuntura en el día 44, 48 horas luego de la dosificación. Las muestras de sangre (1 mL) se recolectaron en tubos sin anticoagulante para la separación de suero. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante aproximadamente 60 minutos y luego se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 minutos para obtener suero. Los niveles de diferentes marcadores de la función hepática se midieron usando un analizador para química clínica Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Japón). Los niveles plasmáticos de ALT y AST se midieron y los resultados se presentan en la Tabla 48, expresados en IU/L. Los datos de monos macho y hembra se presentan separadamente. Los resultados indican que el tratamiento con ISIS 481464 no tuvo efecto sobre la función hepática fuera del rango esperado para los oligonucleótidos antisentido.

TABLA 48

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido sobre los marcadores de la función hepática en plasma de monos cinomólogos

	ALT en machos	ALT en hembras	AST en machos	AST en hembras

	(IU/L)	(IU/L)	(IU/L)	(IU/L)
PBS	59	69	83	69
3 mg/kg i.v.	47	56	50	47
10 mg/kg i.v.	56	89	70	60
30 mg/kg i.v.	74	75	60	73
30 mg/kg s.c.	62	78	61	92

FUNCIÓN RENAL

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se recolectaron muestras de sangre de todos los grupos de estudio. Las muestras de sangre se recolectaron por venopuntura femoral en el día 44, 48 horas luego de la dosificación. Las muestras de sangre (1 mL) se recolectaron en tubos sin anticoagulante para la separación de suero. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante aproximadamente 60 minutos y luego se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 minutos para obtener suero. Los niveles de diferentes marcadores de la función renal se midieron usando un analizador para química clínica Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Japón). Los resultados se presentan en la Tabla 49, expresados en mg/dL. Los datos de química en plasma indican que el tratamiento con ISIS 481464 no tuvo ningún efecto sobre la función renal fuera del rango esperado para los oligonucleótidos antisentido.

TABLA 49

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido sobre el BUN plasmático y los niveles de creatinina (mg/dL) en monos cinomólogos

	BUN en machos	BUN en hembras	Creatinina en machos	Creatinina en hembras
PBS	19	30	0.68	0.88
3 mg/kg i.v.	23	28	0.85	0.86
10 mg/kg i.v.	26	27	0.89	0.94
30 mg/kg i.v.	25	26	0.91	0.86
30 mg/kg s.c.	27	28	0.97	0.85

MEDIDAS DEL PESO CORPORAL

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la salud general de los animales, se midieron los pesos corporales y se presentan en las Tablas 50 y 51. Los resultados indican que el efecto del tratamiento con ISIS 481464 sobre los pesos corporales estuvo dentro del rango esperado para los oligonucleótidos antisentido.

TABLA 50

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido sobre los pesos corporales (g) en monos cinomólogos macho

	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35	Día 42
PBS	2523	2463	2484	2471	2509	2523	2551
3 mg/kg i.v.	2604	2564	2594	2572	2589	2654	2687
10 mg/kg i.v.	2603	2453	2581	2561	2591	2633	2655
30 mg/kg i.v.	2608	2583	2613	2644	2668	2713	2776

30 mg/kg s.c.	2533	2441	2470	2521	2554	2609	2619

TABLA 51

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido sobre los pesos corporales (g) en monos cinomólogos hembra

	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35	Día 42
PBS	2266	2252	2276	2237	2362	2365	2373
3 mg/kg i.v.	2253	2242	2283	2250	2346	2350	2377
10 mg/kg i.v.	2293	2277	2318	2254	2358	2387	2361
30 mg/kg i.v.	2259	2261	2289	2268	2368	2412	2406
30 mg/kg s.c.	2293	2275	2322	2281	2385	2389	2394

EJEMPLO 32: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DE STAT3 HUMANA EN CÉLULAS HUVEC

Se diseñaron oligonucleótidos antisentido contra un ácido nucleico de STAT3 y se probaron sus efectos sobre el ARNm de STAT3 *in vitro*. Las células HuVEC cultivadas a una densidad de 5,000 células por pocillo se transfectaron usando el reactivo LipofectAMINE 2000® con 30 nM de oligonucleótido antisentido. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de cebadores y sonda para humano RTS2033 (secuencia directa GAGGCCCGCCCAACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 5; secuencia reversa TTCTGCTAATGACGTTATCCAGTTTT, designada en la presente como SEQ ID Nº 6; secuencia de sonda CTGCCTAGATCGGC, designada en la presente como SEQ ID Nº 7) se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos de las Tablas 52 y 53 se diseñaron como gápmeros 5-10-5 MOE. Los gápmeros tienen 20 nucleósidos de longitud, en donde el segmento espaciador central comprende diez 2'-desoxinucleósidos y está flanqueado a ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por extensiones que comprenden cinco nucleósidos cada uno. Cada nucleósido en el segmento extensión 5' y cada nucleósido en el segmento extensión 3' tiene una modificación 2'-MOE. Las uniones internucleosídicas a lo largo de cada gápmero son uniones fosforotioato (P=S). Todos los residuos de citosina a lo largo de cada gápmero son 5-metilcitosinas. "Sitio de inicio de blanco en humano" indica el nucleósido ubicado más hacia 5' contra el que está dirigido el gápmero en la secuencia génica humana. "Sitio de finalización de blanco en humano" indica el nucleósido ubicado más hacia 3' contra el que está dirigido el gápmero en la secuencia génica humana. Cada gápmero que se lista en la Tabla 52 se dirige contra el ARNm de STAT3 humana, designada en la presente como SEQ ID Nº 1 (No. de Acceso a GENBANK NM_139276.2). Cada gápmero que se lista en la Tabla 53 se dirige contra secuencia genómica de STAT3 humana, designada en la presente como SEQ ID Nº 2 (el complemento del No. de Acceso a GENBANK NT_010755.14 truncado entre los nucleótidos 4185000 a 4264000).

La potencia de los gápmeros fue comparable a ISIS 337332, ISIS 337333, e ISIS 345785, que también son gápmeros 5-10-5 MOE dirigidos contra STAT3 humana y que se describen adicionalmente en USPN 7,307,069.

TABLA 52

Niveles de inhibición del ARNm de STAT3 humana por oligonucleótidos antisentido quiméricos que tienen extensiones 5-10-5 MOE y desoxihuecos contra la SEQ ID Nº 1

ISIS N°	Sitio de inicio en humano	Sitio de finalización en humano	Secuencia	% de inhibición	SEQ ID Nº
337332	1898	1917	GAAGCCCTTGCCAGCCATGT	91	1541
337333	1903	1922	AAGGAGAAGCCCTTGCCAGC	87	1542
345785	2267	2286	TGCCTCCTCCTTGGGAATGT	82	1543
455860	2831	2850	ACACAAGACATTTCCTTTTT	64	1544
455246	3452	3471	CAAGGAGGCTGTTAACTGAA	84	1545
455247	3454	3473	ACCAAGGAGGCTGTTAACTG	78	1546
455248	3456	3475	GCACCAAGGAGGCTGTTAAC	69	1547
455249	3458	3477	AAGCACCAAGGAGGCTGTTA	83	1548
455250	3460	3479	TAAAGCACCAAGGAGGCTGT	77	1549
455251	3462	3481	CTTAAAGCACCAAGGAGGCT	78	1550
455252	3464	3483	TGCTTAAAGCACCAAGGAGG	80	1551
455253	3466	3485	AATGCTTAAAGCACCAAGGA	75	1552
455254	3468	3487	TGAATGCTTAAAGCACCAAG	80	1553
455255	3470	3489	GCTGAATGCTTAAAGCACCA	82	1554
455256	3472	3491	AAGCTGAATGCTTAAAGCAC	67	1555
455257	3474	3493	GGAAGCTGAATGCTTAAAGC	79	1556
455258	3476	3495	AAGGAAGCTGAATGCTTAAA	79	1557

455259	3478	3497	TGAAGGAAGCTGAATGCTTA	72	1558
455260	3480	3499	CCTGAAGGAAGCTGAATGCT	75	1559
455261	3527	3546	TAAGGGTTTGACCTGAAGCC	72	1560
455262	3577	3596	TAAACCTTCCTATTTCAACA	77	1561
455263	3579	3598	CTTAAACCTTCCTATTTCAA	64	1562
455264	3581	3600	TCCTTAAACCTTCCTATTTC	73	1563
455265	3583	3602	TCTCCTTAAACCTTCCTATT	87	1564
455266	3585	3604	ATTCTCCTTAAACCTTCCTA	80	1565
455267	3587	3606	AGATTCTCCTTAAACCTTCC	87	1566
455268	3589	3608	TTAGATTCTCCTTAAACCTT	84	1567
455269	3591	3610	GCTTAGATTCTCCTTAAACC	87	1568
455270	3593	3612	ATGCTTAGATTCTCCTTAAA	87	1569
455271	3595	3614	AAATGCTTAGATTCTCCTTA	89	1570
455272	3597	3616	TAAAATGCTTAGATTCTCCT	88	1571
455273	3639	3658	ATACATTACAAAGGAAAATA	12	1572
455274	3641	3660	CAATACATTACAAAGGAAAA	28	1573
455275	3673	3692	CACCCTCTGCCCAGCCTTAC	63	1574
455276	3675	3694	AGCACCCTCTGCCCAGCCTT	79	1575
455277	3677	3696	TAAGCACCCTCTGCCCAGCC	65	1576
455278	3679	3698	TGTAAGCACCCTCTGCCCAG	62	1577
455279	3681	3700	GTTGTAAGCACCCTCTGCCC	62	1578
455280	3683	3702	AGGTTGTAAGCACCCTCTGC	75	1579

455281	3685	3704	CAAGGTTGTAAGCACCCTCT	83	1580
455282	3687	3706	GTCAAGGTTGTAAGCACCCT	86	1581
455283	3689	3708	GAGTCAAGGTTGTAAGCACC	69	1582
455284	3691	3710	GGGAGTCAAGGTTGTAAGCA	37	1583
455285	3693	3712	AAGGGAGTCAAGGTTGTAAG	56	1584
455286	3695	3714	GAAAGGGAGTCAAGGTTGTA	61	1585
455287	3697	3716	GAGAAAGGGAGTCAAGGTTG	56	1586
455288	3709	3728	ATCAAGTCCAGGGAGAAAGG	55	1587
455289	3711	3730	AGATCAAGTCCAGGGAGAAA	69	1588
455290	3713	3732	GCAGATCAAGTCCAGGGAGA	80	1589
455291	3715	3734	CAGCAGATCAAGTCCAGGGA	90	1590
455292	3717	3736	AACAGCAGATCAAGTCCAGG	77	1591
455293	3719	3738	GAAACAGCAGATCAAGTCCA	81	1592
455294	3721	3740	CTGAAACAGCAGATCAAGTC	75	1593
455295	3723	3742	CTCTGAAACAGCAGATCAAG	76	1594
455296	3725	3744	GCCTCTGAAACAGCAGATCA	74	1595
455297	3727	3746	TAGCCTCTGAAACAGCAGAT	75	1596
455298	3729	3748	CCTAGCCTCTGAAACAGCAG	76	1597
455299	3731	3750	AACCTAGCCTCTGAAACAGC	83	1598
455300	3733	3752	ACAACCTAGCCTCTGAAACA	57	1599
455301	3735	3754	AAACAACCTAGCCTCTGAAA	72	1600
455302	3737	3756	AGAAACAACCTAGCCTCTGA	78	1601

455303	3739	3758	ACAGAAACAACCTAGCCTCT	69	1602
455304	3741	3760	CCACAGAAACAACCTAGCCT	70	1603
455305	3743	3762	ACCCACAGAAACAACCTAGC	80	1604
455306	3745	3764	GCACCCACAGAAACAACCTA	70	1605
455307	3747	3766	AGGCACCCACAGAAACAACC	75	1606
455308	3749	3768	TAAGGCACCCACAGAAACAA	70	1607
455309	3751	3770	GATAAGGCACCCACAGAAAC	65	1608
455310	3753	3772	CTGATAAGGCACCCACAGAA	66	1609
455311	3755	3774	CCCTGATAAGGCACCCACAG	81	1610
455312	3757	3776	AGCCCTGATAAGGCACCCAC	79	1611
455313	3759	3778	CCAGCCCTGATAAGGCACCC	74	1612
455314	3761	3780	TCCCAGCCCTGATAAGGCAC	74	1613
455315	3763	3782	TATCCCAGCCCTGATAAGGC	66	1614
455316	3765	3784	AGTATCCCAGCCCTGATAAG	48	1615
455317	3767	3786	GAAGTATCCCAGCCCTGATA	63	1616
455318	3769	3788	CAGAAGTATCCCAGCCCTGA	82	1617
455319	3771	3790	ATCAGAAGTATCCCAGCCCT	80	1618
455320	3879	3898	GATTCCTAAAACAAACAGGA	37	1619
455321	3881	3900	AGGATTCCTAAAACAAACAG	42	1620
455322	3883	3902	CCAGGATTCCTAAAACAAAC	72	1621
455323	3885	3904	GACCAGGATTCCTAAAACAA	71	1622
455324	3887	3906	GAGACCAGGATTCCTAAAAC	43	1623

455325	3889	3908	CTGAGACCAGGATTCCTAAA	77	1624
455326	3891	3910	TCCTGAGACCAGGATTCCTA	76	1625
455327	3893	3912	GGTCCTGAGACCAGGATTCC	69	1626
455328	3895	3914	GAGGTCCTGAGACCAGGATT	76	1627
455329	3897	3916	ATGAGGTCCTGAGACCAGGA	81	1628
455330	3899	3918	CCATGAGGTCCTGAGACCAG	84	1629
455331	3901	3920	TTCCATGAGGTCCTGAGACC	75	1630
455332	3903	3922	TCTTCCATGAGGTCCTGAGA	75	1631
455333	3905	3924	CTTCTTCCATGAGGTCCTGA	79	1632
455334	3907	3926	CTCTTCTTCCATGAGGTCCT	83	1633
455335	3909	3928	CCCTCTTCTTCCATGAGGTC	74	1634
455336	3911	3930	CCCCCTCTTCTTCCATGAGG	72	1635
455337	3913	3932	CTCCCCCTCTTCTTCCATGA	72	1636
455338	3977	3996	CCTGAGCTCAACCAGACACG	79	1637
455339	3979	3998	TCCCTGAGCTCAACCAGACA	73	1638
455340	3981	4000	ATTCCCTGAGCTCAACCAGA	75	1639
455341	3983	4002	ATATTCCCTGAGCTCAACCA	65	1640
455342	3985	4004	CCATATTCCCTGAGCTCAAC	78	1641
455343	3987	4006	AACCATATTCCCTGAGCTCA	81	1642
455344	3989	4008	AGAACCATATTCCCTGAGCT	77	1643
455345	3991	4010	TAAGAACCATATTCCCTGAG	73	1644
455346	3993	4012	GCTAAGAACCATATTCCCTG	81	1645

455347	4067	4086	TCAGTAAGCCTTTGCCCTGC	79	1646
455348	4069	4088	TATCAGTAAGCCTTTGCCCT	72	1647
455349	4071	4090	TTTATCAGTAAGCCTTTGCC	76	1648
455350	4073	4092	AGTTTATCAGTAAGCCTTTG	84	1649
455351	4075	4094	CAAGTTTATCAGTAAGCCTT	82	1650
455352	4077	4096	CTCAAGTTTATCAGTAAGCC	82	1651
455353	4079	4098	GACTCAAGTTTATCAGTAAG	70	1652
455354	4081	4100	CAGACTCAAGTTTATCAGTA	78	1653
455355	4083	4102	GGCAGACTCAAGTTTATCAG	67	1654
455356	4085	4104	AGGGCAGACTCAAGTTTATC	51	1655
455357	4087	4106	CGAGGGCAGACTCAAGTTTA	54	1656
455358	4089	4108	TACGAGGGCAGACTCAAGTT	56	1657
455359	4091	4110	CATACGAGGGCAGACTCAAG	59	1658
455360	4093	4112	CTCATACGAGGGCAGACTCA	74	1659
455361	4095	4114	CCCTCATACGAGGGCAGACT	67	1660
455362	4122	4141	CAGCCTCAGAGGGAGGCCAG	40	1661
455363	4124	4143	ACCAGCCTCAGAGGGAGGCC	34	1662
455364	4126	4145	TCACCAGCCTCAGAGGGAGG	49	1663
455365	4128	4147	AGTCACCAGCCTCAGAGGGA	50	1664
455366	4225	4244	CCCATACGCACAGGAGAGGC	81	1665
455367	4227	4246	TTCCCATACGCACAGGAGAG	72	1666
455368	4229	4248	TGTTCCCATACGCACAGGAG	80	1667

455369	4231	4250	GGTGTTCCCATACGCACAGG	76	1668
455370	4233	4252	TAGGTGTTCCCATACGCACA	87	1669
455371	4235	4254	GCTAGGTGTTCCCATACGCA	92	1670
455372	4237	4256	GTGCTAGGTGTTCCCATACG	81	1671
455373	4304	4323	GAGGCAAGGTGGTTTTGAGT	55	1672
455374	4306	4325	CTGAGGCAAGGTGGTTTTGA	74	1673
455375	4308	4327	AGCTGAGGCAAGGTGGTTTT	79	1674
455376	4310	4329	TCAGCTGAGGCAAGGTGGTT	80	1675
455377	4312	4331	GATCAGCTGAGGCAAGGTGG	77	1676
455378	4314	4333	CTGATCAGCTGAGGCAAGGT	60	1677
455379	4316	4335	CTCTGATCAGCTGAGGCAAG	74	1678
455380	4318	4337	AACTCTGATCAGCTGAGGCA	77	1679
455381	4320	4339	GAAACTCTGATCAGCTGAGG	78	1680
455382	4322	4341	CAGAAACTCTGATCAGCTGA	78	1681
455383	4360	4379	CAGAGACCAGCTAATTTGAT	69	1682
455384	4362	4381	TTCAGAGACCAGCTAATTTG	78	1683
455385	4364	4383	AATTCAGAGACCAGCTAATT	77	1684
455386	4366	4385	TTAATTCAGAGACCAGCTAA	83	1685
455387	4423	4442	CTCCAGGCAGGAGGACTGGG	79	1686
455388	4425	4444	GTCTCCAGGCAGGAGGACTG	65	1687
455389	4427	4446	CTGTCTCCAGGCAGGAGGAC	57	1688
455390	4429	4448	AACTGTCTCCAGGCAGGAGG	75	1689

455391	4431	4450	TCAACTGTCTCCAGGCAGGA	86	1690
455392	4433	4452	CATCAACTGTCTCCAGGCAG	80	1691
455393	4435	4454	CACATCAACTGTCTCCAGGC	86	1692
455394	4437	4456	GACACATCAACTGTCTCCAG	85	1693
455395	4471	4490	GAAGAGTGTTGCTGGAGAAG	73	1694
455396	4473	4492	CTGAAGAGTGTTGCTGGAGA	78	1695
455397	4475	4494	TACTGAAGAGTGTTGCTGGA	83	1696
455398	4477	4496	TGTACTGAAGAGTGTTGCTG	86	1697
455399	4479	4498	TATGTACTGAAGAGTGTTGC	74	1698
455400	4481	4500	ATTATGTACTGAAGAGTGTT	74	1699
455401	4483	4502	TTATTATGTACTGAAGAGTG	84	1700
455402	4485	4504	GCTTATTATGTACTGAAGAG	84	1701
455403	4487	4506	AAGCTTATTATGTACTGAAG	77	1702
455404	4489	4508	TTAAGCTTATTATGTACTGA	75	1703
455405	4491	4510	AGTTAAGCTTATTATGTACT	81	1704
455406	4493	4512	TCAGTTAAGCTTATTATGTA	58	1705
455407	4495	4514	TATCAGTTAAGCTTATTATG	65	1706
455408	4497	4516	TTTATCAGTTAAGCTTATTA	46	1707
455409	4499	4518	TGTTTATCAGTTAAGCTTAT	68	1708
455410	4501	4520	TCTGTTTATCAGTTAAGCTT	83	1709
455411	4539	4558	AACCCAATGGTAAGCCCAAG	87	1710
455412	4541	4560	TAAACCCAATGGTAAGCCCA	87	1711

455413	4543	4562	TTTAAACCCAATGGTAAGCC	78		1712
455414	4545	4564	GATTTAAACCCAATGGTAAG	31		1713
455415	4547	4566	ATGATTTAAACCCAATGGTA	71		1714
455416	4549	4568	CTATGATTTAAACCCAATGG	67		1715
455417	4551	4570	CCCTATGATTTAAACCCAAT	70		1716
455418	4553	4572	GTCCCTATGATTTAAACCCA	83		1717
455419	4555	4574	AGGTCCCTATGATTTAAACC	64		1718
455420	4589	4608	TATCTGCTCCAGAGAAGCCC	76		1719
455421	4591	4610	AATATCTGCTCCAGAGAAGC	78		1720
455422	4614	4633	CTACCTAAGGCCATGAACTT	74		1721
455423	4616	4635	TGCTACCTAAGGCCATGAAC	82		1722
455424	4618	4637	CATGCTACCTAAGGCCATGA	84		1723
455425	4636	4655	CAGAGTTAAGACCAGATACA	84		1724
455426	4638	4657	ATCAGAGTTAAGACCAGATA	83		1725
455427	4640	4659	CAATCAGAGTTAAGACCAGA	77		1726
455428	4642	4661	TACAATCAGAGTTAAGACCA	81		1727
455429	4644	4663	GCTACAATCAGAGTTAAGAC	86		1728
455430	4646	4665	TTGCTACAATCAGAGTTAAG	85		1729
455431	4648	4667	TTTTGCTACAATCAGAGTTA	85		1730
455432	4650	4669	ACTTTTGCTACAATCAGAGT	73		1731
455433	4652	4671	GAACTTTTGCTACAATCAGA	80		1732
455434	4654	4673	CAGAACTTTTGCTACAATCA	82		1733

455435	4656	4675	CTCAGAACTTTTGCTACAAT	79	1734
455436	4658	4677	CTCTCAGAACTTTTGCTACA	76	1735
455437	4660	4679	TCCTCTCAGAACTTTTGCTA	75	1736
455438	4662	4681	GCTCCTCTCAGAACTTTTGC	85	1737
455439	4664	4683	CAGCTCCTCTCAGAACTTTT	85	1738
455440	4666	4685	CTCAGCTCCTCTCAGAACTT	80	1739
455441	4668	4687	GGCTCAGCTCCTCTCAGAAC	75	1740
455442	4770	4789	GCAACCCACGGGATTCCCTC	82	1741
455443	4772	4791	AAGCAACCCACGGGATTCCC	77	1742
455444	4774	4793	GTAAGCAACCCACGGGATTC	74	1743
455445	4776	4795	AGGTAAGCAACCCACGGGAT	76	1744
455446	4778	4797	GTAGGTAAGCAACCCACGGG	82	1745
455447	4780	4799	AGGTAGGTAAGCAACCCACG	88	1746
455448	4782	4801	ATAGGTAGGTAAGCAACCCA	83	1747
455449	4784	4803	TTATAGGTAGGTAAGCAACC	59	1748
455450	4786	4805	CCTTATAGGTAGGTAAGCAA	65	1749
455451	4788	4807	CACCTTATAGGTAGGTAAGC	62	1750
455452	4790	4809	ACCACCTTATAGGTAGGTAA	57	1751
455453	4792	4811	AAACCACCTTATAGGTAGGT	75	1752
455454	4794	4813	ATAAACCACCTTATAGGTAG	35	1753
455455	4796	4815	TTATAAACCACCTTATAGGT	39	1754
455456	4798	4817	GCTTATAAACCACCTTATAG	58	1755

455457	4800	4819	CAGCTTATAAACCACCTTAT	86	1756
455458	4802	4821	AGCAGCTTATAAACCACCTT	86	1757
455459	4804	4823	ACAGCAGCTTATAAACCACC	80	1758
455460	4806	4825	GGACAGCAGCTTATAAACCA	69	1759
455461	4808	4827	CAGGACAGCAGCTTATAAAC	72	1760
455462	4810	4829	GCCAGGACAGCAGCTTATAA	76	1761
455463	4812	4831	TGGCCAGGACAGCAGCTTAT	89	1762
455464	4814	4833	AGTGGCCAGGACAGCAGCTT	80	1763
455465	4816	4835	GCAGTGGCCAGGACAGCAGC	78	1764
455466	4818	4837	ATGCAGTGGCCAGGACAGCA	85	1765
455467	4820	4839	GAATGCAGTGGCCAGGACAG	80	1766
455468	4822	4841	TTGAATGCAGTGGCCAGGAC	83	1767
455469	4824	4843	ATTTGAATGCAGTGGCCAGG	84	1768
455470	4826	4845	GAATTTGAATGCAGTGGCCA	81	1769
455471	4828	4847	TGGAATTTGAATGCAGTGGC	85	1770
455472	4830	4849	ATTGGAATTTGAATGCAGTG	64	1771
455473	4832	4851	ACATTGGAATTTGAATGCAG	80	1772
455474	4834	4853	ACACATTGGAATTTGAATGC	73	1773
455475	4836	4855	GTACACATTGGAATTTGAAT	80	1774
455476	4838	4857	AAGTACACATTGGAATTTGA	77	1775
455477	4840	4859	TGAAGTACACATTGGAATTT	68	1776
455478	4842	4861	TATGAAGTACACATTGGAAT	66	1777

455479	4844	4863	ACTATGAAGTACACATTGGA	83	1778
455480	4846	4865	ACACTATGAAGTACACATTG	76	1779
455481	4848	4867	TTACACTATGAAGTACACAT	78	1780
455482	4850	4869	TTTTACACTATGAAGTACAC	76	1781
455483	4852	4871	ATTTTTACACTATGAAGTAC	60	1782
455484	4854	4873	AAATTTTTACACTATGAAGT	35	1783
455485	4856	4875	ATAAATTTTTTACACTATGAA	9	1784
455486	4858	4877	ATATAAATTTTTTACACTATG	0	1785
455487	4860	4879	TAATATAAATTTTTTACACTA	21	1786
455488	4862	4881	AATAATATAAATTTTTTACAC	10	1787
455489	4864	4883	ACAATAATATAAATTTTTTAC	7	1788
455490	4925	4944	AGTTAAAGTAGATACAGCAA	71	1789
455491	4927	4946	GAAGTTAAAGTAGATACAGC	63	1790
455492	4929	4948	TGGAAGTTAAAGTAGATACA	69	1791
455493	4931	4950	TCTGGAAGTTAAAGTAGATA	65	1792
455494	4933	4952	TTTCTGGAAGTTAAAGTAGA	55	1793
455495	4935	4954	TATTTCTGGAAGTTAAAGTA	57	1794
455496	4937	4956	TTTATTTCTGGAAGTTAAAG	36	1795
455497	4939	4958	CGTTTATTTCTGGAAGTTAA	77	1796

TABLA 53

Niveles de inhibición del ARNm de STAT3 humana por oligonucleótidos antisentido quiméricos que tienen extensiones 5-10-5 MOE y desoxihuecos contra la SEQ ID Nº 2

ISIS N°	Sitio de inicio en Humano	Sitio de Finalización en Humano	Secuencia	% de inhibición	SEQ ID Nº
455498	917	936	CACGCCGTCATGCATAATTC	0	1797
455499	919	938	GGCACGCCGTCATGCATAAT	0	1798
455500	940	959	GCCCAGCCCCAGCCTGGCCG	35	1799
455501	962	981	ACAGCCCCTTCAGCCAATCC	15	1800
455502	964	983	TTACAGCCCCTTCAGCCAAT	14	1801
455503	966	985	AATTACAGCCCCTTCAGCCA	28	1802
455504	968	987	TGAATTACAGCCCCTTCAGC	6	1803
455505	970	989	GCTGAATTACAGCCCCTTCA	15	1804
455506	972	991	CCGCTGAATTACAGCCCCTT	4	1805
455507	974	993	AACCGCTGAATTACAGCCCC	8	1806
455508	976	995	GAAACCGCTGAATTACAGCC	16	1807
455509	978	997	CGGAAACCGCTGAATTACAG	24	1808
455510	980	999	TCCGGAAACCGCTGAATTAC	12	1809
455511	982	1001	GCTCCGGAAACCGCTGAATT	15	1810
455512	984	1003	CAGCTCCGGAAACCGCTGAA	23	1811
455513	986	1005	CGCAGCTCCGGAAACCGCTG	4	1812
455514	988	1007	GCCGCAGCTCCGGAAACCGC	13	1813

455515	1378	1397	AGTCCCTTCCGAGGCCCGCT	81	1814
455516	1408	1427	CGAAGAACGAAACTTCCCTC	68	1815
455517	1697	1716	CAGACACACCTATTCCTGCC	82	1816
455518	1748	1767	TTATGCAATAAAGCCTACCC	70	1817
455519	1795	1814	TTAGAAAGAGTACCGGTCTG	75	1818
455520	1987	2006	AATGGCTCAATTATTTATCT	59	1819
455521	2083	2102	TTTACCCAAGATCTTGGCTC	76	1820
455522	2175	2194	ACTTCAGTGCAACCACACCC	70	1821
455523	2205	2224	CCAACTTGGGCGACGGTTTG	67	1822
455524	2281	2300	CTAACCACTGATTTTGTCAC	56	1823
455525	2316	2335	GTACACACTATACACATTTT	85	1824
455526	2346	2365	CTTTAGTTGCACATACAGTA	80	1825
455527	2383	2402	GCCAAAAATTTACAACCCAT	86	1826
455528	2413	2432	TTCAAGCCCAATGCTTTATC	76	1827
455529	2561	2580	CTGGAACATGTAATAAGGAA	71	1828
455530	2669	2688	AGAGACTAAAATCAAGGCTC	87	1829
455531	2900	2919	TAGACTCTAGACCCAATTCC	77	1830
455532	3780	3799	GAAATGACCACTGATCAAGC	74	1831
455533	3867	3886	AAGTTGGTCACCACCTCTAC	81	1832
455534	4291	4310	AACTTATTCTTCATAGCAAC	58	1833
455535	4587	4606	TATTTGGGACCCAGTTGAAA	60	1834
455536	5000	5019	AGAACTGAAATTCCTTGGTC	88	1835

455537	5030	5049	AAGTTTTAAAAGCTTCCCCT	76	1836
455538	5554	5573	TCACCCAAAGTACCAAATCA	71	1837
455539	5667	5686	CAAAAGTTATGGTGAAATTT	44	1838
455540	5699	5718	AAGTACTCTTTCAGTGGTTT	88	1839
455541	6844	6863	AATTAAAGAGTTGCGGTAAT	68	1840
455542	6926	6945	GTTTCATGAAAACGGACAAT	78	1841
455543	7050	7069	AGGATTCAGTCCCAGATCTG	18	1842
455544	7282	7301	TCAATAATGATGACTTTCTC	72	1843
455545	7528	7547	TTAAACCCAATTATTAACAG	45	1844
455546	7624	7643	GTAAAACACACATTTTATAT	62	1845
455547	7682	7701	GTAAACAGAAAGGGCTGCAA	86	1846
455548	8078	8097	GGGCAGATTTACCTTCCTTA	89	1847
455549	8126	8145	GGGTAGCAGGAAGGAAAGCC	80	1848
455550	8214	8233	AATATAAGTTCTTTGGCTGA	60	1849
455551	8244	8263	TACAATAGCAATCACCTTAG	89	1850
455552	8284	8303	CCATGAAACCCTCAAACATA	75	1851
337332	66135	66154	GAAGCCCTTGCCAGCCATGT	91	1541
337333	66140	66159	AAGGAGAAGCCCTTGCCAGC	87	1542
345785	67129	67148	TGCCTCCTCCTTGGGAATGT	82	1543
455246	74639	74658	CAAGGAGGCTGTTAACTGAA	84	1545
455247	74641	74660	ACCAAGGAGGCTGTTAACTG	78	1546
455248	74643	74662	GCACCAAGGAGGCTGTTAAC	69	1547

455249	74645	74664	AAGCACCAAGGAGGCTGTTA	83	1548
455250	74647	74666	TAAAGCACCAAGGAGGCTGT	77	1549
455251	74649	74668	CTTAAAGCACCAAGGAGGCT	78	1550
455252	74651	74670	TGCTTAAAGCACCAAGGAGG	80	1551
455253	74653	74672	AATGCTTAAAGCACCAAGGA	75	1552
455254	74655	74674	TGAATGCTTAAAGCACCAAG	80	1553
455255	74657	74676	GCTGAATGCTTAAAGCACCA	82	1554
455256	74659	74678	AAGCTGAATGCTTAAAGCAC	67	1555
455257	74661	74680	GGAAGCTGAATGCTTAAAGC	79	1556
455258	74663	74682	AAGGAAGCTGAATGCTTAAA	79	1557
455259	74665	74684	TGAAGGAAGCTGAATGCTTA	72	1558
455260	74667	74686	CCTGAAGGAAGCTGAATGCT	75	1559
455261	74714	74733	TAAGGGTTTGACCTGAAGCC	72	1560
455262	74764	74783	TAAACCTTCCTATTTCAACA	77	1561
455263	74766	74785	CTTAAACCTTCCTATTTCAA	64	1562
455264	74768	74787	TCCTTAAACCTTCCTATTTC	73	1563
455265	74770	74789	TCTCCTTAAACCTTCCTATT	87	1564
455266	74772	74791	ATTCTCCTTAAACCTTCCTA	80	1565
455267	74774	74793	AGATTCTCCTTAAACCTTCC	87	1566
455268	74776	74795	TTAGATTCTCCTTAAACCTT	84	1567
455269	74778	74797	GCTTAGATTCTCCTTAAACC	87	1568
455270	74780	74799	ATGCTTAGATTCTCCTTAAA	87	1569

455271	74782	74801	AAATGCTTAGATTCTCCTTA	89	1570
455272	74784	74803	TAAAATGCTTAGATTCTCCT	88	1571
455273	74826	74845	ATACATTACAAAGGAAAATA	12	1572
455274	74828	74847	CAATACATTACAAAGGAAAA	28	1573
455275	74860	74879	CACCCTCTGCCCAGCCTTAC	63	1574
455276	74862	74881	AGCACCCTCTGCCCAGCCTT	79	1575
455277	74864	74883	TAAGCACCCTCTGCCCAGCC	65	1576
455278	74866	74885	TGTAAGCACCCTCTGCCCAG	62	1577
455279	74868	74887	GTTGTAAGCACCCTCTGCCC	62	1578
455280	74870	74889	AGGTTGTAAGCACCCTCTGC	75	1579
455281	74872	74891	CAAGGTTGTAAGCACCCTCT	83	1580
455282	74874	74893	GTCAAGGTTGTAAGCACCCT	86	1581
455283	74876	74895	GAGTCAAGGTTGTAAGCACC	69	1582
455284	74878	74897	GGGAGTCAAGGTTGTAAGCA	37	1583
455285	74880	74899	AAGGGAGTCAAGGTTGTAAG	56	1584
455286	74882	74901	GAAAGGGAGTCAAGGTTGTA	61	1585
455287	74884	74903	GAGAAAGGGAGTCAAGGTTG	56	1586
455288	74896	74915	ATCAAGTCCAGGGAGAAAGG	55	1587
455289	74898	74917	AGATCAAGTCCAGGGAGAAA	69	1588
455290	74900	74919	GCAGATCAAGTCCAGGGAGA	80	1589
455291	74902	74921	CAGCAGATCAAGTCCAGGGA	90	1590
455292	74904	74923	AACAGCAGATCAAGTCCAGG	77	1591

455293	74906	74925	GAAACAGCAGATCAAGTCCA	81	1592
455294	74908	74927	CTGAAACAGCAGATCAAGTC	75	1593
455295	74910	74929	CTCTGAAACAGCAGATCAAG	76	1594
455296	74912	74931	GCCTCTGAAACAGCAGATCA	74	1595
455297	74914	74933	TAGCCTCTGAAACAGCAGAT	75	1596
455298	74916	74935	CCTAGCCTCTGAAACAGCAG	76	1597
455299	74918	74937	AACCTAGCCTCTGAAACAGC	83	1598
455300	74920	74939	ACAACCTAGCCTCTGAAACA	57	1599
455301	74922	74941	AAACAACCTAGCCTCTGAAA	72	1600
455302	74924	74943	AGAAACAACCTAGCCTCTGA	78	1601
455303	74926	74945	ACAGAAACAACCTAGCCTCT	69	1602
455304	74928	74947	CCACAGAAACAACCTAGCCT	70	1603
455305	74930	74949	ACCCACAGAAACAACCTAGC	80	1604
455306	74932	74951	GCACCCACAGAAACAACCTA	70	1605
455307	74934	74953	AGGCACCCACAGAAACAACC	75	1606
455308	74936	74955	TAAGGCACCCACAGAAACAA	70	1607
455309	74938	74957	GATAAGGCACCCACAGAAAC	65	1608
455310	74940	74959	CTGATAAGGCACCCACAGAA	66	1609
455311	74942	74961	CCCTGATAAGGCACCCACAG	81	1610
455312	74944	74963	AGCCCTGATAAGGCACCCAC	79	1611
455313	74946	74965	CCAGCCCTGATAAGGCACCC	74	1612
455314	74948	74967	TCCCAGCCCTGATAAGGCAC	74	1613

455315	74950	74969	TATCCCAGCCCTGATAAGGC	66	1614
455316	74952	74971	AGTATCCCAGCCCTGATAAG	48	1615
455317	74954	74973	GAAGTATCCCAGCCCTGATA	63	1616
455318	74956	74975	CAGAAGTATCCCAGCCCTGA	82	1617
455319	74958	74977	ATCAGAAGTATCCCAGCCCT	80	1618
455320	75066	75085	GATTCCTAAAACAAACAGGA	37	1619
455321	75068	75087	AGGATTCCTAAAACAAACAG	42	1620
455322	75070	75089	CCAGGATTCCTAAAACAAAC	72	1621
455323	75072	75091	GACCAGGATTCCTAAAACAA	71	1622
455324	75074	75093	GAGACCAGGATTCCTAAAAC	43	1623
455325	75076	75095	CTGAGACCAGGATTCCTAAA	77	1624
455326	75078	75097	TCCTGAGACCAGGATTCCTA	76	1625
455327	75080	75099	GGTCCTGAGACCAGGATTCC	69	1626
455328	75082	75101	GAGGTCCTGAGACCAGGATT	76	1627
455329	75084	75103	ATGAGGTCCTGAGACCAGGA	81	1628
455330	75086	75105	CCATGAGGTCCTGAGACCAG	84	1629
455331	75088	75107	TTCCATGAGGTCCTGAGACC	75	1630
455332	75090	75109	TCTTCCATGAGGTCCTGAGA	75	1631
455333	75092	75111	CTTCTTCCATGAGGTCCTGA	79	1632
455334	75094	75113	CTCTTCTTCCATGAGGTCCT	83	1633
455335	75096	75115	CCCTCTTCTTCCATGAGGTC	74	1634
455336	75098	75117	CCCCCTCTTCTTCCATGAGG	72	1635

455337	75100	75119	CTCCCCCTCTTCTTCCATGA	72	1636
455338	75164	75183	CCTGAGCTCAACCAGACACG	79	1637
455339	75166	75185	TCCCTGAGCTCAACCAGACA	73	1638
455340	75168	75187	ATTCCCTGAGCTCAACCAGA	75	1639
455341	75170	75189	ATATTCCCTGAGCTCAACCA	65	1640
455342	75172	75191	CCATATTCCCTGAGCTCAAC	78	1641
455343	75174	75193	AACCATATTCCCTGAGCTCA	81	1642
455344	75176	75195	AGAACCATATTCCCTGAGCT	77	1643
455345	75178	75197	TAAGAACCATATTCCCTGAG	73	1644
455346	75180	75199	GCTAAGAACCATATTCCCTG	81	1645
455347	75254	75273	TCAGTAAGCCTTTGCCCTGC	79	1646
455348	75256	75275	TATCAGTAAGCCTTTGCCCT	72	1647
455349	75258	75277	TTTATCAGTAAGCCTTTGCC	76	1648
455350	75260	75279	AGTTTATCAGTAAGCCTTTG	84	1649
455351	75262	75281	CAAGTTTATCAGTAAGCCTT	82	1650
455352	75264	75283	CTCAAGTTTATCAGTAAGCC	82	1651
455353	75266	75285	GACTCAAGTTTATCAGTAAG	70	1652
455354	75268	75287	CAGACTCAAGTTTATCAGTA	78	1653
455355	75270	75289	GGCAGACTCAAGTTTATCAG	67	1654
455356	75272	75291	AGGGCAGACTCAAGTTTATC	51	1655
455357	75274	75293	CGAGGGCAGACTCAAGTTTA	54	1656
455358	75276	75295	TACGAGGGCAGACTCAAGTT	56	1657

455359	75278	75297	CATACGAGGGCAGACTCAAG	59	1658
455360	75280	75299	CTCATACGAGGGCAGACTCA	74	1659
455361	75282	75301	CCCTCATACGAGGGCAGACT	67	1660
455362	75309	75328	CAGCCTCAGAGGGAGGCCAG	40	1661
455363	75311	75330	ACCAGCCTCAGAGGGAGGCC	34	1662
455364	75313	75332	TCACCAGCCTCAGAGGGAGG	49	1663
455365	75315	75334	AGTCACCAGCCTCAGAGGGA	50	1664
455366	75412	75431	CCCATACGCACAGGAGAGGC	81	1665
455367	75414	75433	TTCCCATACGCACAGGAGAG	72	1666
455368	75416	75435	TGTTCCCATACGCACAGGAG	80	1667
455369	75418	75437	GGTGTTCCCATACGCACAGG	76	1668
455370	75420	75439	TAGGTGTTCCCATACGCACA	87	1669
455371	75422	75441	GCTAGGTGTTCCCATACGCA	92	1670
455372	75424	75443	GTGCTAGGTGTTCCCATACG	81	1671
455373	75491	75510	GAGGCAAGGTGGTTTTGAGT	55	1672
455374	75493	75512	CTGAGGCAAGGTGGTTTTGA	74	1673
455375	75495	75514	AGCTGAGGCAAGGTGGTTTT	79	1674
455376	75497	75516	TCAGCTGAGGCAAGGTGGTT	80	1675
455377	75499	75518	GATCAGCTGAGGCAAGGTGG	77	1676
455378	75501	75520	CTGATCAGCTGAGGCAAGGT	60	1677
455379	75503	75522	CTCTGATCAGCTGAGGCAAG	74	1678
455380	75505	75524	AACTCTGATCAGCTGAGGCA	77	1679

455381	75507	75526	GAAACTCTGATCAGCTGAGG	78	1680
455382	75509	75528	CAGAAACTCTGATCAGCTGA	78	1681
455383	75547	75566	CAGAGACCAGCTAATTTGAT	69	1682
455384	75549	75568	TTCAGAGACCAGCTAATTTG	78	1683
455385	75551	75570	AATTCAGAGACCAGCTAATT	77	1684
455386	75553	75572	TTAATTCAGAGACCAGCTAA	83	1685
455387	75610	75629	CTCCAGGCAGGAGGACTGGG	79	1686
455388	75612	75631	GTCTCCAGGCAGGAGGACTG	65	1687
455389	75614	75633	CTGTCTCCAGGCAGGAGGAC	57	1688
455390	75616	75635	AACTGTCTCCAGGCAGGAGG	75	1689
455391	75618	75637	TCAACTGTCTCCAGGCAGGA	86	1690
455392	75620	75639	CATCAACTGTCTCCAGGCAG	80	1691
455393	75622	75641	CACATCAACTGTCTCCAGGC	86	1692
455394	75624	75643	GACACATCAACTGTCTCCAG	85	1693
455395	75658	75677	GAAGAGTGTTGCTGGAGAAG	73	1694
455396	75660	75679	CTGAAGAGTGTTGCTGGAGA	78	1695
455397	75662	75681	TACTGAAGAGTGTTGCTGGA	83	1696
455398	75664	75683	TGTACTGAAGAGTGTTGCTG	86	1697
455399	75666	75685	TATGTACTGAAGAGTGTTGC	74	1698
455400	75668	75687	ATTATGTACTGAAGAGTGTT	74	1699
455401	75670	75689	TTATTATGTACTGAAGAGTG	84	1700
455402	75672	75691	GCTTATTATGTACTGAAGAG	84	1701

455403	75674	75693	AAGCTTATTATGTACTGAAG	77	1702
455404	75676	75695	TTAAGCTTATTATGTACTGA	75	1703
455405	75678	75697	AGTTAAGCTTATTATGTACT	81	1704
455406	75680	75699	TCAGTTAAGCTTATTATGTA	58	1705
455407	75682	75701	TATCAGTTAAGCTTATTATG	65	1706
455408	75684	75703	TTTATCAGTTAAGCTTATTA	46	1707
455409	75686	75705	TGTTTATCAGTTAAGCTTAT	68	1708
455410	75688	75707	TCTGTTTATCAGTTAAGCTT	83	1709
455411	75726	75745	AACCCAATGGTAAGCCCAAG	87	1710
455412	75728	75747	TAAACCCAATGGTAAGCCCA	87	1711
455413	75730	75749	TTTAAACCCAATGGTAAGCC	78	1712
455414	75732	75751	GATTTAAACCCAATGGTAAG	31	1713
455415	75734	75753	ATGATTTAAACCCAATGGTA	71	1714
455416	75736	75755	CTATGATTTAAACCCAATGG	67	1715
455417	75738	75757	CCCTATGATTTAAACCCAAT	70	1716
455418	75740	75759	GTCCCTATGATTTAAACCCA	83	1717
455419	75742	75761	AGGTCCCTATGATTTAAACC	64	1718
455420	75776	75795	TATCTGCTCCAGAGAAGCCC	76	1719
455421	75778	75797	AATATCTGCTCCAGAGAAGC	78	1720
455422	75801	75820	CTACCTAAGGCCATGAACTT	74	1721
455423	75803	75822	TGCTACCTAAGGCCATGAAC	82	1722
455424	75805	75824	CATGCTACCTAAGGCCATGA	84	1723

455425	75823	75842	CAGAGTTAAGACCAGATACA	84	1724
455426	75825	75844	ATCAGAGTTAAGACCAGATA	83	1725
455427	75827	75846	CAATCAGAGTTAAGACCAGA	77	1726
455428	75829	75848	TACAATCAGAGTTAAGACCA	81	1727
455429	75831	75850	GCTACAATCAGAGTTAAGAC	86	1728
455430	75833	75852	TTGCTACAATCAGAGTTAAG	85	1729
455431	75835	75854	TTTTGCTACAATCAGAGTTA	85	1730
455432	75837	75856	ACTTTTGCTACAATCAGAGT	73	1731
455433	75839	75858	GAACTTTTGCTACAATCAGA	80	1732
455434	75841	75860	CAGAACTTTTGCTACAATCA	82	1733
455435	75843	75862	CTCAGAACTTTTGCTACAAT	79	1734
455436	75845	75864	CTCTCAGAACTTTTGCTACA	76	1735
455437	75847	75866	TCCTCTCAGAACTTTTGCTA	75	1736
455438	75849	75868	GCTCCTCTCAGAACTTTTGC	85	1737
455439	75851	75870	CAGCTCCTCTCAGAACTTTT	85	1738
455440	75853	75872	CTCAGCTCCTCTCAGAACTT	80	1739
455441	75855	75874	GGCTCAGCTCCTCTCAGAAC	75	1740
455442	75957	75976	GCAACCCACGGGATTCCCTC	82	1741
455443	75959	75978	AAGCAACCCACGGGATTCCC	77	1742
455444	75961	75980	GTAAGCAACCCACGGGATTC	74	1743
455445	75963	75982	AGGTAAGCAACCCACGGGAT	76	1744
455446	75965	75984	GTAGGTAAGCAACCCACGGG	82	1745

455447	75967	75986	AGGTAGGTAAGCAACCCACG	88	1746
455448	75969	75988	ATAGGTAGGTAAGCAACCCA	83	1747
455449	75971	75990	TTATAGGTAGGTAAGCAACC	59	1748
455450	75973	75992	CCTTATAGGTAGGTAAGCAA	65	1749
455451	75975	75994	CACCTTATAGGTAGGTAAGC	62	1750
455452	75977	75996	ACCACCTTATAGGTAGGTAA	57	1751
455453	75979	75998	AAACCACCTTATAGGTAGGT	75	1752
455454	75981	76000	ATAAACCACCTTATAGGTAG	35	1753
455455	75983	76002	TTATAAACCACCTTATAGGT	39	1754
455456	75985	76004	GCTTATAAACCACCTTATAG	58	1755
455457	75987	76006	CAGCTTATAAACCACCTTAT	86	1756
455458	75989	76008	AGCAGCTTATAAACCACCTT	86	1757
455459	75991	76010	ACAGCAGCTTATAAACCACC	80	1758
455460	75993	76012	GGACAGCAGCTTATAAACCA	69	1759
455461	75995	76014	CAGGACAGCAGCTTATAAAC	72	1760
455462	75997	76016	GCCAGGACAGCAGCTTATAA	76	1761
455463	75999	76018	TGGCCAGGACAGCAGCTTAT	89	1762
455464	76001	76020	AGTGGCCAGGACAGCAGCTT	80	1763
455465	76003	76022	GCAGTGGCCAGGACAGCAGC	78	1764
455466	76005	76024	ATGCAGTGGCCAGGACAGCA	85	1765
455467	76007	76026	GAATGCAGTGGCCAGGACAG	80	1766
455468	76009	76028	TTGAATGCAGTGGCCAGGAC	83	1767

455469	76011	76030	ATTTGAATGCAGTGGCCAGG	84	1768
455470	76013	76032	GAATTTGAATGCAGTGGCCA	81	1769
455471	76015	76034	TGGAATTTGAATGCAGTGGC	85	1770
455472	76017	76036	ATTGGAATTTGAATGCAGTG	64	1771
455473	76019	76038	ACATTGGAATTTGAATGCAG	80	1772
455474	76021	76040	ACACATTGGAATTTGAATGC	73	1773
455475	76023	76042	GTACACATTGGAATTTGAAT	80	1774
455476	76025	76044	AAGTACACATTGGAATTTGA	77	1775
455477	76027	76046	TGAAGTACACATTGGAATTT	68	1776
455478	76029	76048	TATGAAGTACACATTGGAAT	66	1777
455479	76031	76050	ACTATGAAGTACACATTGGA	83	1778
455480	76033	76052	ACACTATGAAGTACACATTG	76	1779
455481	76035	76054	TTACACTATGAAGTACACAT	78	1780
455482	76037	76056	TTTTACACTATGAAGTACAC	76	1781
455483	76039	76058	ATTTTTACACTATGAAGTAC	60	1782
455484	76041	76060	AAATTTTTACACTATGAAGT	35	1783
455485	76043	76062	ATAAATTTTTTACACTATGAA	9	1784
455486	76045	76064	ATATAAATTTTTTACACTATG	0	1785
455487	76047	76066	TAATATAAATTTTTTACACTA	21	1786
455488	76049	76068	AATAATATAAATTTTTTACAC	10	1787
455489	76051	76070	ACAATAATATAAATTTTTTAC	7	1788
455490	76112	76131	AGTTAAAGTAGATACAGCAA	71	1789

455491	76114	76133	GAAGTTAAAGTAGATACAGC	63	1790
455492	76116	76135	TGGAAGTTAAAGTAGATACA	69	1791
455493	76118	76137	TCTGGAAGTTAAAGTAGATA	65	1792
455494	76120	76139	TTTCTGGAAGTTAAAGTAGA	55	1793
455495	76122	76141	TATTTCTGGAAGTTAAAGTA	57	1794
455496	76124	76143	TTTATTTCTGGAAGTTAAAG	36	1795
455497	76126	76145	CGTTTATTTCTGGAAGTTAA	77	1796
455553	9123	9142	ACCTGCCCCCTATGTATAAGC	89	1852
	11261	11280			
455554	9484	9503	TTTGTAATATCTAACAGATA	20	1853
455555	9630	9649	TATATGACAGCCTCAATTTC	68	1854
455556	9677	9696	GGCATTTGTGTAAACAGGAA	81	1855
455557	9746	9765	TGTTAAATATTACTTAAAAT	4	1856
455558	9776	9795	AATTCCTTGGGTGGTAATCC	81	1857
455559	10071	10090	GGAAAGTTACAGGACAGGAA	77	1858
455560	10352	10371	GAAATGGCTTCTACAAAAAC	47	1859
455561	10472	10491	GGTCAGAATACCACAAACTA	80	1860
455562	10634	10653	AGTCTAATGCTTTTAGATTC	59	1861
455563	11567	11586	CATTGGAAAACTTAGGGTAA	37	1862
455564	11597	11616	ATTCTCACTGGGTATAGAGG	72	1863
455565	11700	11719	TAGCATTAATCTTTCCTAGG	92	1864
455566	9886	9905	GACTCAAAATAAGGTTCCTC	86	1865

	12369	12388			
455567	12430	12449	ACAGATTTATTCATATAAGC	62	1866
455568	14060	14079	AGATCCATAGATTCTTTCTT	80	1867
455569	14129	14148	ATCTGAATCAGAATATCTGC	88	1868
455570	14190	14209	GAAGACTTTATATTCTATGG	59	1869
455571	14355	14374	TATCCTTAATATTCAGGTAC	82	1870
455572	14501	14520	TTATTAAGACATCTGAAATA	31	1871
455573	14701	14720	TTAAGTGACTACACATGGAT	76	1872
455574	14761	14780	GATAATGTAACAACCCTATC	42	1873
455575	14828	14847	CTGAAGCATGAATTCACATT	83	1874
455576	15316	15335	AAATTCCACTACTCATGAAA	62	1875
455577	15370	15389	CTTCAGAGAATATCTCATTT	83	1876
455578	15400	15419	CACATCATAGTTTTGCATGA	70	1877
455579	15525	15544	TCTGACCCATAAAGTTTAAA	70	1878
455580	16568	16587	TTGGTTAATAATAATGTATC	44	1879
455581	16832	16851	TCACACATTTGTCAAAATCC	89	1880
455582	16863	16882	TATATAATTGTGTACTGGCA	93	1881
455583	16930	16949	TGCCAGTGGTTCAGCAGAGG	77	1882
455584	17215	17234	AATGTTTATAGCAGCTTTAT	56	1883
455585	17330	17349	GTCACTTTGAATATAGTTTG	79	1884
455586	17426	17445	GGCTAAAATCCAAAACACTG	65	1885
455587	18449	18468	AACAGTATTTGAGAAAACTT	21	1886

455588	19883	19902	GGGCTACAACTCAATAACAA	63	1887
455589	20512	20531	AAGTCCTTATCATTTAGCTC	69	1888
455590	21035	21054	GATATTCCCAAAGTGACAGG	75	1889
455591	21188	21207	ATAATGAGACTTTAGCACTC	86	1890
455592	21422	21441	AATCTAAACTTCCAGCCAGG	78	1891
455593	21493	21512	ACAATAATGCATGCAAATGT	67	1892
455594	21675	21694	CACTGCTATTTCCCCAGCAA	89	1893
455595	21710	21729	CTTAAGCCCCATAAGAACAA	65	1894
455596	21823	21842	ATCTAAAACAGCAACATCTC	57	1895
455597	23917	23936	TAGTGATTGAATGTAGACTT	81	1896
455598	23980	23999	TTAGGCCACTAAGTCTGAGC	83	1897
455599	24178	24197	CAGCTGAAATCAGCCTTTGA	69	1898
455600	24345	24364	AATCTAGCTAAGTCCATAAC	43	1899
455601	24504	24523	TGCTTGGATATATAGAAGTC	80	1900
455602	24578	24597	AGGTCACTTTCCCTATACGA	81	1901
455603	24608	24627	AGAAGGAAGATTCTTTTCTC	73	1902
455604	24924	24943	CTAAGAGAGGGCAACTGAAAT	60	1903
455605	25063	25082	GGCTCGAGGGCCACTGAAGG	59	1904
455606	25093	25112	AGCAAGCACATTGTCATGTC	83	1905
455607	25132	25151	GGCTGCCAAACTTTTCAAAA	76	1906
455608	25626	25645	TTTGTTCTTGCCTAAAATGC	45	1907
455609	25688	25707	TTCCTTCAAGTCAACTTATC	69	1908

455610	26031	26050	CCAGCCTACAGATGACTTTC	78	1909
455611	26061	26080	GCCAACTTTAGCCCCTTCCA	85	1910
455612	26104	26123	AATGCAAAATCTTTACCCTT	58	1911
455613	26139	26158	CCAGCTCAAAAACACACACT	80	1912
455614	26227	26246	GTTTGAAAAATTCAAGAATG	26	1913
455615	26388	26407	ATAGTGTCTGGCTCATAATA	48	1914
455616	26597	26616	TCAGGTCCTCAAAAACACCA	84	1915
455617	26648	26667	TGGCTGGTACCAGCTGGTGG	76	1916
455618	26766	26785	ACAAATTCATCGAGCTAATG	52	1917
455619	26908	26927	AGAATAGCATGGATTTGAAT	49	1918
455620	26999	27018	CACAAACTTGATCTTGCCAC	77	1919
455626	36534	36553	GAATGTAAAGTATCTTGTTC	47	1920
455627	36578	36597	TATAAAATACACACTGGATT	57	1921
455628	36614	36633	GAAATGTGGCTGCTTCAAAC	36	1922
455629	36649	36668	TGGAGTCACTAGCCACATGT	71	1923
455630	36691	36710	GCATACAAATTTACTGAAAC	58	1924
455631	36904	36923	CAAGTTAAAATCTGCCTCAC	62	1925
455632	36975	36994	GGCATGTATTGATTGCCCTC	68	1926
455633	37026	37045	AGTAAAAGCAGTGGCTGACG	60	1927
455634	37086	37105	CACCTGCCACAGGACAAATG	28	1928
455635	37755	37774	TTGCCCCAATTAGGCCAATA	76	1929
455636	37822	37841	AAGGGCTTAAATTCCACTGG	73	1930

455637	37873	37892	GTACTTTACATGTGCAGCAC	81	1931
455638	38268	38287	AATATATCCAAAATGTTATT	8	1932
455639	38694	38713	GCAGCATCCAACAGAAATAG	62	1933
455640	39294	39313	GAGACTGAACACACGCAAAC	65	1934
455641	39324	39343	GTTCTCTGGGATAGTGAGAA	49	1935
455642	39792	39811	GAGAAACCCAGCCAGCTAAT	69	1936
455643	39937	39956	GGAAGATCTGCCTGAGATTC	46	1937
455644	40132	40151	TACAGCATCCAGCTCAGTGC	63	1938
455645	40633	40652	CCCAGTTTAGAACAATACAA	65	1939
455646	40866	40885	GTAGCCATTGCCCAACACAG	63	1940
455647	40901	40920	CACCACAAGTCCCAGTAGGG	58	1941
455648	40923	40942	TAAACCAAAGTGTGCATATG	11	1942
455649	41087	41106	AAGGACTTACCAATCTTGAC	7	1943
455650	41114	41133	ACCTAACAATTTGGAGAGTC	44	1944
455651	41239	41258	TTACAAGACCAAAGGGTGCC	68	1945
455652	41329	41348	AAATCAACCTTCAAGACATC	13	1946
455653	41397	41416	AAAAATATGTCTACCACATC	52	1947
455654	41431	41450	AAGTTCTAGCTATGACAGAA	23	1948
455655	41575	41594	AGCCTGCAGAACTATGAGCC	48	1949
455656	41629	41648	ATTGGAAGCTTGCTGAGGCC	44	1950
455657	41644	41663	CTGCCTTCCGCCATGATTGG	48	1951
455658	41747	41766	CGAGACAGTGAGTTCTTGTG	64	1952

455659	42067	42086	CTGGCCCTTCACCAAATCAG	62	1953
455660	42139	42158	GGTCAGATTTATTAGTACAA	65	1954
455661	42904	42923	ATCATACCTGAAGAAACTGC	16	1955
455662	43059	43078	ATACAGAGCTTTGAGAAAGG	38	1956
455663	43194	43213	TGTAACAGTGAGAGTCATCT	71	1957
455664	43284	43303	TCTGAGTCTTTACACAGTAT	72	1958
455665	43724	43743	TTCATCAAGGAAAGCATTTA	31	1959
455666	43765	43784	TGGAGATGTGGACTGAACTG	19	1960
455667	43908	43927	CCTGGGCCGCAGTGGCTGCA	63	1961
455668	43926	43945	GTTTTGTCTCAGGTCTCACC	75	1962
455669	43941	43960	CCAGACCAGGGATTTGTTTT	34	1963
455670	43974	43993	CTCATTATAAAGTTGTTTGA	55	1964
455671	44507	44526	TGTACTATGAAAGTTTGTCA	80	1965
455672	44525	44544	AATGATATTGGAATAATCTG	26	1966
455673	44540	44559	CTTTGGAAAAGTTTGAATGA	26	1967
455674	44583	44602	CAGCCTCATAAAATAAGCTG	19	1968
455675	45414	45433	TACTGAGAATAGTGTTTCAC	71	1969
455676	45440	45459	AAGACATCCTTATCTTTTGC	75	1970
455677	45512	45531	TTCCAATATTTGTACCCTCA	87	1971
455678	45626	45645	TACAATGGCCTTTCTAAACC	64	1972
455679	45712	45731	AGATCTTTACTTTCATTACA	54	1973
455680	46058	46077	TATGCAAATTGCATACATTT	59	1974

455681	46091	46110	TTTCCAGATATTTTCCCATA	88	1975
455682	46241	46260	GTGTATTTCACCACAATTTT	78	1976
455683	46571	46590	TGTCTTTGAACATGATCTTC	67	1977
455684	46676	46695	GCATGACTAATTAAAACATC	58	1978
455685	46759	46778	CAGAGCAAGTGGCAGGGCTG	69	1979
455686	46791	46810	CAGAGAGAGTAAAAATTGTT	49	1980
455687	46905	46924	CAGCAGAAAGCAGTTAAATT	56	1981
455688	46941	46960	CAGTAATGGTGAGGGTGATG	28	1982
455689	46956	46975	GGTCCCCATTTCCTACAGTA	67	1983
455690	47307	47326	ACACCTGAGCATATCAGTTT	67	1984
455691	47400	47419	CAGAAAATCCTAGTGCTGCC	62	1985
455692	47424	47443	ATAAAATACAAAGGTTTTCC	23	1986
455693	47467	47486	TCCAAATTGACTTAAACCAC	74	1987
455694	47528	47547	TTGAAAACATCCTTGGGATA	44	1988
455695	47579	47598	CAGGCTGGATTTGGGCCACG	76	1989
455696	47649	47668	GCCACAGATAATGCATAAAT	39	1990
455697	47795	47814	CTGGGTTGAGGCCACAAATA	78	1991
455698	47929	47948	GTTTGTGTACTTATAATCCC	75	1992
455699	47974	47993	GACAAAATGACACACATCCT	72	1993
455700	48188	48207	TTTCACACAATTGATAACTT	57	1994
455701	48208	48227	CAGGCCAACACAGAAAGCTG	70	1995
455702	48277	48296	AGAAACCCACCTCTAATACC	31	1996

455703	48402	48421	GCCACACTTTCCATTCTAGT	90	1997
455704	48417	48436	TGGTTACCAGCTCAAGCCAC	72	1998
455705	48566	48585	CAGGTCTAGAGGCCTATCCC	73	1999
455706	48665	48684	TCTTCAAAGAACCCAGCACC	63	2000
455707	48697	48716	AGATGGAGAGAAAGACTCTG	61	2001
455708	48728	48747	CCCACAGTGACAGTGACTCA	89	2002
455709	48768	48787	CTTAGAAGTTTTGGGAAGGT	60	2003
455710	48802	48821	ATGGTCCCTATCCAAGCCCA	81	2004
455711	48828	48847	ATGGGCAACCATTCTCTTCC	80	2005
455712	49754	49773	GTTGGATGTCTACTTAAACG	63	2006
455713	49845	49864	GACCACATGTTCAGCTAAGA	68	2007
455714	49923	49942	AAACAGAGGCAGTGGTGCTG	62	2008
455715	50053	50072	CCAAAAAGGAGGTCAATGCA	30	2009
455716	50522	50541	GTATCCCCAAGAGAAGGCTC	59	2010
455717	50571	50590	TCAAATGAAGCCAAAACCTC	63	2011
455718	50774	50793	CACTTTCTAGAGATTTTAAC	1	2012
455719	51623	51642	TCAGATCTTGCATGTCTGCG	2	2013
455720	51753	51772	CCGCAAGTGAGCGAGACACA	49	2014
455721	51827	51846	CCACATTCTTTAGTCAACTC	59	2015
455722	51856	51875	CAGAAAACATTTCCTCAGAC	3	2016
455723	52033	52052	ACCAGTTTTCTAGCCGATCT	90	2017
455724	52056	52075	AGGAAAAGCTTCTTTCATCC	34	2018

455725	52071	52090	GCTTTCGAGAAAGAAAGGAA	44	2019
455726	53203	53222	TGGATGAAGGTAAAAGTGCA	42	2020
455727	53246	53265	TCACTATAGGGCCTTGCACA	53	2021
455728	53262	53281	AGCTGGTGCAACATGCTCAC	69	2022
455729	53329	53348	GCATTCTCATGTAGAGTTGC	0	2023
455730	53344	53363	GATATGAATAGACAGGCATT	63	2024
455731	53431	53450	ATTCCCAGAACTTAAGCTTC	40	2025
455732	53571	53590	ATTCCATCATTCTTTGATGG	47	2026
455733	53900	53919	TGCACAAGGAATAAGTGAAT	51	2027
455734	54378	54397	AGAAGGGCTTGAACTACATG	15	2028
455735	54577	54596	GAGCCCAGATATGCAGAACA	58	2029
455736	54592	54611	AAATGACAAGCATCTGAGCC	16	2030
455737	54632	54651	ATTTATACCACTAGGAGGCA	52	2031
455738	55241	55260	TTCAGTGACATTAAGAAAAG	28	2032
455739	55256	55275	ATCTTAAGTTTACAGTTCAG	64	2033
455740	55277	55296	GCATGAAATTTACAATTTTT	26	2034
455741	55418	55437	TCCTGCCAATAAATTAAGAA	0	2035
455742	55657	55676	GAAGTCAGCCCGCCTCTCAC	33	2036
455743	55841	55860	GTGTCCCTCAGTAAAATCTC	53	2037
455744	55877	55896	ATGACCCTGGCCACCAACTC	63	2038
455745	55961	55980	CAGAATCAGAGAGCAAGCAG	56	2039
455746	56125	56144	CCTTAAAATCCACAGGGAAG	5	2040

455747	56151	56170	TCCCCATCACTAAGCCTTAC	31	2041
455748	56203	56222	TAACACCTCACCCTACAGGC	56	2042
455749	56287	56306	ACACCATACTAAGTTTCTGA	68	2043
455750	57995	58014	CTTGTCAATGCACACTTTAA	80	2044
455751	58074	58093	TCTAGTTCAAATGATGTCTG	66	2045
455752	58089	58108	AATAAAGACAGAGTCTCTAG	30	2046
455753	58106	58125	CAAAATGAAGATCTCTGAAT	23	2047
455754	58173	58192	AGCTTTGTGGCTTTGTTCAG	60	2048
455755	58259	58278	TGAATGACATGTACAAGTAA	52	2049
455756	58377	58396	TGTGTAAGGACTATATACTC	64	2050
455757	58471	58490	TTCAGCACAGTAACATACTG	41	2051
455758	58496	58515	AGATGTGTTACAATTGCCTA	76	2052
455759	58696	58715	TTTACATCCTGAAAGGTATT	51	2053
455760	59471	59490	ATATGTACTTATTAAACCTA	18	2054
455761	59748	59767	ACAAAAGGAAGCCTCTAGGC	0	2055
455762	59913	59932	CCAAGTGTTTGAATTCTGCA	83	2056
455763	60155	60174	CAGGTTGATGTGTTTCTAATTC	60	2057
455764	60170	60189	CTACAGCTGAAAGAACAGGT	76	2058
455765	60249	60268	ATGTTCCAAGCCAGAGAGCT	54	2059
455766	60323	60342	GGTGTGGAGAACAACTCAGC	72	2060
455767	60373	60392	GGGAATTTGGAAAGCCCCAG	0	2061
455768	60392	60411	CAGCCGCAGGAGCTGGATGG	42	2062

455769	60407	60426	GGAGCCAAGCAGGGTCAGCC	73	2063
455770	60433	60452	GGAGAGAAAAACAGGGCACT	69	2064
455771	60448	60467	TATCCCACCTCAGTGGGAGA	1	2065
455772	60602	60621	TCTGAATCAATGAAAAGCAG	79	2066
455773	60703	60722	CATCACAATTTTTAAAAATG	0	2067
455774	61216	61235	GTATTTTTAAAACACATATA	0	2068
455775	61251	61270	CTTAATATACATATGAATAC	14	2069
455786	61340	61359	CAAATATCACAGAGACAGTC	88	2070
455787	61758	61777	GTACAGCAACCTTATTTTAA	5	2071
455788	61853	61872	TTAAATCCTGGGAATGGCAC	83	2072
455789	61959	61978	CTAATGTTGATGGGTATTTA	60	2073
455790	62043	62062	CATGGTTATGTGTATCTGCA	89	2074
455791	62067	62086	TTCACTTGATGTGAAATGAA	18	2075
455792	62500	62519	TGCCAGGGACACAACTTGCT	82	2076
455793	62595	62614	ATGGCATTCAGTACTAACAG	59	2077
455794	62610	62629	TTTTCCTCAGAGAGAATGGC	67	2078
455795	63284	63303	AGTCACAATCAGGGAAGCCT	77	2079
455796	63449	63468	AGTAATCATTCCACCTTCTC	70	2080
455797	63464	63483	CAGTGTTAAGCAAACAGTAA	41	2081
455798	63554	63573	ATACACACATCTTCTAAGCA	48	2082
455799	63576	63595	TCAAGTTTGCTGAAAGCTGA	48	2083
455800	63591	63610	ATAGAGATTTTCATATCAAG	41	2084

455801	64070	64089	ACAGGGAGGTCTCAGGAATC	77	2085
455802	64122	64141	TTTAAGACCTTGGAGGCATT	36	2086
455803	64586	64605	AGGGATGGTGCTCATTGTCT	20	2087
455804	64810	64829	GCCGGATCCCTTTTCTGGGC	64	2088
455805	64955	64974	TGATCACCTCGACTGAAAAC	65	2089
455806	65058	65077	GTGCCACCTTCCAACACACA	74	2090
455807	65530	65549	CAGACAGGTGTATTTGGTGG	65	2091
455808	65895	65914	ACTTTGCAAAATTTAGCCCA	77	2092
455809	65928	65947	TCCCATTCCCACGAGAATTT	76	2093
455810	65972	65991	GCCTTCAAGCCAGAGCCCTC	76	2094
455811	65987	66006	GACCAAGAGTTCAGGGCCTT	59	2095
455812	66099	66118	GTAATGGGAAAGCCAAGTCT	51	2096
455813	66128	66147	TTGCCAGCCATGTTTTCCTG	67	2097
455814	66283	66302	AGGGCATCCATCCCCTGCCA	7	2098
455815	66664	66683	TCACTGGAGCAAGCAAAACA	64	2099
455816	66775	66794	GGTCATAGAAAATAAACTTG	62	2100
455817	66863	66882	AGTGTTGAGACCCTGAACAC	53	2101
455818	66918	66937	AGAGAAAACTGCCCATTTTT	71	2102
455819	66948	66967	AGATCATGGAACCTACAGCT	18	2103
455820	66963	66982	GGACATGGGAAGGAAAGATC	27	2104
455821	67191	67210	CAACAACTACCTGGGTCAGC	51	2105
455822	67271	67290	AGGCATTTGCCTATCTATCC	58	2106

455823	67334	67353	CCAACAAAAGCACTCACTAC	56	2107
455824	67773	67792	TGAAATCTGGGCCTCAAACC	78	2108
455825	67843	67862	GAAACCCTTTCTTCAGACCA	79	2109
455826	68621	68640	TCAAAACAGCAAGTGCTGAA	60	2110
455827	69053	69072	AACCCTAAAGGATCACATTA	43	2111
455828	69357	69376	CAAAGAGCCGTGTGGCAGGG	65	2112
455829	69395	69414	GACCAGCCGTGGGACCCCAA	84	2113
455830	69473	69492	CCACAGGAAGGGCGATGGTA	58	2114
455831	69498	69517	GCAGGAAAGGACCTGGCCTC	45	2115
455832	70567	70586	TTAGGGAGCTGACACCCTAG	56	2116
455833	70645	70664	CAATTCAGTGCAGAATTCAA	80	2117
455834	70675	70694	TCTGAGTTTACTTTGGGCCA	75	2118
455835	70725	70744	CATGATGACCATGTGAAAGA	82	2119
455836	70890	70909	CTGAATGCTTACACCAAGAG	83	2120
455837	70973	70992	CCAATTTTCTATGAGCTTTG	85	2121
455838	71013	71032	CTTTTATGTATAAAATAAGA	6	2122
455839	71573	71592	CCAGGTACATCTTCAATAGC	75	2123
455840	71610	71629	GTACAATTGCTTCAACTAGA	87	2124
455841	71698	71717	ACATTTTTGGATGAGGGCAT	81	2125
455842	71750	71769	AAAGCCAAAGGTTATATCTC	77	2126
455843	71765	71784	AATGCTTGTGGTTCCAAAGC	79	2127
455844	71929	71948	TGTAAAAGTTTAACAGCCTC	70	2128

455845	71992	72011	CATAACCTTTTCCCACCTGA	79	2129
455846	72036	72055	CAGTTCTTTGCACAAAGCTG	76	2130
455847	72127	72146	CAAGATTGTCTGGAAAGCTC	76	2131
455848	72202	72221	TCGCATTCAGTAAGCAGAGC	47	2132
455849	72229	72248	AAACCAGTTTTCTTACTGAC	17	2133
455850	72285	72304	CGGTGTCACACAGATAAACT	73	2134
455851	72367	72386	TTAACTCTCACCCAGTGTCC	61	2135
455852	72406	72425	GTACTAAACATAGCCCAGGG	78	2136
455853	72687	72706	AAATACTCACCAAACTGCCC	4	2137
455854	72768	72787	GTGACCAGCTCTCGGTGTGT	10	2138
455855	73340	73359	GATTTGGTTTGTCCAAACTG	49	2139
455856	73530	73549	GTCAGAAAAGCCAGATTTAC	46	2140
455857	73621	73640	GCAACTGGCAGGCCACGCCC	39	2141
455858	73636	73655	AGTTGTCCACCCTCTGCAAC	0	2142
455859	73683	73702	TGTCAAAGGTGAGGGACTCT	57	2143
455860	74018	74037	ACACAAGACATTTCCTTTTT	64	1544

EJEMPLO 33: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 HUMANA EN CÉLULAS HUVEC

Los gápmeros del estudio que se describen en el Ejemplo 32 que exhiben inhibición *in vitro* significativa de STAT3 se probaron a diferentes dosis en células HuVEC. Se plaquearon las células con una densidad de 5,000 células por pocillo y se transfectaron usando el reactivo LipofectAMINE2000® con concentraciones 1.1 nM, 3.3 nM, 10.0 nM y 30.0 nM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 54. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. Se usó el juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS199 (secuencia directa ACATGCCACTTTGGTGTTTCATAA, designada en la presente como SEQ ID Nº 6; secuencia reversa TCTTCGTAGATTGTGCTGATAGAGAAC, designada en la presente como SEQ ID Nº 7; secuencia de sonda CAGTATAGCCGCTTCCTGCAAGAGTCGAA, designada en la presente como SEQ ID Nº 8) para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 54 y se calculó mediante el gráfico de las concentraciones de los oligonucleótidos usados versus el porcentaje de inhibición de la expresión del ARNm de STAT3 conseguida para cada concentración y registrando la concentración de oligonucleótido a la cual se consigue el 50% de inhibición de la expresión del ARNm de STAT3 en comparación con el control. Como se ilustra en la Tabla 54, los niveles de ARNm de STAT3 se redujeron de forma significativa en una forma dependiente de la dosis en las células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

TABLA 54

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de STAT3 humana en células HuVEC

ISIS N°	1.1 nM	3.3 nM	10.0 nM	30.0 nM	IC_{50} (nM)
337332	7	19	46	80	10.4
345785	8	22	46	74	11.3
455265	20	43	64	85	5.0
455267	16	30	62	79	6.7
455269	23	49	72	84	4.0
455270	3	28	60	79	8.1
455271	16	40	71	86	4.9
455272	28	30	57	86	5.7
455282	18	28	55	80	7.4
455291	21	45	75	85	4.1
455370	6	23	53	78	9.0
455371	15	46	73	90	4.5
455391	10	30	54	75	8.5
455393	6	33	62	81	7.0
455394	5	33	63	85	6.7
455398	7	25	56	76	8.8

455411	10	21	58	82	7.9
455412	15	27	50	79	8.4
455429	17	43	67	81	5.2
455438	20	43	66	83	5.0
455439	10	41	67	84	5.7
455447	7	23	53	87	7.7
455457	9	24	52	79	8.8
455458	8	34	62	83	6.7
455463	6	37	63	85	6.3
455471	11	42	67	78	5.9
455525	0	9	42	72	13.4
455527	0	21	60	87	7.8
455530	11	26	62	83	7.1
455536	5	21	62	85	7.6
455540	8	28	65	87	6.5
455547	6	19	45	67	13.4
455548	0	41	68	90	5.8
455551	0	3	33	72	15.9
455553	0	29	64	87	7.2
455565	0	19	54	86	8.8
455566	13	28	45	76	9.6
455569	0	16	47	76	11.1
455581	0	19	62	85	8.6
455582	0	26	70	89	6.9
455591	7	17	47	68	12.8
455594	0	16	48	76	10.9
455611	14	43	68	81	5.4
455637	10	22	56	76	8.9
455677	0	18	46	72	11.9
455681	16	19	42	69	13.0
455703	9	40	72	92	5.1
455708	11	15	45	77	10.7
455723	3	9	33	68	17.0

455762	0	9	42	70	14.1
455786	21	32	50	79	7.4
455790	13	19	56	84	7.8
455840	17	30	52	77	7.9

EJEMPLO 34: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DE STAT3 HUMANA EN CÉLULAS HUVEC POR OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS POR MICROCAMINATA

Se diseñaron gápmeros adicionales basado en los gápmeros presentados en el Ejemplo 1 que demostraron una inhibición de al menos 50%. Estos gápmeros se diseñaron por creación de gápmeros desplazados levemente corriente arriba y corriente abajo (es decir, "microcaminata") de los gápmeros originales. Estos gápmeros se probaron *in vitro*. También se incluyó el ISIS 337332 en el ensayo para comparación. Las células HuVEC cultivadas a una densidad de 5,000 células por pocillo se transfectaron usando el reactivo LipofectAMINE 2000® con 30 nM de oligonucleótido antisentido. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de cebadores y sonda humanos RTS199, que se describió previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm de STAT3. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar. Los resultados se presentan en la Tabla 55.

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos en la Tabla 55 se diseñaron como gápmeros 5-10-5 MOE. Los gápmeros diseñados con un asterisco (*) en la Tabla 55 son los gápmeros originales a partir de los cuales se diseñaron gápmeros, ISIS 465226-466744, por medio de microcaminata. Los gápmeros 5-10-5 tienen 20 nucleósidos de longitud, en donde el segmento espaciador central está comprendido por diez 2'-desoxinucleósidos y está flanqueado a ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por extensiones que comprenden cinco nucleósidos cada uno. Cada nucleósido en el segmento extensión 5' y cada nucleósido en el segmento extensión 3' tiene una modificación 2'-MOE. Las uniones internucleosídicas a lo largo de cada gápmero son uniones fosforotioato (P=S). Todos los residuos de citosina a lo largo de cada gápmero son 5-metilcitosinas. "Sitio de inicio de blanco" indica el nucleósido ubicado más hacia 5' contra el que está dirigido el gápmero. "Sitio de finalización de blanco" indica el nucleósido ubicado más hacia 3' contra el que está dirigido el gápmero. Cada gápmero que se lista en la Tabla 55 se dirige contra la región blanco que se expande en las nucleobases 2313-76017 de SEQ ID Nº 2 (el complemento del No. de Acceso a GENBANK NT_010755.14 truncado entre los nucleótidos 4185000 a 4264000).

TABLA 55

Niveles de inhibición del ARNm de STAT3 humana por oligonucleótidos antisentido quiméricos contra la SEQ ID Nº 2

ISIS N°	Sitio de inicio	Sitio de finalización	Secuencia	% de inhibición	SEQ ID Nº
466646	2313	2332	CACACTATACACATTTTTAA	3	2144
466647	2314	2333	ACACACTATACACATTTTTA	11	2145
466648	2315	2334	TACACACTATACACATTTTT	8	2146
455525*	2316	2335	GTACACACTATACACATTTT	47	1824
466649	2317	2336	GGTACACACTATACACATTT	46	2147
466650	2318	2337	AGGTACACACTATACACATT	46	2148
466651	2319	2338	CAGGTACACACTATACACAT	54	2149
466652	2320	2339	GCAGGTACACACTATACACA	68	2150
466653	2321	2340	AGCAGGTACACACTATACAC	43	2151
466654	2322	2341	CAGCAGGTACACACTATACA	56	2152
466655	2323	2342	CCAGCAGGTACACACTATAC	72	2153
466656	2324	2343	ACCAGCAGGTACACACTATA	52	2154
466657	2325	2344	GACCAGCAGGTACACACTAT	69	2155
466658	2326	2345	AGACCAGCAGGTACACACTA	15	2156
466659	2327	2346	AAGACCAGCAGGTACACACT	49	2157
466660	2328	2347	TAAGACCAGCAGGTACACAC	59	2158
466661	2329	2348	GTAAGACCAGCAGGTACACA	73	2159
466662	2330	2349	AGTAAGACCAGCAGGTACAC	65	2160

466663	2331	2350	CAGTAAGACCAGCAGGTACA	64		2161
466664	2332	2351	ACAGTAAGACCAGCAGGTAC	53		2162
466665	2333	2352	TACAGTAAGACCAGCAGGTA	67		2163
466666	2334	2353	ATACAGTAAGACCAGCAGGT	75		2164
466667	2335	2354	CATACAGTAAGACCAGCAGG	66		2165
466668	2336	2355	ACATACAGTAAGACCAGCAG	55		2166
466669	2337	2356	CACATACAGTAAGACCAGCA	71		2167
466670	2338	2357	GCACATACAGTAAGACCAGC	83		2168
466671	2339	2358	TGCACATACAGTAAGACCAG	28		2169
466672	2340	2359	TTGCACATACAGTAAGACCA	70		2170
466673	2341	2360	GTTGCACATACAGTAAGACC	39		2171
466674	2342	2361	AGTTGCACATACAGTAAGAC	53		2172
466675	2343	2362	TAGTTGCACATACAGTAAGA	43		2173
455527*	2383	2402	GCCAAAAATTTACAACCCAT	48		1826
465806	2384	2403	AGCCAAAAATTTACAACCCA	29		2174
465807	2385	2404	CAGCCAAAAATTTACAACCC	7		2175
465808	2386	2405	CCAGCCAAAAATTTACAACC	35		2176
465809	2387	2406	GCCAGCCAAAAATTTACAAC	10		2177
465810	2388	2407	AGCCAGCCAAAAATTTACAA	37		2178
465811	2389	2408	CAGCCAGCCAAAAATTTACA	29		2179
465812	2390	2409	ACAGCCAGCCAAAAATTTAC	3		2180
465813	2391	2410	CACAGCCAGCCAAAAATTTA	6		2181

465814	2392	2411	GCACAGCCAGCCAAAAATTT	35	2182
465815	2393	2412	AGCACAGCCAGCCAAAAATT	22	2183
465816	2394	2413	CAGCACAGCCAGCCAAAAAT	23	2184
465817	2395	2414	TCAGCACAGCCAGCCAAAAA	33	2185
465818	2396	2415	ATCAGCACAGCCAGCCAAAA	32	2186
465819	2397	2416	TATCAGCACAGCCAGCCAAA	48	2187
465820	2398	2417	TTATCAGCACAGCCAGCCAA	32	2188
465821	2399	2418	TTTATCAGCACAGCCAGCCA	0	2189
465822	2400	2419	CTTTATCAGCACAGCCAGCC	49	2190
465823	2401	2420	GCTTTATCAGCACAGCCAGC	69	2191
465824	2402	2421	TGCTTTATCAGCACAGCCAG	48	2192
465825	2403	2422	ATGCTTTATCAGCACAGCCA	74	2193
465826	2404	2423	AATGCTTTATCAGCACAGCC	62	2194
465827	2405	2424	CAATGCTTTATCAGCACAGC	67	2195
465828	2406	2425	CCAATGCTTTATCAGCACAG	71	2196
465829	2407	2426	CCCAATGCTTTATCAGCACA	47	2197
465830	2408	2427	GCCCAATGCTTTATCAGCAC	81	2198
465831	2409	2428	AGCCCAATGCTTTATCAGCA	75	2199
465832	2410	2429	AAGCCCAATGCTTTATCAGC	57	2200
465349	2655	2674	AGGCTCCAACCTCTAAAACA	41	2201
465350	2656	2675	AAGGCTCCAACCTCTAAAAC	34	2202
465351	2657	2676	CAAGGCTCCAACCTCTAAAA	43	2203

465352	2658	2677	TCAAGGCTCCAACCTCTAAA	51		2204
465353	2659	2678	ATCAAGGCTCCAACCTCTAA	38		2205
465354	2660	2679	AATCAAGGCTCCAACCTCTA	29		2206
465355	2661	2680	AAATCAAGGCTCCAACCTCT	56		2207
465356	2662	2681	AAAATCAAGGCTCCAACCTC	24		2208
465357	2663	2682	TAAAATCAAGGCTCCAACCT	46		2209
465358	2664	2683	CTAAAATCAAGGCTCCAACC	45		2210
465359	2665	2684	ACTAAAATCAAGGCTCCAAC	50		2211
465366	2666	2685	GACTAAAATCAAGGCTCCAA	51		2212
465367	2667	2686	AGACTAAAATCAAGGCTCCA	64		2213
465368	2668	2687	GAGACTAAAATCAAGGCTCC	76		2214
455530*	2669	2688	AGAGACTAAAATCAAGGCTC	74		1829
455536*	5000	5019	AGAACTGAAATTCCTTGGTC	52		1835
465833	5001	5020	CAGAACTGAAATTCCTTGGT	81		2215
465834	5002	5021	ACAGAACTGAAATTCCTTGG	81		2216
465835	5003	5022	AACAGAACTGAAATTCCTTG	48		2217
465836	5004	5023	GAACAGAACTGAAATTCCTT	46		2218
465837	5005	5024	AGAACAGAACTGAAATTCCT	39		2219
465838	5006	5025	AAGAACAGAACTGAAATTCC	22		2220
465839	5007	5026	AAAGAACAGAACTGAAATTC	3		2221
465840	5008	5027	AAAAGAACAGAACTGAAATT	0		2222
465841	5009	5028	CAAAAGAACAGAACTGAAAT	0		2223

465842	5010	5029	ACAAAAGAACAGAACTGAAA	0	2224
465843	5011	5030	TACAAAAGAACAGAACTGAA	3	2225
465844	5012	5031	CTACAAAAGAACAGAACTGA	0	2226
465845	5013	5032	CCTACAAAAGAACAGAACTG	13	2227
465846	5014	5033	CCCTACAAAAGAACAGAACT	0	2228
465847	5015	5034	CCCCTACAAAAGAACAGAAC	7	2229
465848	5016	5035	TCCCCTACAAAAGAACAGAA	33	2230
465849	5017	5036	TTCCCCTACAAAAGAACAGA	18	2231
465850	5018	5037	CTTCCCCTACAAAAGAACAG	0	2232
465851	5019	5038	GCTTCCCCTACAAAAGAACA	43	2233
465852	5020	5039	AGCTTCCCCTACAAAAGAAC	32	2234
465853	5021	5040	AAGCTTCCCCTACAAAAGAA	0	2235
465854	5022	5041	AAAGCTTCCCCTACAAAAGA	15	2236
465855	5023	5042	AAAAGCTTCCCCTACAAAAG	14	2237
465856	5024	5043	TAAAAGCTTCCCCTACAAAA	4	2238
465857	5025	5044	TTAAAAGCTTCCCCTACAAA	0	2239
465858	5026	5045	TTTAAAAGCTTCCCCTACAA	11	2240
465859	5027	5046	TTTTAAAAGCTTCCCCTACA	11	2241
465860	5688	5707	CAGTGGTTTTTTATAAATGAC	29	2242
465861	5689	5708	TCAGTGGTTTTTTATAAATGA	19	2243
465862	5690	5709	TTCAGTGGTTTTTTATAAATG	4	2244
465863	5691	5710	TTTCAGTGGTTTTTTATAAAT	0	2245

465864	5692	5711	CTTTCAGTGGTTTTTATAAA	0	2246
465865	5693	5712	TCTTTCAGTGGTTTTTATAA	0	2247
465866	5694	5713	CTCTTTCAGTGGTTTTTATA	35	2248
465867	5695	5714	ACTCTTTCAGTGGTTTTTAT	67	2249
465868	5696	5715	TACTCTTTCAGTGGTTTTTA	60	2250
465886	5697	5716	GTACTCTTTCAGTGGTTTTT	85	2251
465887	5698	5717	AGTACTCTTTCAGTGGTTTT	62	2252
455540*	5699	5718	AAGTACTCTTTCAGTGGTTT	76	1839
465888	5700	5719	CAAGTACTCTTTCAGTGGTT	80	2253
465906	5701	5720	TCAAGTACTCTTTCAGTGGT	74	2254
465926	5702	5721	CTCAAGTACTCTTTCAGTGG	80	2255
465927	5703	5722	CCTCAAGTACTCTTTCAGTG	71	2256
465928	5704	5723	CCCTCAAGTACTCTTTCAGT	54	2257
465929	5705	5724	TCCCTCAAGTACTCTTTCAG	33	2258
465930	5706	5725	GTCCCTCAAGTACTCTTTCA	56	2259
465931	5707	5726	TGTCCCTCAAGTACTCTTTC	43	2260
465932	5708	5727	ATGTCCCTCAAGTACTCTTT	33	2261
465486	7674	7693	AAAGGGCTGCAAAAAATCTG	39	2262
465487	7675	7694	GAAAGGGCTGCAAAAAATCT	11	2263
465488	7676	7695	AGAAAGGGCTGCAAAAAATC	28	2264
465489	7677	7696	CAGAAAGGGCTGCAAAAAAT	39	2265
465490	7678	7697	ACAGAAAGGGCTGCAAAAAA	29	2266

465506	7679	7698	AACAGAAAGGGCTGCAAAAA	36	2267
465507	7680	7699	AAACAGAAAGGGCTGCAAAA	35	2268
465508	7681	7700	TAAACAGAAAGGGCTGCAAA	47	2269
455547*	7682	7701	GTAAACAGAAAGGGCTGCAA	72	1846
465509	7683	7702	GGTAAACAGAAAGGGCTGCA	70	2270
465510	7684	7703	TGGTAAACAGAAAGGGCTGC	63	2271
465511	7685	7704	CTGGTAAACAGAAAGGGCTG	60	2272
465526	7686	7705	CCTGGTAAACAGAAAGGGCT	65	2273
465527	7687	7706	ACCTGGTAAACAGAAAGGGC	26	2274
465528	7688	7707	AACCTGGTAAACAGAAAGGG	53	2275
465529	7689	7708	TAACCTGGTAAACAGAAAGG	35	2276
465530	7690	7709	ATAACCTGGTAAACAGAAAG	3	2277
465531	7691	7710	GATAACCTGGTAAACAGAAA	17	2278
465532	7692	7711	AGATAACCTGGTAAACAGAA	14	2279
465533	7693	7712	AAGATAACCTGGTAAACAGA	26	2280
455548*	8078	8097	GGGCAGATTTACCTTCCTTA	77	1847
466722	8241	8260	AATAGCAATCACCTTAGGAA	53	2281
466723	8242	8261	CAATAGCAATCACCTTAGGA	62	2282
466724	8243	8262	ACAATAGCAATCACCTTAGG	48	2283
455551*	8244	8263	TACAATAGCAATCACCTTAG	65	1850
466725	8245	8264	CTACAATAGCAATCACCTTA	15	2284
466726	8246	8265	ACTACAATAGCAATCACCTT	45	2285

466727	8247	8266	AACTACAATAGCAATCACCT	42	2286
466728	8248	8267	AAACTACAATAGCAATCACC	26	2287
466729	8249	8268	AAAACTACAATAGCAATCAC	14	2288
466730	8250	8269	CAAAACTACAATAGCAATCA	0	2289
466731	8251	8270	TCAAAACTACAATAGCAATC	29	2290
466732	8252	8271	TTCAAAACTACAATAGCAAT	20	2291
466733	8253	8272	TTTCAAAACTACAATAGCAA	14	2292
466734	8254	8273	GTTTCAAAACTACAATAGCA	58	2293
466735	8255	8274	TGTTTCAAAACTACAATAGC	28	2294
466736	8256	8275	GTGTTTCAAAACTACAATAG	42	2295
466737	8257	8276	AGTGTTTCAAAACTACAATA	13	2296
466738	8258	8277	AAGTGTTTCAAAACTACAAT	18	2297
466739	8259	8278	CAAGTGTTTCAAAACTACAA	30	2298
466740	8260	8279	CCAAGTGTTTCAAAACTACA	49	2299
466741	8261	8280	ACCAAGTGTTTCAAAACTAC	46	2300
466742	8262	8281	AACCAAGTGTTTCAAAACTA	41	2301
466743	8263	8282	CAACCAAGTGTTTCAAAACT	13	2302
455553*	9123	9142	ACCTGCCCCTATGTATAAGC	75	1852
	11261	11280			
466744	9124	9143	CACCTGCCCCTATGTATAAG	67	2303
	11262	11281			
466745	9125	9144	CCACCTGCCCCTATGTATAA	69	2304

	11263	11282				
466746	9126	9145	TCCACCTGCCCCTATGTATA	68	2305	
	11264	11283				
466747	9127	9146	TTCCACCTGCCCCTATGTAT	69	2306	
	11265	11284				
466748	9128	9147	ATTCCACCTGCCCCTATGTA	58	2307	
	11266	11285				
466749	9129	9148	TATTCCACCTGCCCCTATGT	38	2308	
	11267	11286				
466750	9130	9149	TTATTCCACCTGCCCCTATG	47	309	
	11268	11287				
466751	9131	9150	TTTATTCCACCTGCCCCTAT	54	2310	
466752	9132	9151	TTTTATTCCACCTGCCCCTA	50	2311	
466753	9133	9152	GTTTTATTCCACCTGCCCCT	58	2312	
466754	9134	9153	TGTTTTATTCCACCTGCCCC	53	2313	
466755	9135	9154	ATGTTTTATTCCACCTGCCC	69	2314	
466756	9136	9155	TATGTTTTATTCCACCTGCC	3	2315	
466757	9137	9156	TTATGTTTTATTCCACCTGC	48	2316	
466758	9138	9157	ATTATGTTTTATTCCACCTG	53	2317	
466759	9139	9158	AATTATGTTTTATTCCACCT	24	2318	
466760	9140	9159	TAATTATGTTTTATTCCACC	10	2319	
466761	9141	9160	CTAATTATGTTTTATTCCAC	13	2320	

466762	9142	9161	CCTAATTATGTTTTATTCCA	23	2321
466763	9143	9162	TCCTAATTATGTTTTATTCC	27	2322
466764	9144	9163	CTCCTAATTATGTTTTATTC	21	2323
466765	9145	9164	CCTCCTAATTATGTTTTATT	30	2324
465740	9862	9881	TGGCTTCTTCCTGAGACACA	81	2325
	12345	12364			
465741	9863	9882	TTGGCTTCTTCCTGAGACAC	68	2326
	12346	12365			
465742	9864	9883	GTTGGCTTCTTCCTGAGACA	81	2327
	12347	12366			
465743	9865	9884	TGTTGGCTTCTTCCTGAGAC	68	2328
	12348	12367			
465744	9866	9885	CTGTTGGCTTCTTCCTGAGA	44	2329
	12349	12368			
465745	9867	9886	CCTGTTGGCTTCTTCCTGAG	73	2330
	12350	12369			
465746	9868	9887	TCCTGTTGGCTTCTTCCTGA	61	2331
	12351	12370			
465747	9869	9888	CTCCTGTTGGCTTCTTCCTG	53	2332
	12352	12371			
465748	9870	9889	CCTCCTGTTGGCTTCTTCCT	78	2333
	12353	12372			

465749	9871	9890	TCCTCCTGTTGGCTTCTTCC	73	2334	
	12354	12373				
465750	9872	9891	TTCCTCCTGTTGGCTTCTTC	70	2335	
	12355	12374				
465751	9873	9892	GTTCCTCCTGTTGGCTTCTT	89	2336	
	12356	12375				
465752	9874	9893	GGTTCCTCCTGTTGGCTTCT	86	2337	
	12357	12376				
465753	9875	9894	AGGTTCCTCCTGTTGGCTTC	73	2338	
	12358	12377				
465754	9876	9895	AAGGTTCCTCCTGTTGGCTT	85	2339	
	12359	12378				
465755	9877	9896	TAAGGTTCCTCCTGTTGGCT	82	2340	
	12360	12379				
465756	9878	9897	ATAAGGTTCCTCCTGTTGGC	72	2341	
	12361	12380				
465757	9879	9898	AATAAGGTTCCTCCTGTTGG	61	2342	
	12362	12381				
465758	9880	9899	AAATAAGGTTCCTCCTGTTG	40	2343	
	12363	12382				
465759	9881	9900	AAAATAAGGTTCCTCCTGTT	41	2344	
	12364	12383				

465760	9882	9901	CAAAATAAGGTTCCTCCTGT	20	2345	
	12365	12384				
465761	9883	9902	TCAAAATAAGGTTCCTCCTG	57	2346	
	12366	12385				
465762	9884	9903	CTCAAAATAAGGTTCCTCCT	48	2347	
	12367	12386				
465763	9885	9904	ACTCAAAATAAGGTTCCTCC	52	2348	
	12368	12387				
455566*	9886	9905	GACTCAAAATAAGGTTCCTC	59	1855	
	12369	12388				
465764	9887	9906	TGACTCAAAATAAGGTTCCT	54	2349	
	12370	12389				
465765	9888	9907	CTGACTCAAAATAAGGTTCC	47	2350	
	12371	12390				
465766	9889	9908	CCTGACTCAAAATAAGGTTC	55	2351	
	12372	12391				
465767	9890	9909	ACCTGACTCAAAATAAGGTT	48	2352	
	12373	12382				
455553*	9123	9142	ACCTGCCCCTATGTATAAGC	75	1852	
	11261	11280				
466744	9124	9143	CACCTGCCCCTATGTATAAG	67	2303	
	11262	11281				

466745	9125	9144	CCACCTGCCCCTATGTATAA	69	2304	
	11263	11282				
466746	9126	9145	TCCACCTGCCCCTATGTATA	68	2305	
	11264	11283				
466747	9127	9146	TTCCACCTGCCCCTATGTAT	69	2306	
	11265	11284				
466748	9128	9147	ATTCCACCTGCCCCTATGTA	58	2307	
	11266	11285				
466749	9129	9148	TATTCCACCTGCCCCTATGT	38	2308	
	11267	11286				
466750	9130	9149	TTATTCCACCTGCCCCTATG	47	2309	
	11268	11287				
465726	11695	11714	TTAATCTTTCCTAGGCAAAG	19	2353	
465727	11696	11715	ATTAATCTTTCCTAGGCAAA	22	2354	
465728	11697	11716	CATTAATCTTTCCTAGGCAA	43	2355	
465729	11698	11717	GCATTAATCTTTCCTAGGCA	68	2356	
465730	11699	11718	AGCATTAATCTTTCCTAGGC	80	2357	
455565*	11700	11719	TAGCATTAATCTTTCCTAGG	74	1864	
465731	11701	11720	TTAGCATTAATCTTTCCTAG	42	2358	
465732	11702	11721	ATTAGCATTAATCTTTCCTA	22	2359	
465733	11703	11722	GATTAGCATTAATCTTTCCT	40	2360	
465734	11704	11723	AGATTAGCATTAATCTTTCC	0	2361	

465735	11705	11724	AAGATTAGCATTAATCTTTTC	10	2362
465736	11706	11725	TAAGATTAGCATTAATCTTTT	3	2363
465737	12342	12361	CTTCTTCCTGAGACACAGCC	71	2364
465738	12343	12362	GCTTCTTCCTGAGACACAGC	74	2365
465739	12344	12363	GGCTTCTTCCTGAGACACAG	83	2366
465740	9862	9881	TGGCTTCTTCCTGAGACACA	81	2325
	12345	12364			
465741	9863	9882	TTGGCTTCTTCCTGAGACAC	68	2326
	12346	12365			
465742	9864	9883	GTTGGCTTCTTCCTGAGACA	81	2327
	12347	12366			
465743	9865	9884	TGTTGGCTTCTTCCTGAGAC	68	2328
	12348	12367			
465744	9866	9885	CTGTTGGCTTCTTCCTGAGA	44	2329
	12349	12368			
465745	9867	9886	CCTGTTGGCTTCTTCCTGAG	73	2330
	12350	12369			
465746	9868	9887	TCCTGTTGGCTTCTTCCTGA	61	2331
	12351	12370			
465747	9869	9888	CTCCTGTTGGCTTCTTCCTG	53	2332
	12352	12371			
465748	9870	9889	CCTCCTGTTGGCTTCTTCCT	78	2333

	12353	12372				
465749	9871	9890	TCCTCCTGTTGGCTTCTTCC	73	2334	
	12354	12373				
465750	9872	9891	TTCCTCCTGTTGGCTTCTTC	70	2335	
	12355	12374				
465751	9873	9892	GTTCCTCCTGTTGGCTTCTT	89	2336	
	12356	12375				
465752	9874	9893	GGTTCCTCCTGTTGGCTTCT	86	2337	
	12357	12376				
465753	9875	9894	AGGTTCCTCCTGTTGGCTTC	73	2338	
	12358	12377				
465754	9876	9895	AAGGTTCCTCCTGTTGGCTT	85	2339	
	12359	12378				
465755	9877	9896	TAAGGTTCCTCCTGTTGGCT	82	2340	
	12360	12379				
465756	9878	9897	ATAAGGTTCCTCCTGTTGGC	72	2341	
	12361	12380				
465757	9879	9898	AATAAGGTTCCTCCTGTTGG	61	2342	
	12362	12381				
465758	9880	9899	AAATAAGGTTCCTCCTGTTG	40	2343	
	12363	12382				
465759	9881	9900	AAAATAAGGTTCCTCCTGTT	41	2344	

	12364	12383			
465760	9882	9901	CAAAATAAGGTTCCTCCTGT	20	2345
	12365	12384			
465761	9883	9902	TCAAAATAAGGTTCCTCCTG	57	2346
	12366	12385			
465762	9884	9903	CTCAAAATAAGGTTCCTCCT	48	2347
	12367	12386			
465763	9885	9904	ACTCAAAATAAGGTTCCTCC	52	2348
	12368	12387			
455566*	9886	9905	GACTCAAAATAAGGTTCCTC	59	1865
	12369	12388			
465764	9887	9906	TGACTCAAAATAAGGTTCCT	54	2349
	12370	12389			
465765	9888	9907	CTGACTCAAAATAAGGTTCC	47	2350
	12371	12390			
465766	9889	9908	CCTGACTCAAAATAAGGTTC	55	2351
	12372	12391			
465767	9890	9909	ACCTGACTCAAAATAAGGTT	48	2352
	12373	12392			
465369	14101	14120	TGAGGATGACCCCAGATAAA	64	2367
465370	14102	14121	GTGAGGATGACCCCAGATAA	60	2368
465371	14103	14122	TGTGAGGATGACCCCAGATA	47	2369

465372	14104	14123	CTGTGAGGATGACCCCAGAT	68		2370
465373	14105	14124	CCTGTGAGGATGACCCCAGA	67		2371
465374	14106	14125	GCCTGTGAGGATGACCCCAG	70		2372
465375	14107	14126	TGCCTGTGAGGATGACCCCA	75		2373
465376	14108	14127	ATGCCTGTGAGGATGACCCC	72		2374
465377	14109	14128	TATGCCTGTGAGGATGACCC	58		2375
465378	14110	14129	CTATGCCTGTGAGGATGACC	56		2376
465379	14111	14130	GCTATGCCTGTGAGGATGAC	65		2377
465380	14112	14131	TGCTATGCCTGTGAGGATGA	23		2378
465386	14113	14132	CTGCTATGCCTGTGAGGATG	64		2379
465387	14114	14133	TCTGCTATGCCTGTGAGGAT	66		2380
465388	14115	14134	ATCTGCTATGCCTGTGAGGA	69		2381
465389	14116	14135	TATCTGCTATGCCTGTGAGG	59		2382
465390	14117	14136	ATATCTGCTATGCCTGTGAG	51		2383
465391	14118	14137	AATATCTGCTATGCCTGTGA	57		2384
465392	14119	14138	GAATATCTGCTATGCCTGTG	60		2385
465393	14120	14139	AGAATATCTGCTATGCCTGT	53		2386
465394	14121	14140	CAGAATATCTGCTATGCCTG	55		2387
465395	14122	14141	TCAGAATATCTGCTATGCCT	64		2388
465396	14123	14142	ATCAGAATATCTGCTATGCC	43		2389
465397	14124	14143	AATCAGAATATCTGCTATGC	37		2390
465398	14125	14144	GAATCAGAATATCTGCTATG	22		2391

465399	14126	14145	TGAATCAGAATATCTGCTAT	33	2392
465400	14127	14146	CTGAATCAGAATATCTGCTA	58	2393
465401	14128	14147	TCTGAATCAGAATATCTGCT	77	2394
455569*	14129	14148	ATCTGAATCAGAATATCTGC	67	1868
465406	14130	14149	CATCTGAATCAGAATATCTG	45	2395
465407	14131	14150	CCATCTGAATCAGAATATCT	47	2396
465408	14132	14151	ACCATCTGAATCAGAATATC	55	2397
465409	14133	14152	GACCATCTGAATCAGAATAT	72	2398
465410	14134	14153	GGACCATCTGAATCAGAATA	70	2399
465411	14135	14154	AGGACCATCTGAATCAGAAT	67	2400
465426	14136	14155	AAGGACCATCTGAATCAGAA	71	2401
465427	14137	14156	CAAGGACCATCTGAATCAGA	73	2402
465428	14138	14157	CCAAGGACCATCTGAATCAG	64	2403
465429	14139	14158	ACCAAGGACCATCTGAATCA	54	2404
465446	14140	14159	GACCAAGGACCATCTGAATC	65	2405
465447	14141	14160	GGACCAAGGACCATCTGAAT	72	2406
465448	14142	14161	AGGACCAAGGACCATCTGAA	68	2407
465449	14143	14162	AAGGACCAAGGACCATCTGA	78	2408
465450	14144	14163	TAAGGACCAAGGACCATCTG	37	2409
465451	14145	14164	CTAAGGACCAAGGACCATCT	73	2410
465452	14146	14165	ACTAAGGACCAAGGACCATC	65	2411
465453	14147	14166	AACTAAGGACCAAGGACCAT	54	2412

465454	14148	14167	AAACTAAGGACCAAGGACCA	49	2413
465455	14149	14168	CAAACTAAGGACCAAGGACC	61	2414
465456	14150	14169	TCAAACTAAGGACCAAGGAC	53	2415
465457	14151	14170	CTCAAACTAAGGACCAAGGA	59	2416
465534	16802	16821	CAACAGAGTGAAATGTAATG	16	2417
465535	16803	16822	TCAACAGAGTGAAATGTAAT	12	2418
465536	16804	16823	CTCAACAGAGTGAAATGTAA	52	2419
465537	16805	16824	GCTCAACAGAGTGAAATGTA	74	2420
465538	16806	16825	TGCTCAACAGAGTGAAATGT	17	2421
465539	16807	16826	ATGCTCAACAGAGTGAAATG	37	2422
465540	16808	16827	AATGCTCAACAGAGTGAAAT	14	2423
465541	16809	16828	GAATGCTCAACAGAGTGAAA	30	2424
465542	16810	16829	AGAATGCTCAACAGAGTGAA	23	2425
465543	16811	16830	TAGAATGCTCAACAGAGTGA	43	2426
465544	16812	16831	ATAGAATGCTCAACAGAGTG	38	2427
465545	16813	16832	CATAGAATGCTCAACAGAGT	38	2428
465546	16814	16833	CCATAGAATGCTCAACAGAG	56	2429
465547	16815	16834	TCCATAGAATGCTCAACAGA	37	2430
465548	16816	16835	ATCCATAGAATGCTCAACAG	48	2431
465549	16817	16836	AATCCATAGAATGCTCAACA	24	2432
465550	16818	16837	AAATCCATAGAATGCTCAAC	34	2433
465551	16819	16838	AAAATCCATAGAATGCTCAA	30	2434

465552	16820	16839	CAAAATCCATAGAATGCTCA	32	2435
465553	16821	16840	TCAAAATCCATAGAATGCTC	46	2436
465554	16822	16841	GTCAAAATCCATAGAATGCT	57	2437
465555	16823	16842	TGTCAAAATCCATAGAATGC	32	2438
465556	16824	16843	TTGTCAAAATCCATAGAATG	5	2439
465557	16825	16844	TTTGTCAAAATCCATAGAAT	2	2440
465558	16826	16845	ATTTGTCAAAATCCATAGAA	17	2441
465559	16827	16846	CATTTGTCAAAATCCATAGA	17	2442
465560	16828	16847	ACATTTGTCAAAATCCATAG	31	2443
465561	16829	16848	CACATTTGTCAAAATCCATA	43	2444
465562	16830	16849	ACACATTTGTCAAAATCCAT	42	2445
465563	16831	16850	CACACATTTGTCAAAATCCA	56	2446
455581*	16832	16851	TCACACATTTGTCAAAATCC	55	1880
465564	16833	16852	ATCACACATTTGTCAAAATC	34	2447
465565	16834	16853	CATCACACATTTGTCAAAAT	40	2448
465566	16835	16854	TCATCACACATTTGTCAAAA	41	2449
465567	16836	16855	ATCATCACACATTTGTCAAA	37	2450
465568	16837	16856	CATCATCACACATTTGTCAA	44	2451
465569	16838	16857	ACATCATCACACATTTGTCA	60	2452
465570	16839	16858	TACATCATCACACATTTGTC	9	2453
465571	16840	16859	ATACATCATCACACATTTGT	48	2454
465572	16841	16860	TATACATCATCACACATTTG	46	2455

465573	16842	16861	ATATACATCATCACACATTT	28	2456
455582*	16863	16882	TATATAATTGTGTACTGGCA	79	1881
465458	16864	16883	TTATATAATTGTGTACTGGC	83	2457
465459	16865	16884	TTTATATAATTGTGTACTGG	22	2458
465460	16866	16885	TTTTATATAATTGTGTACTG	8	2459
465461	16867	16886	ATTTTATATAATTGTGTACT	0	2460
465462	16868	16887	TATTTTATATAATTGTGTAC	1	2461
465463	16869	16888	CTATTTTATATAATTGTGTA	9	2462
465464	16870	16889	ACTATTTTATATAATTGTGT	0	2463
465465	16871	16890	AACTATTTTATATAATTGTG	7	2464
465466	16872	16891	AAACTATTTTATATAATTGT	13	2465
465606	21187	21206	TAATGAGACTTTAGCACTCT	67	2466
455591*	21188	21207	ATAATGAGACTTTAGCACTC	62	1890
465607	21189	21208	AATAATGAGACTTTAGCACT	41	2467
465608	21190	21209	CAATAATGAGACTTTAGCAC	54	2468
465609	21191	21210	GCAATAATGAGACTTTAGCA	6	2469
465610	21193	21212	CTGCAATAATGAGACTTTAG	77	2470
465611	21194	21213	ACTGCAATAATGAGACTTTA	53	2471
465612	21195	21214	AACTGCAATAATGAGACTTT	39	2472
465266	21638	21657	ATTTGAATAAATGAATGAAA	0	2473
465267	21639	21658	TATTTGAATAAATGAATGAA	0	2474
465268	21640	21659	ATATTTGAATAAATGAATGA	0	2475

465269	21641	21660	AATATTTGAATAAATGAATG	0	2476
465270	21642	21661	AAATATTTGAATAAATGAAT	0	2477
465271	21643	21662	CAAATATTTGAATAAATGAA	0	2478
465272	21644	21663	TCAAATATTTGAATAAATGA	0	2479
465273	21645	21664	CTCAAATATTTGAATAAATG	0	2480
465274	21646	21665	GCTCAAATATTTGAATAAAT	0	2481
465275	21647	21666	TGCTCAAATATTTGAATAAA	6	2482
465276	21648	21667	ATGCTCAAATATTTGAATAA	0	2483
465277	21649	21668	AATGCTCAAATATTTGAATA	0	2484
465278	21650	21669	GAATGCTCAAATATTTGAAT	19	2485
465279	21651	21670	AGAATGCTCAAATATTTGAA	0	2486
465280	21652	21671	CAGAATGCTCAAATATTTGA	5	2487
465281	21653	21672	ACAGAATGCTCAAATATTTG	9	2488
465282	21654	21673	TACAGAATGCTCAAATATTT	1	2489
465283	21655	21674	CTACAGAATGCTCAAATATT	0	2490
465284	21656	21675	ACTACAGAATGCTCAAATAT	0	2491
465285	21657	21676	AACTACAGAATGCTCAAATA	2	2492
465286	21658	21677	CAACTACAGAATGCTCAAAT	12	2493
465287	21659	21678	GCAACTACAGAATGCTCAAA	26	2494
465288	21660	21679	AGCAACTACAGAATGCTCAA	39	2495
465289	21661	21680	CAGCAACTACAGAATGCTCA	53	2496
465290	21662	21681	CCAGCAACTACAGAATGCTC	26	2497

465291	21663	21682	CCCAGCAACTACAGAATGCT	42		2498
465292	21664	21683	CCCCAGCAACTACAGAATGC	40		2499
465293	21665	21684	TCCCCAGCAACTACAGAATG	13		2500
465294	21666	21685	TTCCCCAGCAACTACAGAAT	30		2501
465295	21667	21686	TTTCCCCAGCAACTACAGAA	16		2502
465296	21668	21687	ATTTCCCCAGCAACTACAGA	5		2503
465297	21669	21688	TATTTCCCCAGCAACTACAG	7		2504
465298	21670	21689	CTATTTCCCCAGCAACTACA	20		2505
465299	21671	21690	GCTATTTCCCCAGCAACTAC	7		2506
465300	21672	21691	TGCTATTTCCCCAGCAACTA	25		2507
465301	21673	21692	CTGCTATTTCCCCAGCAACT	31		2508
465302	21674	21693	ACTGCTATTTCCCCAGCAAC	14		2509
455594*	21675	21694	CACTGCTATTTCCCCAGCAA	43		1893
465303	21676	21695	TCACTGCTATTTCCCCAGCA	23		2510
465304	21677	21696	TTCACTGCTATTTCCCCAGC	45		2511
465305	21678	21697	GTTCACTGCTATTTCCCCAG	11		2512
465306	21679	21698	AGTTCACTGCTATTTCCCCA	62		2513
465307	21680	21699	CAGTTCACTGCTATTTCCCC	52		2514
465308	21681	21700	TCAGTTCACTGCTATTTCCC	40		2515
465309	21682	21701	TTCAGTTCACTGCTATTTCC	29		2516
465310	21683	21702	CTTCAGTTCACTGCTATTTC	40		2517
465311	21684	21703	TCTTCAGTTCACTGCTATTT	25		2518

465312	21685	21704	TTCTTCAGTTCACTGCTATT	18	2519
465313	21686	21705	ATTCTTCAGTTCACTGCTAT	7	2520
465314	21687	21706	CATTCTTCAGTTCACTGCTA	33	2521
465315	21688	21707	ACATTCTTCAGTTCACTGCT	39	2522
465316	21689	21708	GACATTCTTCAGTTCACTGC	49	2523
465317	21690	21709	AGACATTCTTCAGTTCACTG	50	2524
465318	21691	21710	AAGACATTCTTCAGTTCACT	37	2525
465319	21692	21711	AAAGACATTCTTCAGTTCAC	26	2526
465320	21693	21712	CAAAGACATTCTTCAGTTCA	13	2527
465321	21694	21713	ACAAAGACATTCTTCAGTTC	0	2528
465322	21695	21714	AACAAAGACATTCTTCAGTT	11	2529
465323	21696	21715	GAACAAAGACATTCTTCAGT	10	2530
465324	21697	21716	AGAACAAAGACATTCTTCAG	14	2531
465325	21698	21717	AAGAACAAAGACATTCTTCA	7	2532
465326	21699	21718	TAAGAACAAAGACATTCTTC	13	2533
465327	21700	21719	ATAAGAACAAAGACATTCTT	1	2534
465328	21701	21720	CATAAGAACAAAGACATTCT	16	2535
465329	21702	21721	CCATAAGAACAAAGACATTC	38	2536
465330	21703	21722	CCCATAAGAACAAAGACATT	11	2537
465331	21704	21723	CCCCATAAGAACAAAGACAT	0	2538
465332	21705	21724	GCCCCATAAGAACAAAGACA	30	2539
465333	21706	21725	AGCCCCATAAGAACAAAGAC	22	2540

465334	21707	21726	AAGCCCCATAAGAACAAAGA	21		2541
465613	26034	26053	TCTCCAGCCTACAGATGACT	32		2542
465614	26035	26054	CTCTCCAGCCTACAGATGAC	31		2543
465615	26036	26055	TCTCTCCAGCCTACAGATGA	29		2544
465616	26037	26056	CTCTCTCCAGCCTACAGATG	22		2545
465617	26038	26057	CCTCTCTCCAGCCTACAGAT	44		2546
465618	26039	26058	TCCTCTCTCCAGCCTACAGA	41		2547
465619	26040	26059	TTCCTCTCTCCAGCCTACAG	32		2548
465620	26041	26060	GTTCCTCTCTCCAGCCTACA	0		2549
465621	26042	26061	AGTTCCTCTCTCCAGCCTAC	44		2550
465622	26043	26062	CAGTTCCTCTCTCCAGCCTA	39		2551
465623	26044	26063	CCAGTTCCTCTCTCCAGCCT	47		2552
465624	26045	26064	TCCAGTTCCTCTCTCCAGCC	49		2553
465625	26046	26065	TTCCAGTTCCTCTCTCCAGC	46		2554
465626	26047	26066	CTTCCAGTTCCTCTCTCCAG	47		2555
465627	26048	26067	CCTTCCAGTTCCTCTCTCCA	28		2556
465628	26049	26068	CCCTTCCAGTTCCTCTCTCC	28		2557
465629	26050	26069	CCCCTTCCAGTTCCTCTCTC	21		2558
465630	26051	26070	GCCCCTTCCAGTTCCTCTCT	65		2559
465631	26052	26071	AGCCCCTTCCAGTTCCTCTC	60		2560
465632	26053	26072	TAGCCCCTTCCAGTTCCTCT	56		2561
465633	26054	26073	TTAGCCCCTTCCAGTTCCTC	52		2562

465634	26055	26074	TTTAGCCCCTTCCAGTTCCT	53		2563
465635	26056	26075	CTTTAGCCCCTTCCAGTTCC	39		2564
465636	26057	26076	ACTTTAGCCCCTTCCAGTTC	31		2565
465637	26058	26077	AACTTTAGCCCCTTCCAGTT	46		2566
465638	26059	26078	CAACTTTAGCCCCTTCCAGT	37		2567
465639	26060	26079	CCAACTTTAGCCCCTTCCAG	48		2568
455611*	26061	26080	GCCAACTTTAGCCCCTTCCA	62		1870
465640	26062	26081	AGCCAACTTTAGCCCCTTCC	71		2569
465641	26063	26082	CAGCCAACTTTAGCCCCTTC	70		2570
465642	26064	26083	TCAGCCAACTTTAGCCCCTT	66		2571
465643	26065	26084	CTCAGCCAACTTTAGCCCCT	35		2572
465644	26066	26085	ACTCAGCCAACTTTAGCCCC	49		2573
465645	26067	26086	TACTCAGCCAACTTTAGCCC	33		2574
465646	26068	26087	CTACTCAGCCAACTTTAGCC	28		2575
465647	26069	26088	ACTACTCAGCCAACTTTAGC	12		2576
465648	26070	26089	AACTACTCAGCCAACTTTAG	34		2577
465649	26071	26090	TAACTACTCAGCCAACTTTA	26		2578
455637*	37873	37892	GTACTTTACATGTGCAGCAC	78		1931
465650	37874	37893	TGTACTTTACATGTGCAGCA	71		2579
465651	37875	37894	GTGTACTTTACATGTGCAGC	75		2580
465652	37876	37895	TGTGTACTTTACATGTGCAG	65		2581
465653	37877	37896	CTGTGTACTTTACATGTGCA	65		2582

465654	37878	37897	CCTGTGTACTTTACATGTGC	60	2583
465655	37879	37898	TCCTGTGTACTTTACATGTG	51	2584
465656	37880	37899	CTCCTGTGTACTTTACATGT	48	2585
465657	37881	37900	TCTCCTGTGTACTTTACATG	25	2586
465658	37882	37901	ATCTCCTGTGTACTTTACAT	33	2587
465659	37883	37902	AATCTCCTGTGTACTTTACA	23	2588
465660	37884	37903	AAATCTCCTGTGTACTTTAC	24	2589
465661	37885	37904	TAAATCTCCTGTGTACTTTA	26	2590
465666	37886	37905	CTAAATCTCCTGTGTACTTT	16	2591
465667	37887	37906	TCTAAATCTCCTGTGTACTT	27	2592
465668	37888	37907	TTCTAAATCTCCTGTGTACT	30	2593
465669	37889	37908	TTTCTAAATCTCCTGTGTAC	30	2594
465670	37890	37909	TTTTCTAAATCTCCTGTGTA	11	2595
465671	37891	37910	GTTTTCTAAATCTCCTGTGT	37	2596
465672	37892	37911	AGTTTTCTAAATCTCCTGTG	49	2597
465686	37893	37912	AAGTTTTCTAAATCTCCTGT	19	2598
465687	37894	37913	GAAGTTTTCTAAATCTCCTG	46	2599
465688	37895	37914	CGAAGTTTTCTAAATCTCCT	53	2600
465689	37896	37915	ACGAAGTTTTCTAAATCTCC	45	2601
465690	37897	37916	TACGAAGTTTTCTAAATCTC	9	2602
465706	37898	37917	CTACGAAGTTTTCTAAATCT	14	2603
465707	37899	37918	GCTACGAAGTTTTCTAAATC	32	2604

455677*	45512	45531	TTCCAATATTTGTACCCTCA	49	1971
465574	45513	45532	TTTCCAATATTTGTACCCTC	43	2605
465575	45514	45533	CTTTCCAATATTTGTACCCT	50	2606
465576	45515	45534	GCTTTCCAATATTTGTACCC	58	2607
465577	45516	45535	TGCTTTCCAATATTTGTACC	35	2608
465578	45517	45536	TTGCTTTCCAATATTTGTAC	31	2609
465579	45518	45537	CTTGCTTTCCAATATTTGTA	29	2610
465580	45519	45538	CCTTGCTTTCCAATATTTGT	35	2611
465581	45520	45539	CCCTTGCTTTCCAATATTTG	26	2612
465582	45521	45540	TCCCTTGCTTTCCAATATTT	34	2613
465583	45522	45541	GTCCCTTGCTTTCCAATATT	39	2614
465584	45523	45542	TGTCCCTTGCTTTCCAATAT	44	2615
465585	45524	45543	CTGTCCCTTGCTTTCCAATA	60	2616
465586	45525	45544	TCTGTCCCTTGCTTTCCAAT	59	2617
465587	45526	45545	TTCTGTCCCTTGCTTTCCAA	47	2618
455681*	46091	46110	TTTCCAGATATTTTCCCATA	48	1975
465335	46092	46111	GTTTCCAGATATTTTCCCAT	71	2619
465336	46093	46112	TGTTTCCAGATATTTTCCCA	53	2620
466676	48396	48415	CTTTCCATTCTAGTTTTACC	1	2621
466677	48397	48416	ACTTTCCATTCTAGTTTTAC	19	2622
466678	48398	48417	CACTTTCCATTCTAGTTTTA	23	2623
466679	48399	48418	ACACTTTCCATTCTAGTTTT	9	2624

466680	48400	48419	CACACTTTCCATTCTAGTTT	31	2625
466681	48401	48420	CCACACTTTCCATTCTAGTT	64	2626
455703*	48402	48421	GCCACACTTTCCATTCTAGT	75	1997
466682	48403	48422	AGCCACACTTTCCATTCTAG	56	2627
466683	48404	48423	AAGCCACACTTTCCATTCTA	40	2628
466684	48405	48424	CAAGCCACACTTTCCATTCT	24	2629
466685	48406	48425	TCAAGCCACACTTTCCATTC	39	2630
466686	48407	48426	CTCAAGCCACACTTTCCATT	38	2631
466687	48408	48427	GCTCAAGCCACACTTTCCAT	53	2632
466688	48409	48428	AGCTCAAGCCACACTTTCCA	59	2633
466689	48410	48429	CAGCTCAAGCCACACTTTCC	51	2634
466690	48411	48430	CCAGCTCAAGCCACACTTTC	43	2635
466691	48412	48431	ACCAGCTCAAGCCACACTTT	30	2636
466692	48413	48432	TACCAGCTCAAGCCACACTT	35	2637
466693	48414	48433	TTACCAGCTCAAGCCACACT	32	2638
466694	48415	48434	GTTACCAGCTCAAGCCACAC	53	2639
466695	48416	48435	GGTTACCAGCTCAAGCCACA	54	2640
455704*	48417	48436	TGGTTACCAGCTCAAGCCAC	61	1998
455708*	48728	48747	CCCACAGTGACAGTGACTCA	58	2002
465708	48729	48748	TCCCACAGTGACAGTGACTC	61	2641
465709	48730	48749	TTCCCACAGTGACAGTGACT	60	2642
465710	48731	48750	CTTCCCACAGTGACAGTGAC	55	2643

455723*	52033	52052	ACCAGTTTTCTAGCCGATCT	24		2017
466696	52034	52053	TACCAGTTTTCTAGCCGATC	54		2644
466697	52035	52054	TTACCAGTTTTCTAGCCGAT	41		2645
466698	52036	52055	TTTACCAGTTTTCTAGCCGA	37		2646
466699	52037	52056	CTTTACCAGTTTTCTAGCCG	17		2647
466700	52038	52057	CCTTTACCAGTTTTCTAGCC	11		2648
466701	52039	52058	TCCTTTACCAGTTTTCTAGC	24		2649
466702	52040	52059	ATCCTTTACCAGTTTTCTAG	1		2650
466703	52041	52060	CATCCTTTACCAGTTTTCTA	7		2651
466704	52042	52061	TCATCCTTTACCAGTTTTCT	0		2652
466705	52043	52062	TTCATCCTTTACCAGTTTTC	15		2653
466706	52044	52063	TTTCATCCTTTACCAGTTTT	0		2654
466707	52045	52064	CTTTCATCCTTTACCAGTTT	9		2655
466708	52046	52065	TCTTTCATCCTTTACCAGTT	0		2656
466709	52047	52066	TTCTTTCATCCTTTACCAGT	8		2657
466710	52048	52067	CTTCTTTCATCCTTTACCAG	11		2658
466711	52049	52068	GCTTCTTTCATCCTTTACCA	8		2659
466712	52050	52069	AGCTTCTTTCATCCTTTACC	6		2660
466713	52051	52070	AAGCTTCTTTCATCCTTTAC	0		2661
466714	52052	52071	AAAGCTTCTTTCATCCTTTA	18		2662
466715	52053	52072	AAAAGCTTCTTTCATCCTTT	2		2663
466716	52054	52073	GAAAAGCTTCTTTCATCCTT	9		2664

466717	52055	52074	GGAAAAGCTTCTTTCATCCT	1		2665
455724*	52056	52075	AGGAAAAGCTTCTTTCATCC	0		2018
455762*	59913	59932	CCAAGTGTTTGAATTCTGCA	36		2056
466766	59914	59933	ACCAAGTGTTTGAATTCTGC	58		2666
466767	59915	59934	TACCAAGTGTTTGAATTCTG	32		2667
466768	59916	59935	ATACCAAGTGTTTGAATTCT	21		2668
466769	59917	59936	CATACCAAGTGTTTGAATTC	9		2669
466770	59918	59937	ACATACCAAGTGTTTGAATT	14		2670
466771	59919	59938	CACATACCAAGTGTTTGAAT	26		2671
466772	59920	59939	CCACATACCAAGTGTTTGAA	8		2672
466773	59921	59940	CCCACATACCAAGTGTTTGA	19		2673
466774	59922	59941	TCCCACATACCAAGTGTTTG	5		2674
466775	59923	59942	CTCCCACATACCAAGTGTTT	25		2675
466776	59924	59943	CCTCCCACATACCAAGTGTT	32		2676
466777	59925	59944	TCCTCCCACATACCAAGTGT	12		2677
466778	59926	59945	CTCCTCCCACATACCAAGTG	10		2678
466779	59927	59946	GCTCCTCCCACATACCAAGT	15		2679
466780	59928	59947	AGCTCCTCCCACATACCAAG	5		2680
466781	59929	59948	GAGCTCCTCCCACATACCAA	23		2681
465768	61325	61344	CAGTCTAGAATAGCCATGGA	71		2682
465769	61326	61345	ACAGTCTAGAATAGCCATGG	72		2683
465770	61327	61346	GACAGTCTAGAATAGCCATG	78		2684

465771	61328	61347	AGACAGTCTAGAATAGCCAT	74		2685
465772	61329	61348	GAGACAGTCTAGAATAGCCA	70		2686
465773	61330	61349	AGAGACAGTCTAGAATAGCC	70		2687
465774	61331	61350	CAGAGACAGTCTAGAATAGC	63		2688
465775	61332	61351	ACAGAGACAGTCTAGAATAG	55		2689
465776	61333	61352	CACAGAGACAGTCTAGAATA	64		2690
465777	61334	61353	TCACAGAGACAGTCTAGAAT	71		2691
465778	61335	61354	ATCACAGAGACAGTCTAGAA	79		2692
465779	61336	61355	TATCACAGAGACAGTCTAGA	66		2693
465780	61337	61356	ATATCACAGAGACAGTCTAG	64		2694
465781	61338	61357	AATATCACAGAGACAGTCTA	48		2695
465782	61339	61358	AAATATCACAGAGACAGTCT	65		2696
455786*	61340	61359	CAAATATCACAGAGACAGTC	63		2070
465783	61341	61360	GCAAATATCACAGAGACAGT	69		2697
465786	61342	61361	TGCAAATATCACAGAGACAG	78		2698
465787	61343	61362	ATGCAAATATCACAGAGACA	72		2699
465788	61344	61363	AATGCAAATATCACAGAGAC	59		2700
465789	61345	61364	AAATGCAAATATCACAGAGA	23		2701
465790	61346	61365	AAAATGCAAATATCACAGAG	28		2702
465791	61347	61366	TAAAATGCAAATATCACAGA	0		2703
465792	61348	61367	TTAAAATGCAAATATCACAG	12		2704
465793	61349	61368	TTTAAAATGCAAATATCACA	3		2705

465794	61350	61369	GTTTAAAATGCAAATATCAC	2	2706
465795	61351	61370	AGTTTAAAATGCAAATATCA	0	2707
465796	61352	61371	CAGTTTAAAATGCAAATATC	13	2708
465797	61353	61372	TCAGTTTAAAATGCAAATAT	0	2709
465798	61354	61373	TTCAGTTTAAAATGCAAATA	0	2710
465799	61355	61374	ATTCAGTTTAAAATGCAAAT	1	2711
465800	61356	61375	TATTCAGTTTAAAATGCAAA	0	2712
465801	61357	61376	ATATTCAGTTTAAAATGCAA	0	2713
455790*	62043	62062	CATGGTTATGTGTATCTGCA	69	2074
465337	62044	62063	ACATGGTTATGTGTATCTGC	69	2714
465338	62045	62064	CACATGGTTATGTGTATCTG	40	2715
465339	62046	62065	CCACATGGTTATGTGTATCT	32	2716
337332	66135	66154	GAAGCCCTTGCCAGCCATGT	79	1541
455840*	71610	71629	GTACAATTGCTTCAACTAGA	81	2124
466782	71611	71630	AGTACAATTGCTTCAACTAG	54	2717
466783	71612	71631	CAGTACAATTGCTTCAACTA	68	2718
466784	71613	71632	GCAGTACAATTGCTTCAACT	72	2719
465588	71614	71633	GGCAGTACAATTGCTTCAAC	69	2720
455264*	74768	74787	TCCTTAAACCTTCCTATTTC	26	1563
465226	74769	74788	CTCCTTAAACCTTCCTATTT	45	2721
455265*	74770	74789	TCTCCTTAAACCTTCCTATT	57	1564
465227	74771	74790	TTCTCCTTAAACCTTCCTAT	54	2722

455266*	74772	74791	ATTCTCCTTAAACCTTCCTA	52	1565
465228	74773	74792	GATTCTCCTTAAACCTTCCT	64	2723
455267*	74774	74793	AGATTCTCCTTAAACCTTCC	60	1566
465229	74775	74794	TAGATTCTCCTTAAACCTTC	22	2724
455268*	74776	74795	TTAGATTCTCCTTAAACCTT	55	1567
465230	74777	74796	CTTAGATTCTCCTTAAACCT	69	2725
455269*	74778	74797	GCTTAGATTCTCCTTAAACC	84	1568
465231	74779	74798	TGCTTAGATTCTCCTTAAAC	64	2726
455270*	74780	74799	ATGCTTAGATTCTCCTTAAA	50	1569
465232	74781	74800	AATGCTTAGATTCTCCTTAA	71	2727
455271*	74782	74801	AAATGCTTAGATTCTCCTTA	69	1570
465233	74783	74802	AAAATGCTTAGATTCTCCTT	69	2728
455272*	74784	74803	TAAAATGCTTAGATTCTCCT	56	1571
455281*	74872	74891	CAAGGTTGTAAGCACCCTCT	63	1580
465234	74873	74892	TCAAGGTTGTAAGCACCCTC	54	2729
455282*	74874	74893	GTCAAGGTTGTAAGCACCCT	8	1581
465235	74875	74894	AGTCAAGGTTGTAAGCACCC	65	2730
455283*	74876	74895	GAGTCAAGGTTGTAAGCACC	48	1582
455290*	74900	74919	GCAGATCAAGTCCAGGGAGA	77	1589
465236	74901	74920	AGCAGATCAAGTCCAGGGAG	80	2731
455291*	74902	74921	CAGCAGATCAAGTCCAGGGA	82	1590
465237	74903	74922	ACAGCAGATCAAGTCCAGGG	82	2732

455292*	74904	74923	AACAGCAGATCAAGTCCAGG	69	1591
455369*	75418	75437	GGTGTTCCCATACGCACAGG	75	1668
465238	75419	75438	AGGTGTTCCCATACGCACAG	68	2733
455370*	75420	75439	TAGGTGTTCCCATACGCACA	67	1669
465239	75421	75440	CTAGGTGTTCCCATACGCAC	82	2734
455371*	75422	75441	GCTAGGTGTTCCCATACGCA	85	1670
465240	75423	75442	TGCTAGGTGTTCCCATACGC	77	2735
455372*	75424	75443	GTGCTAGGTGTTCCCATACG	72	1671
455390*	75616	75635	AACTGTCTCCAGGCAGGAGG	65	1689
465241	75617	75636	CAACTGTCTCCAGGCAGGAG	51	2736
455391*	75618	75637	TCAACTGTCTCCAGGCAGGA	52	1690
465242	75619	75638	ATCAACTGTCTCCAGGCAGG	76	2737
455392*	75620	75639	CATCAACTGTCTCCAGGCAG	63	1691
465243	75621	75640	ACATCAACTGTCTCCAGGCA	70	2738
455393*	75622	75641	CACATCAACTGTCTCCAGGC	75	1692
465244	75623	75642	ACACATCAACTGTCTCCAGG	61	2739
455394*	75624	75643	GACACATCAACTGTCTCCAG	69	1693
455397*	75662	75681	TACTGAAGAGTGTTGCTGGA	77	1696
465245	75663	75682	GTACTGAAGAGTGTTGCTGG	84	2740
455398*	75664	75683	TGTACTGAAGAGTGTTGCTG	76	1697
465246	75665	75684	ATGTACTGAAGAGTGTTGCT	72	2741
455399*	75666	75685	TATGTACTGAAGAGTGTTGC	70	1698

455411*	75726	75745	AACCCAATGGTAAGCCCAAG	77	1710
465247	75727	75746	AAACCCAATGGTAAGCCCAA	61	2742
455412*	75728	75747	TAAACCCAATGGTAAGCCCA	72	1711
465248	75729	75748	TTAAACCCAATGGTAAGCCC	69	2743
455413*	75730	75749	TTTAAACCCAATGGTAAGCC	38	1712
455428*	75829	75848	TACAATCAGAGTTAAGACCA	58	1727
465249	75830	75849	CTACAATCAGAGTTAAGACC	58	2744
455429*	75831	75850	GCTACAATCAGAGTTAAGAC	71	1728
465250	75832	75851	TGCTACAATCAGAGTTAAGA	59	2745
455430*	75833	75852	TTGCTACAATCAGAGTTAAG	47	1729
455437*	75847	75866	TCCTCTCAGAACTTTTGCTA	36	1736
465251	75848	75867	CTCCTCTCAGAACTTTTGCT	47	2746
455438*	75849	75868	GCTCCTCTCAGAACTTTTGC	75	1737
465252	75850	75869	AGCTCCTCTCAGAACTTTTG	71	2747
455439*	75851	75870	CAGCTCCTCTCAGAACTTTT	68	1738
465253	75852	75871	TCAGCTCCTCTCAGAACTTT	62	2748
455440*	75853	75872	CTCAGCTCCTCTCAGAACTT	58	1739
455446*	75965	75984	GTAGGTAAGCAACCCACGGG	69	1745
465254	75966	75985	GGTAGGTAAGCAACCCACGG	79	2749
455447*	75967	75986	AGGTAGGTAAGCAACCCACG	80	1476
465255	75968	75987	TAGGTAGGTAAGCAACCCAC	84	2750
455448*	75969	75988	ATAGGTAGGTAAGCAACCCA	71	1474

455456*	75985	76004	GCTTATAAACCACCTTATAG	37	1755
465256	75986	76005	AGCTTATAAACCACCTTATA	43	2751
455457*	75987	76006	CAGCTTATAAACCACCTTAT	57	1756
465257	75988	76007	GCAGCTTATAAACCACCTTA	73	2752
455458*	75989	76008	AGCAGCTTATAAACCACCTT	75	1757
465258	75990	76009	CAGCAGCTTATAAACCACCT	65	2753
455459*	75991	76010	ACAGCAGCTTATAAACCACC	46	1758
455462*	75997	76016	GCCAGGACAGCAGCTTATAA	70	1761
466718	75998	76017	GGCCAGGACAGCAGCTTATA	87	2754
455463*	75999	76018	TGGCCAGGACAGCAGCTTAT	83	1762
466719	76000	76019	GTGGCCAGGACAGCAGCTTA	76	2755
455464*	76001	76020	AGTGGCCAGGACAGCAGCTT	82	1763
455470*	76013	76032	GAATTTGAATGCAGTGGCCA	75	1769
466720	76014	76033	GGAATTTGAATGCAGTGGCC	87	2756
455471*	76015	76034	TGGAATTTGAATGCAGTGGC	75	1770
466721	76016	76035	TTGGAATTTGAATGCAGTGG	72	2757
455472*	76017	76036	ATTGGAATTTGAATGCAGTG	60	1771

EJEMPLO 35: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 HUMANA EN CÉLULAS HUVEC

Los gápmeros del estudio que se describen en el Ejemplo 3 que exhiben inhibición *in vitro* significativa de STAT3 se probaron a diferentes dosis en células HuVEC. Se plaquearon las células a una densidad de 5,000 células por pocillo y se transfectaron usando el reactivo LipofectAMINE2000® con concentraciones de 8.8 nM, 17.5 nM, 35.0 nM y 70.0 nM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 56. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS199, que se describió previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

Como se ilustra en la Tabla 56, los niveles de ARNm de STAT3 se redujeron en una forma dependiente de la dosis en las células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

TABLA 56

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de STAT3 humana en células HuVEC usando reactivo LipofectAMINE 2000®

ISIS N°	8.8 nM	17.5 nM	35.0 nM	70.0 nM
337332	50	71	81	88
455269	62	69	79	82
455291	72	81	87	88
455371	71	83	88	90
455447	53	70	81	79
455463	68	79	84	87
455464	69	78	84	86
455471	62	82	88	90
455547	43	64	75	87
455565	41	73	83	92
455582	50	67	81	87
455637	50	65	79	85
455703	45	65	81	85
455840	58	70	80	85
465236	62	76	81	85
465237	67	81	86	90
465239	64	77	85	92
465240	50	66	76	83
465245	70	81	87	87
465254	54	75	81	86

465255	63	74	84	85
465335	46	62	74	80
465449	49	71	84	84
465458	54	73	84	88
465509	66	80	86	83
465510	48	66	76	82
465511	56	68	75	79
465526	53	68	76	76
465537	41	60	77	85
465588	52	73	76	79
465610	35	57	71	79
465730	51	75	85	87
465739	72	81	88	90
465740	70	81	86	89
465742	63	76	87	88
465748	48	62	67	74
465751	70	81	87	87
465752	76	82	88	89
465754	70	83	86	87
465755	70	81	85	89
465770	52	69	77	77
465771	40	55	64	75
465778	40	69	75	77
465786	56	71	76	83
465830	66	77	83	82
465833	50	67	79	86
465834	42	67	77	81
465886	58	73	83	87
465888	49	68	82	12
465926	43	64	76	82
466661	47	63	80	84
466666	39	66	80	86
466670	73	83	89	90

466718	73	78	84	85
466719	63	73	83	83
466720	80	87	86	86

EJEMPLO 36: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 HUMANA EN CÉLULAS HUVEC

Los gápmeros del estudio que se describen en el Ejemplo 3 se probaron adicionalmente a diferentes dosis en células HuVEC. Se plaquearon las células a una densidad de 20,000 células por pocillo y se transfectaron usando electroporación con concentraciones de 187.5 nM, 375.0 nM, 750.0 nM, 1,500.0 nM, 3,000.0 nM y 6,000.0 nM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 57. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS199, que se describió previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

Como se ilustra en la Tabla 57, los niveles de ARNm de STAT3 se redujeron de forma significativa en una forma dependiente de la dosis en las células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

TABLA 57

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de STAT3 humana en células HuVEC usando electroporación

ISIS N°	187.5 nM	375.0 nM	750.0 nM	1500.0 nM	3000.0 nM	6000.0 nM	IC_{50} (μM)
337332	35	51	73	84	97	98	0.3
455269	64	76	87	89	92	90	<0.2
455291	63	79	88	90	90	93	<0.2
455371	50	81	90	94	96	95	<0.2
455447	37	49	61	91	94	96	0.3
455463	57	78	89	93	95	94	<0.2
455464	57	67	78	80	79	87	<0.2
455471	50	73	81	86	91	92	<0.2
455547	19	49	63	82	92	94	0.5
455582	42	62	82	92	97	97	0.2
455637	44	60	63	87	91	92	0.2
455840	39	58	75	81	88	89	0.2
465236	56	67	71	83	91	92	<0.2
465237	56	75	87	92	94	93	<0.2
465239	60	78	88	95	99	99	<0.2
465240	49	67	80	85	94	95	0.1
465245	54	67	81	86	90	90	<0.2

465254	28	50	63	76	91	92	0.4
465255	46	55	78	89	92	94	0.2
465335	25	52	65	89	95	95	0.4
465449	28	56	78	72	96	96	0.3
465458	19	68	84	91	96	97	0.3
465509	42	68	77	84	88	88	0.1
465510	15	43	60	73	85	88	0.6
465511	19	39	47	68	79	86	0.8
465526	15	39	54	64	82	84	0.8
465537	44	65	82	90	95	90	0.1
465565	12	45	62	80	93	97	0.6
465588	44	66	82	85	85	87	0.1
465610	33	56	72	89	96	97	0.3
465730	48	51	72	91	94	91	0.2
465739	42	78	85	93	96	92	0.9
465740	54	69	80	96	98	98	<0.2
465742	67	55	91	93	87	93	<0.2
465748	49	67	88	96	98	99	0.1
465751	56	63	82	91	98	98	0.1
465752	62	79	84	93	96	90	<0.2
465754	41	69	84	63	94	93	<0.2
465755	47	56	67	83	93	97	0.2
465770	52	54	70	85	88	83	0.2
465771	38	62	76	83	84	86	0.2
465778	40	58	79	84	96	96	0.2
465786	41	68	88	94	95	93	0.1
465830	50	73	89	93	88	92	<0.2
465833	27	44	76	89	88	97	0.4
465834	8	27	57	80	93	97	0.7
465886	58	79	90	97	98	96	<0.2
465888	39	60	65	90	94	97	0.3
465926	23	50	41	85	93	94	0.5
466661	31	58	76	90	95	96	0.3

466666	44	55	79	92	96	97	0.2
466670	50	54	82	96	96	96	0.2
466718	55	79	90	93	95	96	<0.2
466719	44	52	73	65	87	91	0.3
466720	48	78	90	90	90	90	<0.2

EJEMPLO 37: TOLERABILIDAD DE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO CONTRA STAT3 HUMANA EN RATONES CD1

Treinta y nueve oligonucleótidos antisentido que exhiben un nivel alto de potencia se probaron adicionalmente para tolerabilidad *in vivo*.

Se inyectaron grupos de ocho ratones CD1 macho por vía subcutánea dos veces por semana durante 6 semanas con 50 mg/kg de oligonucleótidos antisentido ISIS. Un grupo de ocho ratones CD1 macho se inyectó por vía subcutánea dos veces por semana durante 6 semanas con PBS. Este grupo sirvió como grupo control. Tres días después de la última dosis se sacrificaron los ratones y se colectaron los órganos y el plasma para análisis adicionales. El peso del hígado, bazo y riñones se midieron al final del estudio y se compararon con los ratones tratados con PBS.

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

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de nitrógeno uréico sanguíneo (BUN) usando un analizador para química clínica automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY).

La sangre obtenida de todos los grupos de ratones se enviaron a Antech Diagnostics para medidas de hematocrito (HCT), volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH) y concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC) y análisis, así como medidas de los recuentos diferenciales de células sanguíneas, tales como WBC, RBC y contenido total de hemoglobina.

Entre los 39 oligonucleótidos antisentido ensayados, ciertos oligonucleótidos antisentido, incluyendo a ISIS 455265, ISIS 455269, ISIS 455271, ISIS 455272, ISIS 455291, ISIS 455371, ISIS 455394, ISIS 455703, ISIS 455429, ISIS 455471, ISIS 455527, ISIS 455530, ISIS 455536, ISIS 455548, ISIS 455611, ISIS 465236, ISIS 465237, ISIS 465588, ISIS 465740, ISIS 465754, ISIS 465830, ISIS 466670, e ISIS 466720 cumplieron con los umbrales de tolerabilidad para el peso de órganos, ALT, AST, BUN y parámetros hematológicos.

EJEMPLO 38: MEDIDA DE LA VIDA MEDIA DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN HÍGADO DE RATONES CD1

Los ratones CD1 se trataron con oligonucleótidos antisentido ISIS descritos y se evaluó la vida media del oligonucleótido en el hígado.

TRATAMIENTO

Se inyectaron grupos de doce ratones CD1 por vía subcutánea dos veces por semana durante 2 semanas con 50 mg/kg de ISIS 455265, ISIS 455269, ISIS 455271, ISIS 455272, ISIS 455291, ISIS 455371, ISIS 455393, ISIS 455553, ISIS 455582, ISIS 455703, ISIS 455394, ISIS 455429, ISIS 455438, ISIS 455471, ISIS 455527, ISIS 455530, ISIS 455536, ISIS 455540, ISIS 455548, ISIS 455611, ISIS 455429, ISIS 455463, ISIS 455464, ISIS 455471, ISIS 455527, ISIS 455611, ISIS 465236, ISIS 465237, ISIS 465239, ISIS 465588, ISIS 465740, ISIS 465742, ISIS 465751, ISIS 465752, ISIS 465754, ISIS 465830, ISIS 466670, ISIS 466718, e ISIS 466720. Cuatro ratones de cada grupo se sacrificaron 3 días, 28 días y 56 días luego de la última dosis. Los hígados se colectaron para el análisis.

MEDIDAS DE CONCENTRACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDO

Se midió la concentración de oligonucleótido de longitud completa así como la concentración total de oligonucleótido (incluyendo la forma degradada). El método usado es una modificación de métodos previamente publicados (Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999), que incluye una extracción en fenol-cloroformo (líquido-líquido) seguida por una extracción en fase sólida. Se agregó un estándar interno (ISIS 355868, un oligonucleótido 27-mero de fosforotioato con modificación 2'-O-metoxietilo, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTTT, designada en la presente como SEQ ID Nº 2758) antes de la extracción. Se calcularon las concentraciones de muestra de tejido usando curvas de calibración, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de aproximadamente 1.14 µg/g. Luego se calcularon las vidas medias usando el programa de computación WinNonlin (PHARSIGHT).

La vida media de cada oligonucleótido se presenta en la Tabla 58. Los oligonucleótidos antisentido con vidas medias dentro de entre 11 y 34 días se eligieron para estudios adicionales.

TABLA 58

Vida media de oligonucleótidos ISIS en el hígado de ratones CD1

ISIS N°	Vida media (días)
455265	12
455269	48
455271	16
455272	16
455291	19
455371	28
455394	17
455703	27
455429	15
455471	15
455527	13
455530	12
455536	20
455548	13
455611	37
465236	22
465237	17
465588	14
465740	15
465754	23
465830	23
466670	11

466720	17

EJEMPLO 39: TOLERABILIDAD DE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO CONTRA STAT3 HUMANA EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY

Veintitrés oligonucleótidos antisentido que exhiben un nivel alto de potencia se probaron adicionalmente para tolerabilidad *in vivo*.

Se inyectaron grupos de cuatro ratas Sprague-Dawley por vía subcutánea dos veces por semana durante 6 semanas con 50 mg/kg de oligonucleótidos antisentido ISIS. Un grupo de ratas se inyectó por vía subcutánea dos veces por semana durante 6 semanas con PBS. Este grupo sirvió como el grupo control. Tres días luego de la última dosis se sacrificaron las ratas y se colectaron los órganos y el plasma para análisis adicionales. El peso del hígado, bazo y riñones se midieron al final del estudio y se compararon con ratas tratadas con PBS.

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de transaminasas usando un analizador para química clínica automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron las concentraciones plasmáticas de AST (aspartato transaminasa) y bilirrubina total.

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron el BUN, proteínas totales en orina y creatinina usando un analizador para química clínica automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY).

Entre los 23 oligonucleótidos antisentido ensayados, ciertos oligonucleótidos antisentido, que incluye a ISIS 455269, ISIS 455291, ISIS 455371, ISIS 455703, ISIS 455429, ISIS 465236, ISIS 465237, ISIS 465754, ISIS 465830, e ISIS 466670 cumplieron con los umbrales de tolerabilidad para el peso de órganos, AST, bilirrubina, BUN, proteínas totales en orina y creatinina.

EJEMPLO 40: MEDIDA DE LA VIDA MEDIA DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN HÍGADO Y RIÑÓN DE RATAS SPRAGUE-DAWLEY

Se trataron ratas Sprague Dawley con oligonucleótidos antisentido ISIS y se evaluaron la vida media del oligonucleótido así como el tiempo transcurrido para la degradación y eliminación del oligonucleótido del hígado y riñones.

TRATAMIENTO

Se inyectaron grupos de cuatro ratas Sprague Dawley por vía subcutánea dos veces por semana durante 2 semanas con 20 mg/kg de ISIS 455265, ISIS 455269, ISIS 455271, ISIS 455272, ISIS 455291, ISIS 455371, ISIS 455394, ISIS 455703, ISIS 455429, ISIS 455471, ISIS 455527, ISIS 455530, ISIS 455536, ISIS 455548, ISIS 455611, ISIS 465236, ISIS 465237, ISIS 465588, ISIS 465740, ISIS 465754, ISIS 465830, ISIS 466670, e ISIS 466720. Tres días después de la última dosis, se sacrificaron las ratas y se recolectaron los hígados y riñones para análisis.

MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDO

Se midió la concentración del oligonucleótido de longitud completa así como la concentración total de oligonucleótido (que incluye la forma degradada). El método usado es una modificación de métodos previamente publicados (Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999), que incluye una extracción en fenol-cloroformo (líquido-líquido) seguido por una extracción en fase sólida. Se agregó un estándar interno (ISIS 355868, un oligonucleótido 27-mero de fosforotioato con modificación 2'-O-metoxietilo, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTTT, designada en la presente como SEQ ID Nº 2758) antes de la extracción. Se calcularon las concentraciones de muestra de tejido usando curvas de calibración, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de aproximadamente 1.14 µg/g. Se calculó la relación de riñón a hígado de la concentración del oligonucleótido de longitud completa, así como la de la concentración de oligonucleótido total. Los resultados se presentan en la Tabla 59.

TABLA 59

Relación riñón a hígado de las concentraciones de oligonucleótido de longitud completa y total en ratas Sprague-Dawley

ISIS N°	Longitud completa	Total
455265	3.6	3.8
455269	2.1	2.4
455271	3.1	3.0
455272	2.9	3.1
455291	2.7	3.3
455371	2.2	2.4
455394	1.8	2.2
455703	2.3	2.8
455429	3.8	3.9
455471	2.7	2.9
455527	5.0	3.9
455530	3.9	2.9
455536	3.5	3.6
455548	2.5	2.9
455611	2.3	2.3
465236	2.3	3.3
465237	2.4	2.7
465588	2.8	2.6
465740	2.4	2.6
465754	1.6	1.8
465830	5.1	2.6
466670	3.1	4.4
466720	2.3	2.6

EJEMPLO 41: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS SK-BR-3

Se probaron gápmeros de los estudios de tolerabilidad en roedores descritos en los Ejemplos 6-9 a diferentes dosis en células SK-BR-3. Se plaquearon las células con una densidad de 4,000 células por pocillo. Se incubaron las células sin ningún reactivo de transfección con concentraciones de 0.02 µM, 0.10 µM, 0.50 µM, 1.00 µM, 2.50 µM y 10.00 µM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 60. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS199, como el que se describió previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 60.

TABLA 60

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de STAT3 humana mediante captación libre de oligonucleótido ISIS por las células SK-BR-3

ISIS N°	0.02 µM	0.1 µM	0.5 µM	1 µM	2.5 µM	10 µM	IC_{50} (µM)
455265	22	14	25	19	30	37	>10.0
455269	17	17	21	45	64	67	1.3
455271	0	0	0	11	16	53	9.0
455272	0	0	0	5	12	51	9.6
455291	9	15	31	45	58	76	1.2
455371	16	20	34	37	54	70	1.7
455394	0	2	14	6	30	55	8.3
455429	0	0	0	12	29	57	7.9
455471	0	16	28	24	42	58	2.9
455527	5	15	14	21	35	45	>10.0
455530	0	14	12	14	28	36	>10.0
455536	0	0	0	1	8	26	>10.0
455548	16	14	17	17	20	44	>10.0
455611	19	1	3	21	35	38	>10.0
455703	0	0	0	0	3	33	>10.0
465236	0	7	15	19	37	60	3.8
465237	2	13	22	29	50	67	2.3
465588	5	3	21	18	42	44	>10.0
465740	1	14	0	19	14	39	>10.0
465754	0	0	4	15	39	55	7.7
465830	6	18	23	17	42	67	3.0
466670	21	19	33	35	58	71	1.6
466720	0	0	11	13	27	53	8.7

EJEMPLO 42: MEDIDA DE LA VISCOSIDAD DE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO ISIS CONTRA STAT3 HUMANA

La viscosidad de oligonucleótidos antisentido seleccionados de los estudios descritos en los Ejemplos 6-10 se midió con la ayuda de oligonucleótidos antisentido para separación por tamizaje que tienen una viscosidad mayor a 40 cP. Los oligonucleótidos que tienen una viscosidad mayor de 40 cP podrían ser muy viscosos para ser administrados a cualquier sujeto.

Los oligonucleótidos ISIS (32-35 mg) se pesaron en un vial de vidrio, se agregaron 120 µL de agua y se disolvió el oligonucleótido antisentido en la solución por calentamiento del vial a 50°C. Parte (75 µL) de la muestra precalentada se transfirió con pipeta a un microviscosímetro (Cambridge). La temperatura del microviscosímetro se ajustó a 25°C y se midió la viscosidad de la muestra. Otra

parte (20 µL) de la muestra precalentada se transfirió con pipeta a 10 mL de agua para lectura en UV a 260 nM a 85°C (instrumento para UV Cary). Los resultados se presentan en la Tabla 61 e indican que todas las soluciones de oligonucleótidos antisentido tienen viscosidades óptimas bajo el criterio establecido anteriormente.

TABLA 61

Viscosidad de oligonucleótidos antisentido ISIS contra STAT3 humana

ISIS N°	Viscosidad
455269	6.1
455291	13.6
466371	7.2
455703	17.6
455429	9.3
465237	26.2
465754	19.7
465830	8.1
466670	15.9

EJEMPLO 43: EFECTO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO ISIS CONTRA STAT3 HUMANA EN MONOS CINOMÓLOGOS

Nueve oligonucleótidos antisentido que exhiben un nivel alto de potencia se probaron adicionalmente en monos cinomólogos. Se evaluó la tolerabilidad y perfil farmacocinético de oligonucleótidos antisentido en el hígado y riñón.

El estudio se realizó en el Instituto de toxicología de Corea, República de Corea. Antes del estudio, los monos se mantuvieron en cuarentena durante un periodo de tiempo de 30 días, durante el cual se realizaron paneles estándares de química sérica y hematología, examen de huevos y parásitos en muestras fecales y una prueba de tuberculosis, para separar por tamizaje los monos anormales o enfermos. Nueve grupos de cuatro monos cinomólogos macho asignados al azar se inyectaron por vía subcutánea tres veces por semana durante la primera semana y posteriormente dos veces por semana durante las siguientes 7 semanas, con 25 mg/kg de oligonucleótidos antisentido ISIS. Un grupo control de 4 monos cinomólogos se inyectó con PBS por vía subcutánea tres veces por semana durante la primera semana y posteriormente dos veces por semana durante las siguientes 7 semanas. Los sacrificios terminales de todos los grupos se realizaron en el día 55, el cual fue 48 horas luego de la última dosis.

Durante el periodo del estudio, los monos se observaron diariamente para signos de enfermedad o sufrimiento. Cualquier animal que mostró efectos adversos al tratamiento se eliminó y se llevó al veterinario y al director del estudio.

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la salud general de los animales, se midieron los pesos del bazo, corazón, riñón, hígado y vesícula biliar en el día 55. Se midieron los pesos de los órganos y los pesos del grupo de tratamiento se compararon con los correspondientes pesos de control de PBS.

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática y renal, se recolectaron muestras de sangre de todos los grupos de estudio. Los monos se ayunaron durante la noche antes de la recolección de sangre. Aproximadamente, 1 mL de cada una de las muestras de sangre re recolectó en tubos sin ningún anticoagulante para la separación de suero. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 90 minutos y luego se centrifugaron (3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente) para obtener suero. Se midieron las concentraciones de las transaminasas usando un analizador para química clínica Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Japón). Se midieron

las concentraciones plasmáticas de ALT (alanina transaminasa), AST (aspartato transaminasa) y BUN en el día 55. En el día 55 también se midió de manera similar la proteína C reactiva (CRP), la cual es sintetizada en el hígado y que es útil como marcador de inflamación.

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre factores involucrados en inflamación, se recolectó sangre en el día 55 de todos los animales para análisis de los niveles de C3 del complemento, niveles de citoquina MIP-1β y número de plaquetas.

Para el análisis del C3 del complemento, se recolectaron aproximadamente 0.5 mL de cada muestra de sangre en tubos sin anticoagulante para la separación de suero. Para los análisis de los niveles de citoquinas, se recolectaron aproximadamente 2 mL de cada muestra de sangre en tubos sin anticoagulante para la separación de suero. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 90 minutos y luego se centrifugaron (3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente) para obtener suero. El C3 del complemento se midió usando un analizador automático (analizador para química clínica Toshiba 200 FR NEO, Toshiba co., Japón). El suero se utilizó para el análisis de citoquinas usando un arreglo de nueve paneles Searchlight Multiplex.

Para el recuento de plaquetas, se recolectaron aproximadamente 0.5 mL de cada una de las muestras de sangre en tubos que contenían sal de potasio de EDTA. Las muestras se analizaron para el recuento de plaquetas usando un analizador hematológico ADVIA120 (Bayer, EE.UU.).

La concentración de oligonucleótido se midió en el hígado y riñón en el día 55. El método usado es una modificación de métodos previamente publicados (Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999), el cual incluye una extracción en fenol-cloroformo (líquido-líquido) seguida por una extracción en fase sólida. Se agregó un estándar interno (ISIS 355868, un oligonucleótido 27-mero de fosforotioato con modificación 2'-O-metoxietilo, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTTT, designada en la presente como SEQ ID Nº 2758) antes de la extracción. Se calcularon las concentraciones de muestra de tejido usando curvas de calibración, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de aproximadamente 1.14 µg/g.

Entre los 9 oligonucleótidos antisentido ensayados, ciertos oligonucleótidos antisentido, que incluye a ISIS 455269, ISIS 455371, ISIS 455429, e ISIS 455670 cumplieron con los umbrales de tolerabilidad para el peso de órganos, ALT, AST, BUN y parámetros hematológicos.

EJEMPLO 44: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS MDA-MB-231

Los oligonucleótidos ISIS del estudio descrito en el Ejemplo 12 se probaron adicionalmente a diferentes dosis en células MDA-MB-231. Se plaquearon las células a una densidad de 4,000 células por pocillo. Se incubaron las células sin ningún reactivo de transfección con concentraciones de 0.02 µM, 0.20 µM, 1.00 µM, 5.00 µM y 10.00 µM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 62. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS199, como el descrito previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar. La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 62.

TABLA 62

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de STAT3 mediante captación libre de oligonucleótido ISIS por células MDA-MB-231

ISIS N°	0.02 µM	0.20 µM	1.00 µM	5.00 µM	10.00 µM	IC_{50} (µM)
455269	0	3	30	47	59	6.4
455291	1	3	13	41	47	8.3

455371	5	0	10	34	43	>10.0
455429	0	0	22	31	43	>10.0
455703	0	5	13	28	39	>10.0
465237	0	0	22	39	41	>10.0
465754	5	1	22	30	46	>10.0
465830	0	0	17	43	52	7.5
466670	4	7	18	49	56	6.5

EJEMPLO 45: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS U251-MG

Los oligonucleótidos ISIS del estudio descrito en el Ejemplo 12 se probaron adicionalmente a diferentes dosis en células U251-MG. Se plaquearon las células a una densidad de 4,000 células por pocillo. Se incubaron las células sin ningún reactivo de transfección con concentraciones de 0.1 µM, 1.0 µM, 5.0 µM, 10.0 µM y 20.0 µM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 63. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS199, como el descrito previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar. La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 63.

TABLA 63

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de STAT3 mediante captación libre de oligonucleótido ISIS por las células U251-MG

ISIS N°	0.1 µM	1.0 µM	5.0 µM	10.0 µM	20.0 µM	IC_{50} (µM)
455269	3	16	31	47	56	11.9
455291	0	11	29	42	51	14.1
455371	3	0	25	33	39	>20.0
455429	6	0	25	33	39	>20.0
455703	5	2	13	33	36	>20.0
465237	2	0	7	2	6	>20.0
465754	0	0	8	16	4	>20.0
465830	0	0	18	2	10	>20.0
466670	0	0	18	25	37	>20.0

EJEMPLO 46: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS A431

Los oligonucleótidos ISIS del estudio descrito en el Ejemplo 12 se probaron adicionalmente a diferentes dosis en células A431. Se plaquearon las células a una densidad de 4,000 células por pocillo. Se incubaron las células sin ningún reactivo de transfección con concentraciones de 0.02 µM, 0.2 µM, 1.0 µM, 5.0 µM y 10.0 µM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla

64. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS199, como el descrito previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 64. Como se ilustra en la Tabla 64, los oligonucleótidos ISIS fueron capaces de penetrar la membrana celular y reducir significativamente los niveles de ARNm de STAT3 en una forma dependiente de la dosis.

TABLA 64

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de STAT3 mediante captación libre de oligonucleótido ISIS por las células A431

ISIS N°	0.02 µM	0.2 µM	1.0 µM	5.0 µM	10.0 µM	IC_{50} (µM)
455269	41	64	86	86	89	0.15
455291	25	61	83	85	86	0.17
455371	30	65	82	88	92	0.15
455429	15	73	84	87	88	0.19
455703	12	55	72	82	82	0.13
465237	23	72	82	86	87	0.13
465754	0	67	73	79	83	0.15
465830	0	50	67	71	78	0.21
466670	36	79	88	93	94	0.03

EJEMPLO 47: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS H460

Los oligonucleótidos ISIS del estudio descrito en el Ejemplo 12 se probaron adicionalmente a diferentes dosis en células H460. Se plaquearon las células a una densidad de 4,000 células por pocillo. Se incubaron las células sin ningún reactivo de transfección con concentraciones de 0.02 µM, 0.20 µM, 1.00 µM, 5.00 µM y 10.00 µM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 65. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS199, como el descrito previamente en la presente, se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según la medida por Ribogreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 65. Como se ilustra en la Tabla 65, los oligonucleótidos ISIS fueron capaces de penetrar la membrana celular y reducir significativamente los niveles de ARNm de STAT3 en una forma dependiente de la dosis.

TABLA 65

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de STAT3 mediante captación libre de oligonucleótido ISIS por las células H460

ISIS N°	0.02 µM	0.20 µM	1.00 µM	5.00 µM	10.00 µM	IC_{50} (µM)
455269	3	69	81	92	94	0.1
455291	0	29	79	88	92	0.3
455371	0	20	63	85	89	0.8
455429	3	37	75	87	88	0.6
455703	4	24	69	87	92	0.3
465237	0	20	72	87	89	0.6
465754	10	45	80	91	92	0.2
465830	10	28	65	82	89	0.7
466670	15	32	71	90	93	0.3

EJEMPLO 48: EFECTO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS ISIS DIRIGIDOS CONTRA STAT3 EN EL TRATAMIENTO DEL MODELO DE XENOINJERTO DE CÁNCER DE GLIOMA HUMANO U251

Se trataron ratones atímicos BALB/c inoculados con células de tumor de glioma U251 humanas con oligonucleótidos ISIS del estudio descrito en el Ejemplo 12. Se evaluó el efecto del tratamiento sobre el crecimiento del tumor en los ratones.

TRATAMIENTO

Los ratones atímicos BALB/c fueron implantados por vía subcutánea con 1 x 10^6 células tumorales. En el día 4 de la implantación, grupos de 4 ratones cada uno se administraron con 50 mg/kg inyectados intraperitonealmente cinco veces por semana durante 3 semanas y media de ISIS 455269, ISIS 455291, ISIS 455371, ISIS 455703, ISIS 455429, ISIS 465237, ISIS 465754, ISIS 465830, o ISIS 466670. Un grupo de ratones se administró con 50 mg/kg inyectados intraperitonealmente cinco veces por semana durante 3 semanas y media del oligonucleótido control, ISIS 141923. Un grupo de ratones se administró con PBS inyectado intraperitonealmente cinco veces por semana durante 3 semanas y media.

EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DEL TUMOR

El tamaño del tumor se midió dos veces semanalmente en dos dimensiones usando un calibre y los volúmenes de los tumores se calcularon usando la fórmula: $V = 0.5 \times a \times b^2$, en donde a y *b* son los diámetros mayor y menor del tumor, respectivamente. Los resultados se presentan en la Tabla 66. Los datos indican que el tratamiento con oligonucleótidos ISIS previene significativamente el crecimiento del tumor. 'n/a' indica que los puntos de datos para ese punto en el tiempo no están disponibles.

TABLA 66

Efecto de la inhibición por antisentido de STAT3 sobre el crecimiento del tumor en el modelo de xenoinjerto U251

	Día 10	Día 14	Día 17	Día 21	Día 23	Día 29	Día 32	Día 35
PBS	205	216	285	381	519	771	937	1,141
ISIS 141923	175	178	296	404	544	719	923	1,027

ISIS 455269	157	151	227	307	349	418	486	542
ISIS 455291	149	169	193	238	297	429	635	610
ISIS 455371	141	169	253	379	375	598	838	912
ISIS 455429	180	160	251	337	427	546	807	897
ISIS 455703	156	161	246	342	414	615	872	991
ISIS 465237	149	166	245	326	350	551	703	744
ISIS 465830	173	205	287	346	383	696	844	825
ISIS 466670	112	172	208	254	274	492	462	669

EJEMPLO 49: EFECTO DE ISIS 455291 DIRIGIDO CONTRA STAT3 EN EL TRATAMIENTO DE UN MODELO DE XENOINJERTO DE CÁNCER DE MAMA HUMANO MDA-MB-231

Se trataron ratones atímicos BALB/c inoculados con células cancerígenas de mama humanas MDA-MB-231 con ISIS 455291. Se evaluó el efecto del tratamiento sobre el crecimiento del tumor y la tolerabilidad en los ratones.

TRATAMIENTO

El estudio se realizó en Pharmaron Inc (Beijing, República Popular China). Los ratones atímicos BALB/c se obtuvieron de Beijing HFK Bio-Technology Co., Ltd. Las células de cáncer de mama humanas MDA-MB-231 se mantuvieron *in vitro* como un cultivo monocapa en medio L-15 de Leibovitz suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL y L-glutamina 2 mM. Las células se mantuvieron a 37ºC en una atmósfera de CO_2 5% en aire. Las células tumorales se subcultivaron rutinariamente dos veces semanalmente con tratamiento con tripsina-EDTA. Las células crecidas en fase de crecimiento exponencial se recolectaron y se contaron para la inoculación de tumor.

Dos grupos de ocho ratones atímicos BALB/c hembra asignados al azar entre 6 y 8 semanas de edad se inocularon cada uno en el flanco derecho con los fragmentos de tumor MDA-MB-231 (3 mm x 2 mm x 2 mm, que fueron generados a partir del pasaje de inoculación del tumor) para el desarrollo del tumor. El tratamiento con oligonucleótido antisentido comenzó el día 11 luego de la inoculación del tumor cuando el tamaño medio del tumor alcanzó aproximadamente 100 mm^3. Uno de los grupos se inyectó intraperitonealmente dos veces por semana durante 3 semanas con 50 mg/kg de ISIS 455291. El otro grupo de ratones se inyectó intraperitonealmente dos veces por semana durante 3 semanas con PBS y sirvió como grupo control.

Todos los procedimientos relacionados con el manejo, cuidado y tratamiento de animales, fueron realizados de acuerdo a las normativas aprobadas por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Al momento del monitoreo de rutina, se revisaron los animales para cualquier efecto del crecimiento del tumor sobre el comportamiento normal, tal como movilidad, consumo de alimento, cambios en el peso corporal y cualquier otro efecto anormal.

ANÁLISIS DE ARN

Se extrajo ARN del tejido tumoral para el análisis por PCR en tiempo real de los niveles de ARNm de STAT3 humana usando el juego de sonda y cebadores RTS199, que se describió previamente en la presente. Los niveles murinos de ARNm de STAT3 también se midieron usando el juego de sonda y cebadores mSTAT3_LTS00664 (secuencia directa CGACAGCTTCCCCATGGA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1513; secuencia reversa ATGCCCAGTCTTGACTCTCAATC, designada en la presente como SEQ ID Nº 1514; secuencia de sonda CTGCGGCAGTTCCTGGCACCTT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1515). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación al control de PBS, normalizados a ciclofilina. Como se muestra en la Tabla 67, el tratamiento con ISIS 455291 dio como resultado la reducción del ARNm humano y murino de STAT3 en comparación al control de PBS.

TABLA 67

Inhibición de ARNm de STAT3 en los grupos de tratamiento en relación al control de PBS en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-231

	% de inhibición
STAT3 humana	91
STAT3 murina	94

EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DEL TUMOR

El tamaño del tumor se midió dos veces semanalmente en dos dimensiones usando un calibre y los volúmenes de los tumores se calcularon usando la fórmula: $V = 0.536 \times a \times b^2$, en donde *a* y *b* son los diámetros mayor y menor del tumor, respectivamente. El tamaño del tumor se utilizó para los cálculos de los valores T-C y T_V/C_V. T-C se calculó con T como la mediana del tiempo (en días) requerido para que los tumores en los grupos de tratamiento alcanzaran un tamaño predeterminado (900 mm^3) y C como la mediana del tiempo (en días) para que los tumores en el grupo control alcanzaran el mismo tamaño. El valor T_V/C_V (expresado como porcentaje) es una indicación de la eficacia antitumoral de los oligonucleótidos ISIS, en donde T_V y C_V eran los volúmenes promedio de los grupos tratado y control, respectivamente, en un día dado (día 32).

Los resultados se presentan en las Tablas 68 y 69. Los datos indican que la inhibición del ARNm de STAT3 previene significativamente el crecimiento del tumor.

TABLA 68

Efecto de la inhibición por antisentido de STAT3 sobre el crecimiento del tumor en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-231

Días	PBS	ISIS 455291
11	103	103
15	185	156
18	292	205
22	519	320
25	745	437
29	1,332	792
32	1,741	1,075

TABLA 69

Efecto de la inhibición por antisentido de STAT3 sobre el crecimiento del tumor inhibición en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-231

Tratamiento	Tamaño tumoral (mm^3) en el día 32	T_V/C_V (%)	T-C a 900 mm^3
PBS	1,741	-	-
ISIS 455291	1,075	62	4

MEDIDAS DEL PESO CORPORAL

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la salud general de los animales, se midieron los pesos corporales regularmente durante el periodo de tratamiento. Los datos se presentan en la Tabla 70 e indican que el tratamiento con ISIS 455291 no afecta el peso corporal general de los ratones.

TABLA 70

Medidas de peso corporal de ratones en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-231

	Día 11	Día 15	Día 18	Día 22	Día 25	Día 29	Día 32
PBS	22	22	23	23	23	23	24
ISIS 455291	22	22	23	23	24	24	25

EJEMPLO 50: EFECTO DE ISIS 455291 DIRIGIDO CONTRA STAT3 EN EL TRATAMIENTO DE UN MODELO DE XENOINJERTO DE CARCINOMA EPIDERMOIDE HUMANO A431

Se trataron ratones atímicos BALB/c inoculados con células de cáncer epidermoide humano A431 con ISIS 455291. Se evaluó el efecto del tratamiento sobre el crecimiento del tumor y la tolerabilidad en los ratones.

TRATAMIENTO

El estudio se realizó en Pharmaron Inc (Beijing, República Popular China). Los ratones atímicos BALB/c se obtuvieron de Beijing HFK Bio-Technology Co., Ltd. Las células de carcinoma epidermoide humano A431 se mantuvieron en *in vitro* como un cultivo en monocapa en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL y L-glutamina 2 mM. Las células se mantuvieron a 37ºC en una atmósfera de CO_2 5% en aire. Las células tumorales se subcultivaron rutinariamente dos veces semanalmente con tratamiento con tripsina-EDTA. Las células crecidas en fase de crecimiento exponencial se recolectaron y se contaron para la inoculación de tumor.

Dos grupos de ocho ratones atímicos BALB/c hembra asignados al azar de entre 6 y 8 semanas de edad se inocularon cada uno por vía subcutánea con 5 x 10^6 células tumorales A431 para el desarrollo del tumor. El tratamiento con oligonucleótido antisentido se inició en el día 8 luego de la inoculación cuando el tamaño promedio del tumor alcanzó aproximadamente 95 mm^3. Uno de los grupos se inyectó intraperitonealmente dos veces por semana durante 4 semanas con 50 mg/kg de ISIS 455291. El otro grupo de ratones se inyectó intraperitonealmente dos veces por semana durante 3 semanas con PBS y sirvió como grupo control.

Todos los procedimientos relacionados con el manejo, cuidado y tratamiento de animales, fueron realizados de acuerdo a las normativas aprobadas por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Al momento del monitoreo de rutina, se revisaron los animales para cualquier efecto del crecimiento del tumor sobre el comportamiento normal, tal como movilidad, consumo de alimento, cambios en el peso corporal y cualquier otro efecto anormal.

ANÁLISIS DE ARN

Se extrajo ARN del tejido tumoral para el análisis por PCR en tiempo real de los niveles de ARNm de STAT3 humana usando el juego de sonda y cebadores RTS199, que se describió previamente en la presente. Los niveles murinos de ARNm de STAT3 también se midieron usando el juego de sonda y cebadores mSTAT3_LTS00664. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación al control de PBS, normalizados a ciclofilina. Como se muestra en la Tabla 71, el tratamiento con ISIS 455291 dio como resultado la reducción en el ARNm de STAT3 humana y murina en comparación al control de PBS.

TABLA 71

Inhibición de ARNm de STAT3 en los grupos de tratamiento en relación al control de PBS en el modelo de xenoinjerto A431

	% de inhibición
STAT3 humana	67
STAT3 murina	92

EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DEL TUMOR

El tamaño del tumor se midió dos veces semanalmente en dos dimensiones usando un calibre y los volúmenes de los tumores se calcularon usando la fórmula: $V = 0.5 \times a \times b^2$, en donde *a* y *b* son los diámetros mayor y menor del tumor, respectivamente. El tamaño del tumor se utilizó para los cálculos de los valores T-C y T_V/C_V. T-C se calculó con T como la mediana del tiempo (en días) requerido para que los tumores en los grupos de tratamiento alcanzaran un tamaño predeterminado (800 mm^3) y C como la mediana del tiempo (en días) para que los tumores en el grupo control alcanzaran el mismo tamaño. El valor T_V/C_V (expresado como porcentaje) es una indicación de la eficacia antitumoral de los oligonucleótidos ISIS, en donde T_V y C_V eran los volúmenes promedio de los grupos tratado y control, respectivamente, en un día dado (día 33).

Los resultados se presentan en las Tablas 72 y 73. Los datos indican que la inhibición de ARNm de STAT3 previno el crecimiento del tumor.

TABLA 72

Efecto de la inhibición por antisentido de STAT3 sobre el crecimiento del tumor en el modelo de xenoinjerto A431

Días	PBS	ISIS 455291
8	94	95
14	178	173
17	308	242
21	528	393
24	682	572
28	875	759
31	1,071	984
33	1,210	1,112

TABLA 73

Efecto de la inhibición por antisentido de STAT3 sobre el crecimiento del tumor inhibición en el modelo de xenoinjerto A431

Tratamiento	Tamaño tumoral (mm^3) en el día 33	T_V/C_V (%)	T-C a 800 mm^3
PBS	1,210	-	-
ISIS 455291	1,112	92	2

MEDIDAS DE PESO CORPORAL

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la salud general de los animales, se midieron los pesos corporales regularmente durante el periodo de tratamiento. Los datos se presentan en la Tabla 74 e indican que el tratamiento con ISIS 455291 no afecta el peso corporal general de los ratones.

TABLA 74

Medidas de peso corporal de ratones en el modelo de xenoinjerto A431

	Día 8	Día 14	Día 17	Día 21	Día 24	Día 28	Día 31	Día 33
PBS	20	20	20	21	21	21	22	22

ISIS 455291	20	21	21	22	22	22	23	23

EJEMPLO 51: EFECTO DE ISIS 455291 DIRIGIDO CONTRA STAT3 EN EL TRATAMIENTO DE UN MODELO DE XENOINJERTO DE CÁNCER DE PULMÓN A CÉLULAS NO PEQUEÑAS (NSCLC) NCI-H460

Se trataron ratones atímicos BALB/c inoculados con NSCLC humanas de NCI-H460 con ISIS 455291. Se evaluó el efecto del tratamiento sobre el crecimiento del tumor y la tolerabilidad en los ratones.

TRATAMIENTO

El estudio se realizó en Pharmaron Inc (Beijing, República Popular China). Los ratones atímicos BALB/c se obtuvieron de Beijing HFK Bio-Technology Co., Ltd. Las células NSCLC humanas NCI-H460 se mantuvieron *in vitro* como un cultivo monocapa en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL y L-glutamina 2 mM. Las células se mantuvieron a 37ºC en una atmósfera de CO_2 5% en aire. Las células tumorales se subcultivaron rutinariamente dos veces semanalmente con tratamiento con tripsina-EDTA. Las células crecidas en fase de crecimiento exponencial se recolectaron y se contaron para la inoculación de tumor.

Se inocularon grupos de ocho ratones atímicos BALB/c hembra asignados al azar de entre 6 y 8 semanas de edad cada uno por vía subcutánea con 2 x 10^6 de células tumorales NCI-H460 para el desarrollo del tumor. El tratamiento con oligonucleótido antisentido comenzó en el día 6 luego de la inoculación del tumor cuando el tamaño promedio del tumor alcanzó aproximadamente 100 mm^3. Uno de los grupos se inyectó intraperitonealmente dos veces por semana durante 3 semanas con 50 mg/kg de ISIS 455291. El otro grupo de ratones se inyectó intraperitonealmente dos veces por semana durante 3 semanas con PBS y sirvió como grupo control.

Todos los procedimientos relacionados con el manejo, cuidado y tratamiento de animales, fueron realizados de acuerdo a las normativas aprobadas por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Al momento del monitoreo de rutina, se revisaron los animales para cualquier efecto del crecimiento del tumor sobre el comportamiento normal, tal como movilidad, consumo de alimento, cambios en el peso corporal y cualquier otro efecto anormal.

EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DEL TUMOR

El tamaño del tumor se midió dos veces semanalmente en dos dimensiones usando un calibre y los volúmenes de los tumores se calcularon usando la fórmula: $V = 0.5 \times a \times b^2$, en donde *a* y *b* son los diámetros mayor y menor del tumor, respectivamente. El tamaño del tumor se utilizó para los cálculos de los valores T-C y T_V/C_V. T-C se calculó con T como la mediana del tiempo (en días) requerido para que los tumores en los grupos de tratamiento alcanzaran un tamaño predeterminado (1,500 mm^3) y C como la mediana del tiempo (en días) para que los tumores en el grupo control alcanzaran el mismo tamaño. El valor T_V/C_V (expresado como porcentaje) es una indicación de la eficacia antitumoral de los oligonucleótidos ISIS, en donde T_V y C_V eran los volúmenes promedio de los grupos tratado y control, respectivamente, en un día dado (día 20).

Los resultados se presentan en las Tablas 75 y 76. Los datos indican que la inhibición de STAT3 previno significativamente el crecimiento del tumor.

TABLA 75

Efecto de la inhibición por antisentido de STAT3 sobre el crecimiento del tumor en el modelo de xenoinjerto NCI-H460

Días	PBS	ISIS 455291
6	104	104
8	303	180
11	746	408

13	1,175	620
15	1,642	819
18	2,277	1,320
20	2,859	1,812
22	-	2,330

TABLA 76

Efecto de la inhibición por antisentido de STAT3 sobre la inhibición del crecimiento del tumor en el modelo de xenoinjerto NCI-H460

Tratamiento	Tamaño del tumor (mm^3) al día 20	T_V/C_V (%)	T-C a 800 mm^3
PBS	1,210	-	-
ISIS 455291	1,812	63	4

MEDIDAS DE PESO CORPORAL

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la salud general de los animales, se midieron los pesos corporales regularmente durante el periodo de tratamiento. Los datos se presentan en la Tabla 77 e indican que el tratamiento con ISIS 455291 no afecta el peso corporal general de los ratones.

TABLA 77

Medidas de peso corporal de ratones en el modelo de xenoinjerto NCI-H460

	Día 6	Día 8	Día 11	Día 13	Día 15	Día 18	Día 20	Día 22
PBS	20	20	20	20	20	20	21	-
ISIS 455291	20	20	20	20	20	19	20	20

EJEMPLO 52: EFECTO DE LA INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DE STAT3 HUMANA EN UN MODELO DE RATÓN ORTOTÓPICO DE GLIOBLASTOMA HUMANO

Se trataron ratones NU/J implantados ortotópicamente con células de glioblastoma humano con ISIS 455291, un gápmero 5-10-5 MOE que tiene una secuencia CAGCAGATCAAGTCCAGGGA (SEQ ID Nº 1590). Se evaluó el efecto del tratamiento sobre el crecimiento del tumor y la tolerabilidad en los ratones.

TRATAMIENTO

Treinta ratones NU/J se implantaron estereotácticamente en el lóbulo frontal derecho con 5 x 10^5 células MG-luc2 U-87. En el día 15 luego de la implantación de las células de tumor, 15 de estos ratones se dosificaron intracranealmente con una inyección en bolo en el sitio de implantación del tumor con 100 µg de ISIS 455291, que se disolvieron en 2 µL de PBS. Los 15 ratones remanentes se dosificaron intracranealmente con una inyección en bolo en el sitio de implantación del tumor con 2 µL de PBS. El segundo grupo de ratones sirvió como grupo control.

ANÁLISIS

En el día 18 luego del trasplante del tumor, se sacrificaron cinco ratones de cada grupo por inhalación de CO_2 y se recolectaron muestras de cerebro para el análisis de ARN. El ARN se extrajo a partir del tejido tumoral para el análisis por PCR en tiempo real de los niveles de ARNm de STAT3 humana usando el juego de sonda y cebadores RTS199, que se describió previamente en la

presente. El tratamiento con ISIS 455291 dio como resultado un 27% de reducción de ARNm de STAT3 humana en el tejido tumoral en comparación al control de PBS.

Los ratones remanentes en cada grupo se monitorearon regularmente hasta 2 semanas para el análisis de supervivencia. La mediana de la supervivencia para el grupo control de PBS fue 30.5 días. La mediana de la supervivencia para los ratones tratados con oligonucleótidos ISIS fue 35 días. El valor P fue 0.2088.

EJEMPLO 53: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS PC9

El ISIS 455703 e ISIS 455291, de los estudios que se describieron previamente, se probaron adicionalmente a diferentes dosis en células PC9, una línea de células de carcinoma a células no pequeñas. Se plaquearon las células a una densidad de 3,000 células por pocillo. Se incubaron las células con concentraciones de 0.02 μM, 0.1 μM, 0.5 μM, 2.5 μM y 10.0 μM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 78. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS2033 (secuencia directa GAGGCCCGCCCAACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1520; secuencia reversa TTCTGCTAATGACGTTATCCAGTTTT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1521; secuencia de sonda CTGCCTAGATCGGC, designada en la presente como SEQ ID Nº 1522) se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de beta-actina, un gen estándar interno, según la medida con el juego de cebadores y sonda humanos HTS5002 (secuencia directa CGGACTATGACTTAGTTGCGTTACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1529; secuencia reversa GCCATGCCAATCTCATCTTGT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1530; secuencia de sonda CCTTTCTTGACAAAACCTAACTTGCGCAGA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1531). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 78. Como se ilustra en la Tabla 78, ISIS 455703 e ISIS 455291 fueron capaces de penetrar la membrana celular.

TABLA 78

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de STAT3 mediante captación libre de oligonucleótido ISIS por células PC9

ISIS N°	0.02 μM	0.1 μM	0.5 μM	2.5 μM	10.0 μM	IC_{50} (μM)
455703	6	5	17	50	49	9.0
455291	0	0	42	67	75	1.2

EJEMPLO 54: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS C42B

El ISIS 455291, de los estudios que se describieron previamente, se ensayó adicionalmente a diferentes dosis en células C42B, una línea de células de cáncer de próstata. Se plaquearon las células a una densidad de 3,000 células por pocillo. Se incubaron las células con concentraciones de 0.02 μM, 0.1 μM, 0.5 μM, 2.5 μM y 10.0 μM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 79. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS2033 (secuencia directa GAGGCCCGCCCAACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1520; secuencia reversa TTCTGCTAATGACGTTATCCAGTTTT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1521; secuencia de sonda CTGCCTAGATCGGC, designada en la presente como SEQ ID Nº 1522) se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de beta-actina, un gen estándar interno, según la medida con el juego de cebadores y sonda humanos HTS5002 (secuencia directa CGGACTATGACTTAGTTGCGTTACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1529; secuencia

reversa GCCATGCCAATCTCATCTTGT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1530; secuencia de sonda CCTTTCTTGACAAAACCTAACTTGCGCAGA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1531). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

Como se ilustra en la Tabla 79, ISIS 455291 tuvo la capacidad de penetrar la membrana celular.

TABLA 79

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de STAT3 mediante captación libre de oligonucleótido ISIS por células C42B

ISIS N°	0.02 µM	0.1 µM	0.5 µM	2.5 µM	10.0 µM
455291	0	0	17	10	41

EJEMPLO 55: INHIBICIÓN POR ANTISENTIDO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE STAT3 DESPUÉS DE LA CAPTACIÓN LIBRE DE OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO EN CÉLULAS COLO201

El ISIS 455291, de los estudios que se describieron previamente, se ensayó adicionalmente a diferentes dosis en células Colo201, una línea de células de cáncer colorrectal. Se plaquearon las células a una densidad de 3,000 células por pocillo. Se incubaron las células con concentraciones de 0.02 µM, 0.1 µM, 0.5 µM, 2.5 µM y 10.0 µM de oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 80. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN a partir de las células y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR cuantitativa en tiempo real. El juego de sonda y cebadores para STAT3 humana RTS2033 (secuencia directa GAGGCCCGCCCAACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1520; secuencia reversa TTCTGCTAATGACGTTATCCAGTTTT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1521; secuencia de sonda CTGCCTAGATCGGC, designada en la presente como SEQ ID Nº 1522) se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de STAT3 se ajustaron de acuerdo al contenido de beta-actina, un gen estándar interno, según la medida con el juego de cebadores y sonda humanos HTS5002 (secuencia directa CGGACTATGACTTAGTTGCGTTACA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1529; secuencia reversa GCCATGCCAATCTCATCTTGT, designada en la presente como SEQ ID Nº 1530; secuencia de sonda CCTTTCTTGACAAAACCTAACTTGCGCAGA, designada en la presente como SEQ ID Nº 1531). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de STAT3, en relación a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 80. Como se ilustra en la Tabla 29, el ISIS 455291 tuvo la capacidad de penetrar la membrana celular.

TABLA 80

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de STAT3 mediante captación libre de oligonucleótido ISIS por células Colo201

ISIS N°	0.02 µM	0.1 µM	0.5 µM	2.5 µM	10.0 µM	IC_{50} (µM)
455291	21	18	34	52	81	1.2

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto monocatenario que comprende un oligonucleótido monocatenario modificado que consiste en 16 nucleósidos unidos que tienen una secuencia de nucleobase que consiste en la SEQ ID NO: 245, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el oligonucleótido modificado comprende:

una extensión 5' que consiste en 3 nucleósidos unidos;

una extensión 3' que consiste en 3 nucleósidos unidos;

un hueco entre la extensión 5' y la extensión 3' que consiste en 10 2'-desoxinucleósidos unidos;

en donde cada nucleósido de cada una de la extensión 5' y la extensión 3' comprende un nucleósido de etilo restringido;

en donde cada unión internucleósido es una unión fosforotioato; y

en donde cada citosina es una 5-metilcitosina.

2. El compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el oligonucleótido está unido covalentemente a uno o más grupos conjugados.

3. El compuesto de la reivindicación 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el uno o más grupos conjugados incluyen carbohidratos.

4. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

5. Un compuesto monocatenario que comprende un oligonucleótido monocatenario modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 para uso en el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa en un animal.

6. El compuesto o composición de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el animal es un humano.

7. El compuesto o composición de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que la enfermedad hiperproliferativa es cáncer.