(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 761 343**

(51) Int. CI.:

C12N 15/11 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2012 PCT/US2012/063970**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13070786**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2012 E 12847024 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 2776564**

(54) Título: **Modulación de la expresión de TMPRSS6**

(30) Prioridad:

07.11.2011 US 201161556755 P
05.10.2012 US 201261710636 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.05.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

GUO, SHULING

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

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 de TMPRSS6

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a métodos, compuestos y composiciones para modular la expresión TMPRSS6 para el propósito de reducir la acumulación de hierro en un animal.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] El mantenimiento del equilibrio de hierro en los seres humanos es delicado debido a la capacidad limitada de la fisiología humana para la absorción y excreción de hierro (Finch, CA y Huebers, HN Engl. J. Med. 1982. 306: 1520-1528). La deficiencia de hierro es un trastorno generalizado y es el resultado de cualquier condición en donde la ingesta de hierro en la dieta no satisfaga las demandas del cuerpo. A menudo, la pérdida de sangre patológica contribuye al equilibrio negativo de hierro. La sobrecarga de hierro también es una condición común, y puede resultado de una causa genética, p. ej., mutaciones de diferentes genes del metabolismo del hierro (Camaschella, C. Blood. 2005. 106: 3710-3717). La hormona peptídica hepática, la hepcidina, juega un papel clave en el metabolismo del hierro del cuerpo, ya que controla la absorción y el reciclaje del hierro (Ganz, T. A-M. Soc. Hematol. Educ. Program 2006. 507: 29-35; Kemna, EH et al., Clin. Chem. 2007. 53: 620-628). Varias proteínas, incluyendo HFE (proteína de hemocromatosis) (Ahmad, KA et al., Blood Cells Mol Dis. 2002. 29: 361), receptor de transferrina 2 (Kawabata, H. et al., Blood 2005. 105: 376), y La hemojuvelina (Papanikolaou, G. et al., Nat. Genet. 2004. 36: 77) también regulan los niveles de hierro del cuerpo.

[0003] La proteasa transmembrana, la serina 6 (TMPRSS6) es una serina proteasa transmembrana de tipo II y se expresa principalmente en el hígado (Velasco, G. y col., J. Biol. Chem. 2002. 277: 37637-37646). Las mutaciones en TMPRSS6 se han implicado en la anemia por deficiencia de hierro (Finberg, KE et al., Nat. Genet. 2008. 40: 569-571), donde se encontró que el nivel de hepcidina era inusualmente elevado. Un estudio de una población humana con anemia microcítica encontró que las mutaciones de pérdida de función en el gen TMPRSS6 conducen a la sobreproducción de hepcidina, lo que, a su vez, conduce a una absorción y utilización defectuosas del hierro (Melis, MA et al., Hematologica 2008. 93: 1473-1479). TMPRSS6 participa en una vía de señalización transmembrana desencadenada por deficiencia de hierro y suprime diversas vías de activación de *Hamp,* el gen que codifica la hepcidina (Du, X. et al., Science 2008. 320: 1088-1092). La pérdida heterocigótica de TMPRSS6 en ratones HFE -/- reduce la sobrecarga de hierro sistémica, mientras que la pérdida homocigótica de TMPRSS6 en ratones HFE -/- causa deficiencia de hierro sistémica y una elevada expresión hepática de hepcidina (Finberg, KE et al., Blood 2011. 117: 4590 - 4599).

[0004] Un ejemplo de un trastorno de la sobrecarga de hierro es la hemocromatosis. La hemocromatosis (p. ej., hemocromatosis tipo 1 o hemocromatosis hereditaria) es un trastorno que produce una absorción intestinal excesiva de hierro en la dieta del tracto gastrointestinal (Allen, KJ et al., N. Engl. J. Med. 2008. 358: 221-230). Esto da como resultado un aumento patológico en las reservas totales de hierro en el cuerpo. El exceso de hierro se acumula en los tejidos y órganos, particularmente el hígado, las glándulas suprarrenales, el corazón, la piel, las gónadas, las articulaciones y el páncreas, e interrumpe su función normal. Complicaciones secundarias, como cirrosis (Ramm, GA y Ruddell, RG Semin. Liver Dis. 2010. 30: 271-287), poliartropatía (Carroll, GJ et al., Arthritis Rheum. 2011. 63: 286-294), suprarrenal insuficiencia, insuficiencia cardíaca y diabetes (Huang, J. et al., Diabetes 2011. 60: 80-87) son comunes. Otro ejemplo de un trastorno por sobrecarga de hierro es la β-talasemia, donde los pacientes pueden desarrollar una sobrecarga de hierro causada por eritropoyesis o transfusiones ineficaces para tratar la β-talasemia.

[0005] Maxson y col. (Journal of Biological Chemistry, 2010, 285 (50), páginas 39021-39028) describe moléculas de ARNip que se dirigen al gen TMPRSS6.

[0006] Sisay et al. (Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 53 (15), páginas 5523-5535) describe la identificación de los primeros inhibidores de bajo peso molecular de Matriptasa-2 (TMPRSS6).

[0007] Finberg y col. (Blood, 2010,116 (21), página 75, de la 52ª Reunión Anual de la American Society of Hematology) enseña que TMPRSS6 es necesario para la supresión de hepcidina y la carga de hierro en un modelo de ratón de beta talasemia.

[0008] Ramsay y col. (Haematologica, 2009, 94 (6), páginas 840-849) describe la relevancia de Matriptasa-2 (TMPRSS6) en el metabolismo del hierro.

[0009] El documento WO 2011/085271 describe métodos, compuestos y composiciones para reducir la expresión de un ARNm y proteína ANGPTL3 en un animal.

[0010] El documento WO 2012/135246 enseña composiciones de ácido ribonucleico de doble cadena (ARNds) dirigidas al gen TMPRSS6, y métodos para usar tales composiciones de ARNds para inhibir la expresión de TMPRSS6.

[0011] Hay un momento, la falta de opciones aceptables para el tratamiento de trastornos de sobrecarga de hierro. Por lo tanto, es un objeto en el presente documento identificar compuestos y métodos para el tratamiento de tales enfermedades y trastornos. Esta invención se refiere al descubrimiento de nuevos inhibidores altamente potentes de la expresión del gen TMPRSS6.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

[0012] La invención proporciona un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 12-30 nucleósidos enlazados, en donde el oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase que es al menos 95% complementaria a un ácido nucleico TMPRSS6, y en donde el compuesto disminuye la expresión de TMPRSS6, para usar en el tratamiento de la talasemia en un sujeto.

[0013] Otras características de la invención se exponen en las reivindicaciones.

[0014] También se describen en este documento métodos para modular los niveles de ARNm y/o proteína TMPRSS6 en un animal. Aquí se describen métodos, compuestos y composiciones para reducir los niveles de TMPRSS6. En ciertas realizaciones, la disminución de TMPRSS6 da como resultado un aumento en los niveles de expresión de hepcidina. En ciertas realizaciones, la disminución de TMPRSS6 da como resultado una disminución en el porcentaje de saturación de transferrina. En ciertas realizaciones, la disminución de TMPRSS6 da como resultado una reducción de la acumulación de hierro. En ciertas realizaciones, tales resultados se efectúan administrando un inhibidor de TMPRSS6. En ciertas realizaciones, se administra una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de TMPRSS6 a un animal. En realizaciones adicionales, la administración de la cantidad terapéuticamente efectiva del inhibidor TMPRSS6 también aumenta los niveles de expresión de hepcidina. En realizaciones adicionales, la administración de la cantidad terapéuticamente efectiva del inhibidor TMPRSS6 también disminuye el porcentaje de saturación de la molécula de transferrina en el animal.

[0015] En ciertas realizaciones, se describen métodos para tratar, prevenir, retardar la aparición de, mejorar y/o reducir un síntoma, de una enfermedad, trastorno y/o afección asociada con el exceso de acumulación de hierro en un animal. Los métodos comprenden administrar al animal una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de TMPRSS6, en donde la enfermedad, trastorno y/o afección asociada con la acumulación excesiva de hierro se trata, previene, el inicio se retrasa, el síntoma mejora y/o reduce.

[0016] En ciertas realizaciones, se describen métodos para la identificación de un animal en riesgo de una enfermedad, trastorno y/o condición o que tiene una enfermedad, trastorno y/o afección que está asociada con la acumulación de exceso de hierro. En realizaciones adicionales, los métodos incluyen administrar al animal una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de TMPRSS6, tratando así al animal.

[0017] En ciertas realizaciones, describe en el presente documento es el uso de un inhibidor de TMPRSS6 para la preparación de un medicamento.

[0018] En ciertas realizaciones, descritas en este documento es el uso de un inhibidor de TMPRSS6 como un medicamento para tratar, prevenir, retardar la aparición de, y/o reducir los síntomas de una enfermedad, trastorno y/o afección asociada con el exceso de acumulación de hierro en un animal administrando al animal una cantidad terapéuticamente efectiva del inhibidor TMPRSS6.

[0019] En ciertas realizaciones, describe en el presente documento es el uso de un compuesto antisentido TMPRSS6 como un inhibidor de TMPRSS6.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0020] Ha de entenderse que tanto la anterior descripción general y la siguiente descripción detallada son a modo de ejemplo y sólo explicativas y no son restrictivas de la invención, según se reivindica. Aquí, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. Como se usa en este documento, el uso de “o” significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluido", así como otras formas, como "incluye" e "incluido", no es limitante. Además, términos como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

[0021] Los encabezados de sección usados en este documento son sólo para fines de organización y no deben considerarse como limitativos de la materia diana descrita.

Definiciones

[0022] A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas

en el presente documento son los bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Se pueden usar técnicas estándar para la síntesis química y el análisis químico.

[0023] A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

"2'-O-metoxietilo" (también de 2'-MOE y 2'-O($CH_{2)2}$-OCH_3) se refiere a una modificación con O-metoxi-etilo de la posición 2' de un anillo de furosilo. Un azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo es un azúcar modificado. "Nucleótido de 2'-O-metoxietilo" significa un nucleótido que comprende un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo.

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

"Acerca de" significa dentro del ± 10% de un valor. Por ejemplo, si se indica, "un marcador puede incrementarse en aproximadamente un 50%", se implica que el marcador puede incrementarse entre 45% - 55%.

"Agente farmacéutico activo" o "agente farmacéutico" significa la sustancia o sustancias en una composición farmacéutica que proporcionan un beneficio terapéutico cuando se administran a un individuo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un oligonucleótido antisentido dirigido a TMPRSS6 es un agente farmacéutico activo. "Región diana activa" o "región diana" significa una región a la que se dirige uno o más compuestos antisentido activos.

"Compuestos antisentido activos" se refiere a los compuestos antisentido que reducen los niveles de ácido nucleico o los niveles de proteína objetivo.

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

"Administrar" significa proporcionar un agente farmacéutico a un individuo e incluye, entre otros, la administración por un profesional médico y la autoadministración.

"Agente" significa una sustancia activa que puede proporcionar un beneficio terapéutico cuando se administra a un animal.

"Primer agente" significa un compuesto terapéutico como se describe en el presente documento. Por ejemplo, un primer agente es un oligonucleótido antisentido dirigido a TMPRSS6.

"Segundo agente" significa un segundo compuesto terapéutico descrito aquí. Por ejemplo, un segundo agente puede ser un segundo oligonucleótido antisentido dirigido a TMPRSS6 o un objetivo no TMPRSS6. Alternativamente, un segundo agente puede ser un compuesto distinto de un oligonucleótido antisentido.

"Mejoría" se refiere a una disminución de al menos un indicador, marcador, signo o síntoma de una enfermedad, trastorno y/o afección asociada. En ciertas realizaciones, la mejora incluye un retraso o desaceleración en la progresión de uno o más indicadores de una afección, trastorno y/o enfermedad. La gravedad de los indicadores puede determinarse mediante medidas subjetivas u objetivas, que son conocidas por los expertos en la materia.

"Anemia" es una enfermedad caracterizada por un número menor de lo normal de glóbulos rojos (eritrocitos) en la sangre, generalmente medido por una disminución en la cantidad de hemoglobina. La causa de la anemia puede incluir inflamación crónica, enfermedad renal crónica, tratamiento de diálisis renal, trastornos genéticos, infección crónica, infección aguda, cáncer y tratamientos contra el cáncer. La alteración de la homeostasis y/o la eritropoyesis de hierro en estas enfermedades, trastornos y/o afecciones también pueden provocar una disminución de la producción de eritrocitos. Los signos clínicos de anemia incluyen niveles bajos de hierro en suero (hipoferremia), niveles bajos de hemoglobina, niveles bajos de hematocrito, disminución de glóbulos rojos, disminución de reticulocitos, aumento del receptor de transferrina soluble y eritropoyesis restringida por hierro. Los ejemplos de anemia incluyen talasemias (es decir, α-talasemia, β-talasemia (leve, intermedia y mayor) y δ-talasemia), anemia falciforme, anemia aplásica, anemia de Fanconi, anemia de Diamond Blackfan, síndrome de Shwachman Diamond, trastornos de la membrana de los glóbulos rojos, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, telangiectasia hemorrágica hereditaria, anemia hemolítica, anemia de enfermedades crónicas y similares.

"Animal" se refiere a un animal humano o no humano, incluidos, entre otros, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y primates no humanos, incluidos, entre otros, monos y chimpancés.

"Anticuerpo" se refiere a una molécula caracterizada por reaccionar específicamente con un antígeno de alguna manera, donde el anticuerpo y el antígeno se definen cada uno en términos del otro. El anticuerpo puede referirse a una molécula de anticuerpo completa o cualquier fragmento o región de la misma, como la cadena pesada, la cadena ligera, la región Fab y la región Fc.

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

"Compuesto antisentido" significa un compuesto oligomérico que es capaz de experimentar hibridación con un ácido nucleico diana a través de enlaces de hidrógeno.

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

“Oligonucleótido antisentido” significa un oligonucleótido monocatenario que tiene una secuencia de nucleobase que permite la hibridación a una región o segmento correspondiente de un ácido nucleico diana.

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

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

La "transfusión de sangre" se refiere al proceso de recibir productos sanguíneos en la circulación intravenosa. Las transfusiones se usan en una variedad de enfermedades, trastornos y/o afecciones médicas para reemplazar los componentes sanguíneos perdidos.

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

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

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

"Administración conjunta" significa la administración de dos o más agentes farmacéuticos a un individuo. Los dos o más agentes farmacéuticos pueden estar en una única composición farmacéutica, o pueden estar en composiciones farmacéuticas separadas. Cada uno de los dos o más agentes farmacéuticos puede administrarse a través de la misma o diferentes vías de administración. La coadministración abarca la administración concomitante, paralela o secuencial.

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

"Nucleobases contiguas" significa nucleobases inmediatamente adyacentes entre sí.

"Desoxirribonucleótido" significa un nucleótido que tiene un hidrógeno en la posición 2’ de la porción de azúcar del nucleótido. Los desoxirribonucleótidos pueden modificarse con cualquiera de una variedad de sustituyentes.

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

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

"Dosis" significa una cantidad especificada de un agente farmacéutico proporcionado en una sola administración, o en un período de tiempo especificado. En ciertas realizaciones, una dosis puede administrarse en uno, dos o más bolos, tabletas o inyecciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones donde se desea la administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen que no se acomoda fácilmente con una sola inyección, por lo tanto, se pueden usar dos o más inyecciones para lograr la dosis deseada. En ciertas realizaciones, el agente farmacéutico se administra por infusión durante un período prolongado de tiempo o de forma continua. Las dosis pueden indicarse como la cantidad de agente farmacéutico por hora, día, semana o mes.

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

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

"Gapmer" significa un compuesto antisentido quimérico en donde una región interna que tiene una pluralidad de nucleósidos que soportan la escisión de RNasa H se coloca entre regiones externas que tienen uno o más nucleósidos, en donde los nucleósidos que comprenden la región interna son químicamente distintos del nucleósido o nucleósidos que comprenden las regiones externas. La región interna puede denominarse "segmento de separación" y las regiones externas pueden denominarse "segmentos de ala".

"Ampliado por espacio" significa un compuesto antisentido quimérico que tiene un segmento de espacio de 12 o más 2'-desoxinucleósidos contiguos colocados entre e inmediatamente adyacentes a segmentos de ala 5’ y 3' que tienen de uno a seis nucleósidos.

"Hemocromatosis" es un trastorno del metabolismo del hierro que provoca que el exceso de hierro sea absorbido por el tracto gastrointestinal, lo que lleva a una acumulación y depósito excesivo de hierro en varios

tejidos del cuerpo. La hemocromatosis primaria, hereditaria o clásica es causada por una mutación genética, p. ej., en el gen HFE. Los sujetos con esta enfermedad tienen cantidades excesivas de hierro, que se absorbe en el tracto gastrointestinal y se acumula en los tejidos del cuerpo, particularmente en el hígado. La hemocromatosis secundaria o adquirida puede ser causada por transfusiones sanguíneas frecuentes, una alta ingesta oral o parenteral de suplementos de hierro o un efecto secundario de otras enfermedades.

"Hematopoyesis" se refiere a la formación de componentes celulares de la sangre, derivados de células madre hematopoyéticas. Estas células madre residen en la médula de la médula ósea y tienen la capacidad única de dar lugar a todos los diferentes tipos de células sanguíneas maduras.

"Hemólisis" se refiere a la ruptura de eritrocitos o glóbulos rojos y la liberación de su contenido en el fluido circundante. La hemólisis en un animal puede ocurrir debido a una gran cantidad de afecciones médicas, que incluyen infección bacteriana, infección parasitaria, trastornos autoinmunes y trastornos genéticos.

"Hepcidina" se refiere tanto a un ARNm como a una proteína codificada por el ARNm que producen los hepatocitos en respuesta a la inflamación o al aumento de los niveles de hierro en la sangre. La función principal de la hepcidina es regular los niveles de hierro en la sangre al facilitar una disminución en estos niveles de hierro en la sangre. La expresión de hepcidina aumenta en condiciones de inflamación aguda y crónica, lo que resulta en una disminución de la disponibilidad de hierro para la eritropoyesis.

"Hepcidina" también se conoce como péptido antimicrobiano hepcidina; HAMP; HAMP1; HEPC; HFE2; LEAP-1; LEAP1; y péptido antimicrobiano expresado en hígado.

"Anemia hereditaria" se refiere a la anemia causada por una afección hereditaria que hace que los glóbulos rojos en el cuerpo mueran más rápido de lo normal, sean ineficaces para transportar oxígeno desde los pulmones a las diferentes partes del cuerpo o no se creen en absoluto. Los ejemplos incluyen, entre otros, anemia de células falciformes, talasemia, anemia de Fanconi, anemia de Diamond Blackfan, síndrome de Shwachman Diamond, trastornos de la membrana de glóbulos rojos, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, o telangiectasia hemorrágica hereditaria.

"HFE" se refiere al gen o proteína de hemocromatosis humana.

"Mutación del gen HFE" se refiere a mutaciones en el gen HFE, que pueden provocar hemocromatosis hereditaria.

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

"Identificar un animal en riesgo o tener una enfermedad, trastorno y/o condición asociada con una acumulación excesiva de hierro" significa identificar a un animal que ha sido diagnosticado con una enfermedad, trastorno y/o condición o identificar un animal predispuesto a desarrollar una enfermedad, trastorno y/o condición asociada con la acumulación excesiva de hierro. Los individuos pueden estar predispuestos a desarrollar una enfermedad, trastorno y/o afección asociada con la acumulación excesiva de hierro en individuos con antecedentes familiares de hemocromatosis. Dicha identificación puede lograrse mediante cualquier método, incluida la evaluación del historial médico de un individuo y las pruebas o evaluaciones clínicas estándar.

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

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

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

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

"Administración intravenosa" significa administración en una vena.

"Acumulación de hierro" o "sobrecarga de hierro" indica acumulación y deposición de hierro en el cuerpo por cualquier causa. Las causas más comunes son causas hereditarias, sobrecarga de hierro transfusional, que puede ser el resultado de transfusiones sanguíneas repetidas o ingesta excesiva de hierro en la dieta.

"Suplementos de hierro" se refieren a los suplementos recetados por una razón médica para tratar la deficiencia de hierro en un paciente. El hierro puede complementarse por vía oral o administrarse por vía parenteral. Nucleósidos unidos significa nucleósidos adyacentes que están unidos entre sí.

"Marcador" o "biomarcador" es cualquier parámetro biológico cuantificable y cuantificable que sirve como índice para evaluaciones relacionadas con la salud o la fisiología. Por ejemplo, un aumento en el porcentaje de saturación de transferrina, un aumento en los niveles de hierro o una disminución en los niveles de hepcidina pueden considerarse marcadores de una enfermedad, trastorno y/o trastorno por sobrecarga de hierro.

"MCH" se refiere a "hemoglobina corpuscular media" o "hemoglobina celular media", un valor para expresar la masa promedio de hemoglobina (Hb) por glóbulo rojo en una muestra de sangre.

"MCV" se refiere a "volumen corpuscular medio" o "volumen celular medio", un valor para expresar el tamaño promedio de glóbulos rojos.

"No coincidencia" o "nucleobase no complementaria" o "MM" se refiere al caso cuando una nucleobase de un primer ácido nucleico no es capaz de emparejarse con la nucleobase correspondiente de un segundo ácido nucleico o diana.

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

“Nucleobase modificada” se refiere a cualquier nucleobase distinta de adenina, citosina, guanina, timidina o uracilo. Por ejemplo, una nucleobase modificada puede ser 5'-metilcitosina. Una "nucleobase no modificada" significa las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U).

“Nucleósido modificado” significa un nucleósido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado o una nucleobase modificada.

“Nucleótido modificado” significa un nucleótido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado, enlace internucleósido modificado o nucleobase modificada.

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

"Azúcar modificado" se refiere a una sustitución o cambio de un azúcar natural. Por ejemplo, un azúcar modificado puede ser 2'-MOE.

"Modular" se refiere a cambiar o ajustar una característica en una célula, tejido, órgano u organismo. Por ejemplo, modular el nivel de TMPRSS6 puede significar aumentar o disminuir el nivel de ARNm de TMPRSS6 o proteína de TMPRSS6 en una célula, tejido, órgano u organismo. Un "modulador" efectúa el cambio en la célula, tejido, órgano u organismo. Por ejemplo, un oligonucleótido antisentido TMPRSS6 puede ser un modulador que aumenta o disminuye la cantidad de ARNm TMPRSS6 o proteína TMPRSS6 en una célula, tejido, órgano u organismo.

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

"Mutaciones" se refieren a cambios en una secuencia de ácido nucleico. Las mutaciones pueden ser causadas de varias maneras, incluyendo, pero no limitado a, radiación, virus, transposones y mutagénicos. químicos, así como los errores que ocurren durante la meiosis, la replicación del ADN, la transcripción del ARN y el procesamiento postranscripcional. Las mutaciones pueden provocar varios cambios diferentes en la secuencia; pueden no tener ningún efecto, alterar el producto de un gen o prevenir el gen de funcionar correctamente o completamente. Por ejemplo, la mutación HFE puede conducir al funcionamiento incorrecto del producto genético, lo que lleva a una absorción excesiva de hierro en los intestinos.

"Síndrome mielodisplásico" se refiere a una colección diversa de enfermedades, trastornos y/o afecciones médicas hematológicas. que incluyan la producción ineficaz de la clase mieloide de las células sanguíneas. El síndrome es causado por trastornos de las células en la médula ósea. En el síndrome mielodisplásico, la hematopoyesis es ineficaz y la cantidad y calidad de las células sanguíneas disminuye irreversiblemente, lo que perjudica aún más la producción de sangre. Como resultado, los pacientes con síndrome mielodisplásico desarrollan anemia severa y requieren transfusiones de sangre frecuentes.

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

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

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

“Nucleobase” significa un resto heterocíclico capaz de emparejarse con una base de otro ácido nucleico.

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

"Nucleósido" significa una nucleobase unida a un azúcar.

"Mimético de nucleósido" incluye aquellas estructuras usadas para reemplazar el azúcar o el azúcar y la base y no necesariamente el enlace en una o más posiciones de un compuesto oligomérico; tales como, p. ej., miméticos de nucleósidos que tienen miméticos de azúcar morfolino, ciclohexenilo, ciclohexilo, tetrahidropiranilo, biciclo o triciclo, p. ej., unidades de azúcar sin furanosa.

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

"Mimético de nucleótidos" incluye aquellas estructuras usadas para reemplazar el nucleósido y el enlace en una o más posiciones de un compuesto oligomérico; tales como, p. ej., ácidos nucleicos peptídicos o morfolinos (morfolinos unidos por -N(H)-C(=O)-O- u otro enlace no fosfodiéster).

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

"Oligonucleótido" significa un polímero de nucleósidos unidos, cada uno de los cuales puede modificarse o no modificarse, independientemente uno del otro.

"Administración parenteral" significa administración por inyección o infusión. La administración parenteral incluye administración subcutánea, administración intravenosa, administración intramuscular, administración intraarterial, administración intraperitoneal o administración intracraneal, p. ej., administración intratecal o intracerebroventricular. La administración puede ser continua, crónica, corta o intermitente.

"Péptido" se refiere a una molécula formada uniendo al menos dos aminoácidos por enlaces amida. Péptido se refiere a polipéptidos y proteínas.

"Porcentaje de saturación de transferrina" se refiere a la proporción de hierro sérico con respecto a la capacidad total de unión al hierro multiplicada por 100. De las moléculas de transferrina que están disponibles para unir hierro, este valor le dice al médico cuánto hierro sérico está realmente unido.

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

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

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

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

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

"Policitemia" se refiere a una condición de aumento de glóbulos rojos (RBC) en un volumen específico debido a un aumento en el número de glóbulos rojos (policitemia absoluta) o una disminución en el volumen plasmático (policitemia relativa). Las proporciones de volumen de sangre a glóbulos rojos se pueden medir como niveles de hematocrito. La mayor proporción de glóbulos rojos puede hacer que la sangre sea viscosa, lo que puede conducir a un flujo sanguíneo más lento a través del sistema circulatorio y a la posible formación de coágulos sanguíneos. Un flujo sanguíneo más lento puede disminuir el transporte de oxígeno a las células, tejidos y/u órganos, lo que conduce a enfermedades, trastornos o afecciones como angina o insuficiencia cardíaca. La formación de coágulos de sangre en el sistema circulatorio puede provocar daños en células, tejidos y/u órganos, lo que puede provocar enfermedades, trastornos o afecciones como infarto de miocardio o accidente cerebrovascular. El tratamiento para la policitemia incluye flebotomía o medicamentos para disminuir la producción de glóbulos rojos (p. ej., INF-α, hidroxiurea, anagrelida). Los ejemplos de policitemia incluyen, pero no se limitan a, policitemia vera (PCV), policitemia rubra vera (PRV) y eritremia. En ciertos casos, la policitemia puede progresar a leucemia eritroide en un sujeto.

“Porción” significa un número definido de nucleobases contiguas (es decir, unidas) de un ácido nucleico. En ciertas realizaciones, una porción es un número definido de nucleobases contiguas de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, una porción es un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido.

"Prevenir" se refiere a retrasar o prevenir el inicio, desarrollo o progresión de una enfermedad, trastorno o afección durante un período de tiempo de minutos a indefinidamente. Prevenir también significa reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección.

"Profármaco" significa un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte en una forma activa dentro del cuerpo o las células del mismo por la acción de enzimas endógenas u otras sustancias químicas o afecciones.

"Efectos secundarios" significa respuestas fisiológicas atribuibles a un tratamiento distinto de los efectos deseados. En ciertas realizaciones, los efectos secundarios incluyen reacciones en el lugar de la inyección, anomalías en las pruebas de función hepática, anomalías en la función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anomalías en el sistema nervioso central, miopatías y malestar general. Por ejemplo, el aumento de los niveles de aminotransferasa en suero puede indicar toxicidad hepática o anormalidad de la función hepática.

“Oligonucleótido monocatenario” significa un oligonucleótido que no se hibrida con una cadena complementaria.

"Específicamente hibridable" se refiere a un compuesto antisentido que tiene un grado suficiente de complementariedad con un ácido nucleico diana para inducir un efecto deseado, mientras que exhibe efectos mínimos o nulos en los ácidos nucleicos no diana en condiciones en las que se desea una unión específica, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* y tratamientos terapéuticos.

"Administración subcutánea" significa administración justo debajo de la piel.

"Dirigido" o "dirigir" significa el proceso de diseño y selección de un compuesto antisentido que se hibridará específicamente con un ácido nucleico diana e inducirá un efecto deseado.

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

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

"Talasemia" se refiere a un subgrupo de anemias (p. ej., α-talasemia, β-talasemia, δ-talasemia, talasemia no dependiente de transfusiones (NTDT)) causadas por la formación de moléculas de hemoglobina anormales que conducen a la destrucción o degradación de glóbulos rojos. Las complicaciones de la talasemia incluyen exceso de hierro (es decir, sobrecarga de hierro en la sangre, ya sea por la talasemia en sí o por transfusiones

frecuentes para tratar la talasemia), mayor riesgo de infección, deformidades óseas, bazos agrandados (es decir, esplenomegalia), tasas de crecimiento más lentas y problemas cardíacos (p. ej., insuficiencia cardíaca congestiva y arritmias).

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

"TMPRSS6" (también conocido como "matriptasa-2") se refiere a cualquier ácido nucleico o proteína de TMPRSS6.

"Ácido nucleico TMPRSS6" significa cualquier ácido nucleico que codifica TMPRSS6. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ácido nucleico TMPRSS6 incluye una secuencia de ADN que codifica TMPRSS6, una secuencia de ARN transcrita a partir de ADN que codifica TMPRSS6 (que incluye ADN genómico que comprende intrones y exones) y una secuencia de ARNm que codifica TMPRSS6.

"ARNm de TMPRSS6" significa un ARNm que codifica una proteína TMPRSS6.

"Inhibidor específico de TMPRSS6" se refiere a cualquier agente capaz de inhibir específicamente la expresión del gen TMPRSS6, ARN TMPRSS6 y/o proteína TMPRSS6 a nivel molecular. Por ejemplo, los inhibidores específicos de TMPRSS6 incluyen ácidos nucleicos (incluidos compuestos antisentido), péptidos, anticuerpos, moléculas pequeñas y otros agentes capaces de inhibir el nivel de TMPRSS6. En ciertas realizaciones, al modular específicamente TMPRSS6, los inhibidores específicos de TMPRSS6 pueden afectar los componentes de la ruta de acumulación de hierro.

"Tratar" se refiere a administrar una composición farmacéutica a un animal para efectuar una alteración o mejora de una enfermedad, trastorno o afección en el animal. En ciertas realizaciones, se pueden administrar una o más composiciones farmacéuticas al animal.

"Nucleótido no modificado" significa un nucleótido compuesto de nucleobases, restos de azúcar y enlaces internucleosídicos que se producen naturalmente. En ciertas realizaciones, un nucleótido no modificado es un nucleótido de ARN (es decir, ® -D-ribonucleótido) o un nucleótido de ADN (es decir, ® -D-desoxirribonucleótido).

Ciertas formas de realización

[0024] En ciertas realizaciones, descritos en este documento son moduladores TMPRSS6. En ciertas realizaciones, los moduladores de TMPRSS6 pueden ser inhibidores específicos de TMPRSS6. En ciertas realizaciones, los inhibidores específicos de TMPRSS6 son ácidos nucleicos (incluidos compuestos antisentido), péptidos, anticuerpos, moléculas pequeñas y otros agentes capaces de inhibir o disminuir la expresión de TMPRSS6.

[0025] En ciertas realizaciones, los métodos se describen en el presente documento para reducir la acumulación de hierro. En ciertas realizaciones, se describen inhibidores de TMPRSS6 como se describe en el presente documento para uso en la reducción de la acumulación de hierro en un animal. En ciertas realizaciones, la acumulación de hierro es el resultado de una terapia para tratar una enfermedad, trastorno o afección en el animal. En ciertas realizaciones, la terapia es la terapia de transfusión. En ciertas realizaciones, la acumulación de hierro se debe a una enfermedad, trastorno o afección en el animal. En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección es hemocromatosis hereditaria o β-talasemia. En ciertas realizaciones, la β-talasemia es β-talasemia mayor, β-talasemia intermedia o β-talasemia menor.

[0026] En ciertas realizaciones, los métodos se describen en el presente documento para aumentar los niveles de hepcidina, tales como ARNm o proteína de los niveles de expresión. En ciertas realizaciones, se describen inhibidores de TMPRSS6 como se describe en el presente documento para uso en niveles crecientes de hepcidina, tales como niveles de expresión de ARNm.

[0027] En ciertas realizaciones, los métodos se describen en el presente documento para disminuir el porcentaje de saturación de transferrina en un animal. En ciertas realizaciones, se describen inhibidores de TMPRSS6 como se describe en el presente documento para usar en la disminución del porcentaje de saturación de transferrina en un animal. En ciertas realizaciones, la disminución de la saturación de transferrina conduce a una disminución en el suministro de hierro para la eritropoyesis. En ciertas realizaciones, la disminución de la eritropoyesis trata, previene, retrasa la aparición, mejora y/o reduce la policitemia, o síntoma de la misma, en el animal. En ciertas realizaciones, la policitemia es policitemia vera. En ciertas realizaciones, el tratamiento con el oligonucleótido modificado dirigido a TMPRSS6 evita o retrasa el avance de la policitemia hacia la leucemia eritroide.

[0028] Los métodos descritos en la presente memoria comprenden administrar al animal una cantidad terapéuticamente efectiva del inhibidor TMPRSS6. En ciertas realizaciones, se describen inhibidores de TMPRSS6 como se describe en el presente documento para su uso en la administración a un animal en una cantidad terapéuticamente efectiva.

[0029] En ciertas realizaciones, se describen métodos para tratar, prevenir, retardar la aparición de, mejorar y/o reducir una enfermedad, trastorno y/o afección, o síntoma de la misma, asociada con el exceso de acumulación de hierro en un animal, que comprende administrando al animal una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de TMPRSS6, en donde la enfermedad, trastorno y/o afección asociada con la acumulación excesiva de hierro se trata, previene, el inicio se retrasa, el síntoma mejora o disminuye.

[0030] En ciertas realizaciones, se describen métodos para tratar, prevenir, retardar la aparición de, mejorar, y/o reducir la hemocromatosis hereditaria, o síntoma de la misma, en un animal, que comprende administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido modificado dirigido a TMPRSS6, en donde el oligonucleótido modificado comprende (a) un segmento de separación que consiste en nucleósidos deoxi unidos (b) un segmento de ala 5' que consiste en nucleósidos unidos (c) un segmento de ala 3' que consiste en nucleósidos unidos, y en donde el segmento de separación es colocado entre el segmento del ala 5' y el segmento del ala 3' y en donde cada nucleósido de cada segmento del ala comprende un azúcar modificado.

[0031] En ciertas realizaciones, se describen métodos para tratar, prevenir, retardar la aparición de, mejorar, y/o reducción de la anemia, o síntoma de la misma, en un animal, que comprende administrar al animal una cantidad terapéuticamente cantidad efectiva de un focalización oligonucleótido modificado TMPRSS6, en donde el oligonucleótido modificado comprende (a) un segmento de separación que consiste en nucleósidos unidos deoxi (b) un segmento de ala 5' que consiste en nucleósidos unidos (c) un segmento de ala 3' que consiste en nucleósidos unidos, y en donde el segmento de separación está posicionado entre el segmento del ala 5' y el segmento del ala 3' y en donde cada nucleósido de cada segmento del ala comprende un azúcar modificado.

[0032] En ciertas realizaciones, se describen métodos para tratar, prevenir, retardar la aparición de, mejorar, y/o reducir β-talasemia, o síntoma de la misma, en un animal, que comprende administrar al animal una cantidad terapéuticamente efectiva de un oligonucleótido modificado dirigido a TMPRSS6, en donde el oligonucleótido modificado comprende (a) un segmento de separación que consiste en nucleósidos desoxi unidos (b) un segmento de ala 5' que consiste en nucleósidos unidos (c) un segmento de ala 3' que consiste en nucleósidos unidos, y en donde el segmento de separación se coloca entre el segmento del ala 5' y el segmento del ala 3' y en donde cada nucleósido de cada segmento del ala comprende un azúcar modificado.

[0033] En ciertas realizaciones, se describen métodos para la disminución de la saturación de transferrina en un animal, que comprende administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido modificado de orientación TMPRSS6, en donde los comprende oligonucleótidos modificados (a) un segmento de hueco que consiste en nucleósidos desoxi enlaces (b) un segmento de ala 5' que consiste en nucleósidos unidos (c) un segmento de ala 3' que consiste en nucleósidos unidos, y en donde el segmento de separación está posicionado entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3' y en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado. En ciertas realizaciones, la disminución de la saturación de transferrina conduce a una disminución en el suministro de hierro para la eritropoyesis. En ciertas realizaciones, la disminución de la eritropoyesis trata, previene, retrasa la aparición, mejora y/o reduce la policitemia, o síntoma de la misma, en el animal. En ciertas realizaciones, la policitemia es policitemia vera. En ciertas realizaciones, el tratamiento con el oligonucleótido modificado dirigido a TMPRSS6 evita o retrasa el avance de la policitemia hacia la leucemia eritroide.

[0034] En ciertas realizaciones, se describen métodos para la identificación de un animal en riesgo de una enfermedad, trastorno y/o condición o que tiene una enfermedad, trastorno y/o afección que está asociada con un exceso de acumulación de hierro, administrar al animal una cantidad terapéuticamente cantidad efectiva de un inhibidor de TMPRSS6, tratando así al animal.

[0035] En ciertas realizaciones, describe en el presente documento es el uso de un inhibidor de TMPRSS6 para la preparación de un medicamento. En ciertas realizaciones, se describen inhibidores de TMPRSS6 como se describe en el presente documento para su uso en la preparación de un medicamento.

[0036] En ciertas realizaciones, descritas en este documento es el uso de un inhibidor de TMPRSS6 como un medicamento para tratar, prevenir, retardar la aparición de, y/o reducir una enfermedad, trastorno y/o afección, o síntoma de la misma, asociada con un exceso de acumulación de hierro en un animal administrando al animal una cantidad terapéuticamente efectiva del inhibidor TMPRSS6. En ciertas realizaciones se describen inhibidores de TMPRSS6 como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento, prevención, retraso del inicio y/o reducción de una enfermedad, trastorno y/o afección, o síntoma de los mismos, asociados con una acumulación excesiva de hierro en un animal.

[0037] En ciertas realizaciones, describe en el presente documento es el uso de un compuesto antisentido TMPRSS6 para inhibir TMPRSS6. En ciertas realizaciones, se describe en el presente documento un compuesto antisentido TMPRSS6 para su uso en la inhibición de TMPRSS6.

[0038] En ciertas realizaciones, la enfermedad es la hemocromatosis. En ciertas realizaciones, la enfermedad está asociada con mutaciones en el gen HFE. En otras realizaciones, la enfermedad está asociada con mutaciones en el gen de hemojuvelina. En otras realizaciones, la enfermedad está asociada con mutaciones en el gen de hepcidina.

[0039] En ciertas realizaciones, describe en el presente documento es el uso de un inhibidor de TMPRSS6 como un medicamento para tratar, prevenir, retardar la aparición de, y/o reducir la policitemia o leucemia del eritroides. En ciertas realizaciones se describen inhibidores de TMPRSS6 como se describe en el presente documento para su uso

en el tratamiento, prevención, retraso del inicio y/o reducción de policitemia o leucemia eritoidea. En ciertas realizaciones, la policitemia incluye, pero no se limita a, policitemia vera (PCV), policitemia rubra vera (PRV) y eritremia.

[0040] En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno y/o afección puede deberse a múltiples transfusiones de sangre. En ciertas realizaciones, las transfusiones múltiples pueden conducir a policitemia. En realizaciones adicionales, múltiples transfusiones de sangre están asociadas con el animal que tiene anemia. Los ejemplos de anemia que requieren múltiples transfusiones de sangre son anemia hereditaria, síndrome mielodisplásico y hemólisis crónica grave. Los ejemplos de anemia hereditaria incluyen, entre otros, anemia falciforme, talasemia, anemia de Fanconi, anemia de Diamond Blackfan, síndrome de Shwachman Diamond, trastornos de la membrana de glóbulos rojos, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o telangiectasia hemorrágica hereditaria. En ciertas realizaciones, la talasemia es β-talasemia. En ciertas realizaciones, la β-talasemia es β-talasemia mayor, β-talasemia intermedia o β-talasemia menor. En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno y/o afección está asociada con un exceso de ingesta de suplemento parenteral de hierro o un exceso de ingesta dietética de hierro.

[0041] En ciertas realizaciones, en el presente documento se divulgan compuestos dirigidos a un ácido nucleico TMPRSS6. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico TMPRSS6 es la secuencia murina establecida en el Nº de acceso GENBANK NM_027902,2 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 1). En ciertas realizaciones, el ácido nucleico TMPRSS6 es cualquiera de las secuencias humanas establecidas en el Nº de acceso GENBANK NM_153609,2 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 2), el complemento del Nº de acceso GENBANK NT_011520,12 truncado de 16850000 a 16891250 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 3), GENBANK Nº de acceso CR456446,1 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 4), GENBANK Nº de acceso BC039082,1 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 5), GENBANK Nº de acceso AY358398,1 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 6), o GENBANK Nº de acceso DB081153,1 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 7).

[0042] En ciertas realizaciones, el ácido nucleico TMPRSS6 es un oligonucleótido modificado. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico TMPRSS6 consiste en 12 a 30, 10 a 30, 8 a 80, 10 a 50, 15 a 30, 18 a 21, 20 a 80, 20 a 35, 20 a 30, 20 a 29, 20 a 28, 20 a 27, 20 a 26, 20 a 25, 20 a 24, 20 a 23, 20 a 22, 20 a 21 o 20 nucleobases unidas. En ciertas de tales realizaciones, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 nucleobases unidas en longitud, o un rango definido por cualquiera de los dos valores anteriores. En realizaciones adicionales, el oligonucleótido modificado es monocatenario.

[0043] En ciertas realizaciones, el compuesto para uso en los procedimientos puede comprender un oligonucleótido modificado que comprende una secuencia de nucleobase al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% complementario a una porción de igual longitud de SEQ ID NOs: 1-7. En ciertas realizaciones, el compuesto puede comprender un oligonucleótido modificado que comprende una secuencia de nucleobase 100% complementaria a una porción de igual longitud de SEQ ID NOs: 1-7.

[0044] En ciertas realizaciones, se describen compuestos para uso en los métodos que comprenden un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobase complementaria a cualquiera de las secuencias enumeradas en SEQ ID NOs: 1-7.

[0045] En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado para uso en los métodos consiste en ácido nucleico TMPRSS6 consta de 12 a 30, 10 a 30, 8 a 80, 10 a 50, 15 a 30, 18 a 21, 20 a 80, 20 a 35, 20 a 30, 20 a 29, 20 a 28, 20 a 27, 20 a 26, 20 a 25, 20 a 24, 20 a 23, 20 a 22, 20 a 21 o 20 nucleobases unidas. En ciertas de tales realizaciones, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 nucleobases unidas en longitud, o un rango definido por cualquiera de los dos valores anteriores.

[0046] En ciertas realizaciones, el compuesto para usar en los métodos tiene al menos un enlace internucleosídico modificado.En ciertas realizaciones, el enlace internucleosídico modificado es un enlace internucleósido fosforotioato.

[0047] En ciertas realizaciones, el compuesto para usar en los métodos tiene al menos un nucleósido que comprende un azúcar modificado. En ciertas realizaciones, al menos un azúcar modificado es un azúcar bicíclico.

[0048] En ciertas realizaciones, el compuesto para usar en los métodos tiene al menos un nucleósido que comprende una nucleobase modificada. En ciertas realizaciones, la nucleobase modificada es una 5-metilcitosina.

[0049] En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado del compuesto para usar en los métodos comprende: (i) un segmento de separación que consiste en desoxinucleósidos unidos; (ii) un segmento de ala 5' que consiste en

nucleósidos unidos; (iii) un segmento de ala 3' que consiste en nucleósidos unidos, en donde el segmento de separación se coloca inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3' y en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado comprende además al menos un enlace internucleosídico de fosforotioato.

[0050] En ciertas realizaciones, se describen métodos o usos en donde el animal es humano.

[0051] En ciertas realizaciones, la administración de un inhibidor de TMPRSS6 reduce la acumulación de hierro en el animal. En ciertas realizaciones, el inhibidor TMPRSS6 aumenta los niveles de expresión de hepcidina. En otras realizaciones, el inhibidor TMPRSS6 disminuye el porcentaje de saturación de transferrina.

[0052] En ciertas realizaciones, el compuesto se coadministra con uno o más segundo(s) agente(s). En ciertas realizaciones, el segundo agente es un quelante de hierro o un agonista de hepcidina. En realizaciones adicionales, el quelante de hierro incluye FBS0701 (FerroKin), Exjade, desferal o Deferiprone. En ciertas realizaciones, el segundo agente es un segundo compuesto antisentido. En realizaciones adicionales, el segundo compuesto antisentido se dirige a TMPRSS6. En otras realizaciones, el segundo compuesto antisentido se dirige a un compuesto no TMPRSS6. En otras realizaciones, el inhibidor TMPRSS6 se administra antes, durante o después de la terapia de flebotomía.

Compuestos antisentido

[0053] Los compuestos oligoméricos incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos, compuestos antisentido, oligonucleótidos antisentido, y ARNsi. Un compuesto oligomérico puede ser "antisentido" para un ácido nucleico diana, lo que significa que es capaz de someterse a hibridación con un ácido nucleico diana a través de enlaces de hidrógeno.

[0054] En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobases que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana a la que está dirigido. En ciertas realizaciones de este tipo, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobase que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana al que se dirige.

[0055] En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico TMPRSS6 es de 10 a 30 nucleótidos de longitud. En otras palabras, los compuestos antisentido son de 10 a 30 nucleobases unidas. En otras realizaciones, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 8 a 80, 10 a 80, 12 a 50, 15 a 30, 18 a 24, 19 a 22 o 20 nucleobases unidas. En ciertas de tales realizaciones, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 nucleobases unidas en longitud, o un rango definido por cualquiera de los dos valores anteriores. En algunas realizaciones, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido.

[0056] En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado acortado o truncado. El oligonucleótido modificado acortado o truncado puede tener un solo nucleósido eliminado del extremo 5' (truncamiento 5'), la porción central o, alternativamente, del extremo 3' (truncamiento 3'). Un oligonucleótido acortado o truncado puede tener dos o más nucleósidos eliminados del extremo 5', dos o más nucleósidos eliminados de la porción central o, alternativamente, puede tener dos o más nucleósidos eliminados del extremo 3'. Alternativamente, los nucleósidos eliminados pueden dispersarse por todo el oligonucleótido modificado, p. ej., en un compuesto antisentido que tiene uno o más nucleósidos eliminados del extremo 5', uno o más nucleósidos eliminados de la porción central y/o uno o más nucleósidos eliminados del 3' final.

[0057] Cuando un solo nucleósido adicional está presente en un oligonucleótido alargado, el nucleósido adicional puede estar situado en el extremo 5', extremo 3' o parte central del oligonucleótido. Cuando están presentes dos o más nucleósidos adicionales, los nucleósidos añadidos pueden estar adyacentes entre sí, p. ej., en un oligonucleótido que tiene dos nucleósidos añadidos al extremo 5' (adición 5'), al extremo 3' (adición 3') o la porción central, del oligonucleótido. Alternativamente, el nucleósido agregado puede dispersarse a través del compuesto antisentido, p. ej., en un oligonucleótido que tiene uno o más nucleósidos agregados al extremo 5', uno o más nucleósidos agregados al extremo 3', y/o uno o más nucleósidos agregados a la porción central.

[0058] Es posible aumentar o disminuir la longitud de un compuesto antisentido, tal como un oligonucleótido antisentido, y/o introducir bases desajuste sin eliminar la actividad. Por ejemplo, en Woolf et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 7305-7309, 1992), se probó una serie de oligonucleótidos antisentido de 13-25 nucleobases de longitud para determinar su capacidad para inducir la escisión de un ARN diana en un modelo de inyección de ovocitos. Los oligonucleótidos antisentido de 25 nucleobases de longitud con 8 u 11 bases de emparejamiento erróneo cerca de los extremos de los oligonucleótidos antisentido pudieron dirigir la escisión específica del ARNm diana, aunque en menor medida que los oligonucleótidos antisentido que no contenían emparejamientos erróneos. De manera similar, se logró

la escisión específica de la diana usando oligonucleótidos antisentido de 13 nucleobases, incluidos aquellos con 1 o 3 desajustes.

[0059] Gautschi et al (J. Natl Cancer Inst 93: 463 a 471, marzo de 2001) demostró la capacidad de un oligonucleótido que tiene 100% de complementariedad con el ARNm de bcl-2 y que tiene 3 desapareamientos con el ARNm de bcl-xL a reducir la expresión de bcl-2 y bcl-xL in vitro e in vivo. Además, este oligonucleótido demostró una potente actividad antitumoral in vivo.

[0060] Maher y Dolnick (Nuc Acid R es 16: 3341-3358, 1988) probó una serie de 14 oligonucleótidos antisentido tándem de nucleobases, y unos 28 y 42 oligonucleótidos antisentido de nucleobases compuestos de la secuencia de dos o tres de los oligonucleótidos antisentido tándem, respectivamente, por su capacidad para detener la traducción de DHFR humano en un ensayo de reticulocitos de conejo. Cada uno de los tres oligonucleótidos antisentido de 14 nucleobases solo fue capaz de inhibir la traducción, aunque a un nivel más modesto que los 28 o 42 oligonucleótidos antisentido de nucleobase.

Motivos compuestos antisentido

[0061] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico TMPRSS6 han modificado químicamente subunidades dispuestas en patrones, o motivos, para conferir a las propiedades de los compuestos antisentido tales como actividad mejorada del inhibidor, aumento de la afinidad de unión por un ácido nucleico diana o resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*.

[0062] Compuestos antisentido quiméricos contienen típicamente al menos una región modificada de modo que confieren mayor resistencia a la degradación por nucleasas, aumento de la captación celular, aumento de la afinidad de unión para el ácido nucleico diana, y/o aumento de la actividad inhibidora. Una segunda región de un compuesto antisentido quimérico puede servir opcionalmente como sustrato para la endonucleasa celular RNasa H, que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN.

[0063] Los compuestos antisentido que tienen un motivo gapmer se consideran compuestos antisentido quiméricos. En un gapmer, una región interna que tiene una pluralidad de nucleótidos que soporta la escisión de RNasa H se coloca entre regiones externas que tienen una pluralidad de nucleótidos que son químicamente distintos de los nucleósidos de la región interna. En el caso de un oligonucleótido antisentido que tiene un motivo gapmer, el segmento gap generalmente sirve como sustrato para la escisión de la endonucleasa, mientras que los segmentos del ala comprenden nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, las regiones de un gapmer se diferencian por los tipos de restos de azúcar que comprenden cada región distinta. Los tipos de restos de azúcar que se usan para diferenciar las regiones de un gapmer pueden en algunas realizaciones incluir β-D-ribonucleósidos, β-D-desoxirribonucleósidos, nucleósidos modificados en 2' (tales nucleósidos modificados en 2' pueden incluir 2'-MOE, y 2'-O-CH_3, entre otros), y nucleósidos bicíclicos modificados en el azúcar (tales nucleósidos bicíclicos modificados en el azúcar pueden incluir los que tienen un puente 4'-(CH2)n-O-2', donde n = 1 o n = 2) Preferiblemente, cada región distinta comprende restos de azúcar uniformes. El motivo ala-espacio-ala se describe con frecuencia como "X-Y-Z", donde "X" representa la longitud de la región del ala 5', "Y" representa la longitud de la región del espacio, y "Z" representa la longitud de los 3' región del ala. Como se usa en este documento, un separador descrito como "X-Y-Z" tiene una configuración tal que el segmento de separación se coloca inmediatamente adyacente a cada uno de los segmentos del ala 5' y el segmento del ala 3'. Por lo tanto, no existen nucleótidos intermedios entre el segmento de ala 5' y el segmento de separación, o el segmento de separación y el segmento de ala 3'. Cualquiera de los compuestos antisentido descritos en el presente documento puede tener un motivo gapmer. En algunas realizaciones, X y Z son iguales; en otras realizaciones son diferentes. En una realización preferida, Y tiene entre 8 y 15 nucleótidos. X, Y o Z pueden ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más nucleótidos. Por lo tanto, los gapmers incluyen, entre otros, por ejemplo 5-10-5, 4-8-4, 4-12-3, 4-12-4, 3-14-3, 2-13-5, 2-16-2, 1-18-1, 3-10-3, 2-10-2, 1-10-1, 2-8-2, 6-8-6, 5-8-5, 1-8-1, 2-6-2, 6-8-6, 5-8-5, 1-8-1, 2-6-2, 2-13-2, 1-8-2, 2-8-3, 3-10-2, 1-18-2 o 2-18-2.

[0064] En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido como un motivo "wingmer", que tiene un ala-hueco o configuración de brecha de ala, es decir, una configuración X-Y o Y-Z como se describió anteriormente para la configuración de gapmer. Por lo tanto, las configuraciones de wingmer incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo 5-10, 8-4, 4-12, 12-4, 3-14, 16-2, 18-1, 10-3, 2-10, 1-10, 8-2, 2-13 o 5-13.

Ácidos nucleicos diana, regiones diana y secuencias de nucleótidos

[0065] Las secuencias de nucleótidos que codifican TMPRSS6 incluyen, sin limitación, los siguientes: Nº de acceso NM_027902,2 (incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 1), Nº de acceso GENBANK NM_153609,2 (incorporados aquí como SEQ ID NO: 2), el complemento de Nº de acceso GENBANK NT_011520,12 truncado de 16850000 a 16891250 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 3), Nº de acceso GENBANK CR456446,1 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 4), Nº de acceso GENBANK BC039082,1 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 5), Nº de acceso GENBANK AY358398,1 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 6), o Nº de acceso GENBANK DB081153,1 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 7).

[0066] Se entiende que el cuarto conjunto de secuencias en cada SEQ ID NO en los ejemplos contenía el presente documento es independiente de cualquier modificación de un resto azúcar, un enlace internucleosídico o una base nucleotídica. Como tal, los compuestos antisentido definidos por una SEQ ID NO pueden comprender, independientemente, una o más modificaciones a un resto de azúcar, un enlace internucleosídico o una nucleobase. Los compuestos antisentido descritos por Isis Number (Isis Nº) indican una combinación de secuencia de nucleobase y motivo.

[0067] En ciertas realizaciones, una región diana es una región estructuralmente definida del ácido nucleico diana. Por ejemplo, una región diana puede abarcar un 3’ UTR, un 5' UTR, un exón, un intrón, una unión exón/intrón, una región de codificación, una región de inicio de traducción, una región de terminación de traducción u otra región definida de ácido nucleico. Las regiones estructuralmente definidas para TMPRSS6 se pueden obtener mediante el número de acceso a partir de bases de datos de secuencia como NCBI. En ciertas realizaciones, una región diana puede abarcar la secuencia desde un sitio diana 5’ de un segmento diana dentro de la región diana hasta un sitio diana 3' de otro segmento diana dentro de la región diana.

[0068] En ciertas realizaciones, un "segmento diana" es una sub-porción más pequeña de una región diana dentro de un ácido nucleico. Por ejemplo, un segmento diana puede ser la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico diana al que se dirige uno o más compuestos antisentido. "Sitio diana 5’" se refiere al nucleótido más 5' de un segmento diana. "Sitio diana 3’" se refiere al nucleótido más 3' de un segmento diana.

[0069] La orientación incluye la determinación de al menos un segmento diana al que se hibrida un compuesto antisentido, de modo que se produce un efecto deseado. En ciertas realizaciones, el efecto deseado es una reducción en los niveles de ácido nucleico diana de ARNm. En ciertas realizaciones, el efecto deseado es la reducción de los niveles de proteína codificada por el ácido nucleico diana o un cambio fenotípico asociado con el ácido nucleico diana.

[0070] Una región diana puede contener uno o más segmentos diana. Múltiples segmentos diana dentro de una región diana pueden superponerse. Alternativamente, pueden no superponerse. En ciertas realizaciones, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por no más de aproximadamente 300 nucleótidos. En ciertas realizaciones, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por una cantidad de nucleótidos que es, es aproximadamente, no es más que, no es más que aproximadamente, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 o 10 nucleótidos en el ácido nucleico diana, o es un rango definido por cualquiera de los dos valores anteriores. En ciertas realizaciones, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por no más de, o no más de aproximadamente 5 nucleótidos en el ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, los segmentos diana son contiguos. Se contemplan regiones diana definidas por un intervalo que tiene un ácido nucleico inicial que es cualquiera de los sitios diana 5’ o sitios diana 3' enumerados aquí.

[0071] Segmentos diana adecuados se pueden encontrar dentro de un 5' UTR, una región codificante, una 3' UTR, un intrón, un exón, o un exón/intrón de conexiones. Los segmentos diana que contienen un codón de inicio o un codón de parada también son segmentos diana adecuados. Un segmento diana adecuado puede excluir específicamente una determinada región estructuralmente definida, como el codón de inicio o el codón de detención.

[0072] La determinación de segmentos diana adecuados pueden incluir una comparación de la secuencia de un ácido nucleico diana a otras secuencias de todo el genoma. Por ejemplo, el algoritmo BLAST puede usarse para identificar regiones de similitud entre diferentes ácidos nucleicos. Esta comparación puede evitar la selección de secuencias de compuestos antisentido que pueden hibridarse de manera no específica a secuencias distintas de un ácido nucleico diana seleccionado (es decir, secuencias no diana o fuera de diana).

[0073] Puede haber variación en la actividad (p. ej., como se define por el porcentaje de reducción de los niveles de ácido nucleico diana) de los compuestos antisentido dentro de una región diana activa. En ciertas realizaciones, las reducciones en los niveles de ARNm de TMPRSS6 son indicativas de inhibición de la expresión de TMPRSS6. Las reducciones en los niveles de una proteína TMPRSS6 también son indicativas de inhibición de la expresión de TMPRSS6. Además, los cambios fenotípicos son indicativos de inhibición de la expresión de TMPRSS6. Por ejemplo, un aumento en los niveles de expresión de hepcidina puede ser indicativo de inhibición de la expresión de TMPRSS6. En otro ejemplo, una disminución en la acumulación de hierro en los tejidos puede ser indicativa de inhibición de la expresión de TMPRSS6. En otro ejemplo, un aumento en el porcentaje de saturación de transferrina puede ser indicativo de inhibición de la expresión de TMPRSS6.

Hibridación

[0074] En algunas realizaciones, la hibridación ocurre entre un compuesto antisentido descrito en este documento y un TMPRSS6ácido nucleico. El mecanismo más común de hibridación implica la unión de hidrógeno (p. ej., Watson-Crick, Hoogsteen o unión de hidrógeno de Hoogsteen invertida) entre nucleobases complementarias de las moléculas de ácido nucleico.

[0075] La hibridación puede ocurrir en diferentes condiciones. Las condiciones estrictas dependen de la secuencia y son determinadas por la naturaleza y composición de las moléculas de ácido nucleico a hibridar.

[0076] Los métodos para determinar si una secuencia es específicamente hibridable con un ácido nucleico diana son bien conocidos en la técnica (Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., 2001). En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido descritos en este documento son específicamente hibridables con un ácido nucleico TMPRSS6.

Complementariedad

[0077] Un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana son complementarios entre sí cuando un número suficiente de nucleobases de la unión puede hidrógeno compuesto antisentido con el correspondiente nucleobases del ácido nucleico diana, de modo que se producirá un efecto deseado (p. ej., inhibición antisentido de un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico TMPRSS6).

[0078] Nucleobases no complementarias entre un compuesto antisentido y un ácido nucleico TMPRSS6 pueden tolerarse siempre que el compuesto antisentido sigue siendo capaz de hibridarse específicamente a un ácido nucleico diana. Además, un compuesto antisentido puede hibridarse sobre uno o más segmentos de un ácido nucleico TMPRSS6 de tal manera que los segmentos intermedios o adyacentes no estén involucrados en el evento de hibridación (p. ej., una estructura de bucle, desajuste o estructura de horquilla).

[0079] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido divulgados en el presente documento, o una porción especificada de la misma, son, o son al menos, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% complementario a un ácido nucleico TMPRSS6, una región diana, un segmento diana o una porción específica del mismo. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con un ácido nucleico diana se puede determinar utilizando métodos de rutina. Por ejemplo, un compuesto antisentido en donde 18 de 20 nucleobases del compuesto antisentido son complementarias de una región diana y, por lo tanto, se hibridarían específicamente, representarían un 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, las nucleobases no complementarias restantes pueden estar agrupadas o intercaladas con nucleobases complementarias y no necesitan ser contiguas entre sí o con nucleobases complementarias. Como tal, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleobases de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleobases no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de completa complementariedad con el ácido nucleico diana tendría 77,8% de complementariedad general con el ácido nucleico diana y, por lo tanto, caería dentro del alcance de la presente divulgación.

[0080] El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente utilizando programas BLAST (herramientas básicas de búsqueda de alineación local) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403 410; Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7, 649 656). El porcentaje de homología, identidad de secuencia o complementariedad puede determinarse, p. ej., mediante el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University ResearCHPark, Madison Wis.), utilizando la configuración predeterminada, que utiliza algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981,2, 482 489).

[0081] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido divulgados en el presente documento, o partes especificadas de los mismos, son completamente complementarios (es decir, 100% complementarias) a un ácido nucleico diana, o una porción especificada de la misma. Por ejemplo, el compuesto antisentido puede ser completamente complementario a un ácido nucleico TMPRSS6, o una región diana, o un segmento diana o secuencia diana del mismo. Como se usa en el presente documento, "completamente complementario" significa que cada nucleobase de un compuesto antisentido es capaz de emparejar bases precisas con las nucleobases correspondientes de un ácido nucleico diana. Por ejemplo, un compuesto antisentido de 20 nucleobases es completamente complementario a una secuencia diana que tiene una longitud de 400 nucleobases, siempre que haya una porción correspondiente de 20 nucleobases del ácido nucleico diana que sea completamente complementaria al compuesto antisentido. Completamente complementario también puede usarse en referencia a una porción especificada del primer y/o el segundo ácido nucleico. Por ejemplo, una porción de 20 nucleobases de un compuesto antisentido de 30 nucleobases puede ser "completamente complementaria" a una secuencia diana que tiene una longitud de 400 nucleobases. La porción de 20 nucleobases del oligonucleótido de 30 nucleobases es completamente complementaria a la secuencia diana si la secuencia diana tiene una porción correspondiente de 20 nucleobase en donde cada nucleobase es complementaria a la porción de 20 nucleobase del compuesto antisentido. Al mismo tiempo, el compuesto antisentido de 30 nucleobases completo puede o no ser completamente complementario a la secuencia diana, dependiendo de si las 10 nucleobases restantes del compuesto antisentido también son complementarias a la secuencia diana.

[0082] La ubicación de una nucleobase no complementaria puede estar en el extremo 5’ o extremo 3' del compuesto antisentido. Alternativamente, la nucleobase o nucleobases no complementarias pueden estar en una posición interna del compuesto antisentido. Cuando están presentes dos o más nucleobases no complementarias, pueden ser contiguas (es decir, unidas) o no contiguas. En una realización, una nucleobase no complementaria se encuentra en el segmento del ala de un oligonucleótido antisentido gapmer.

[0083] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido que son, o son de hasta, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases de longitud comprenden no más de 4, no más de 3, no más de 2, o no más de 1 nucleobase(s) no complementaria(s) con respecto a un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico TMPRSS6, o una porción especificada del mismo.

[0084] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido que son, o son de hasta, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleobases de longitud comprenden no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2, o no más de 1 nucleobase(s) no complementaria(s) en relación con un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico TMPRSS6, o una porción especificada del mismo.

[0085] Los compuestos antisentido divulgados en el presente documento también incluyen los que son complementarios a una porción de una diana de ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, "porción" se refiere a un número definido de nucleobases contiguas (es decir, unidas) dentro de una región o segmento de un ácido nucleico diana. Una "porción" también puede referirse a un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 8 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios a al menos una porción de nucleobase de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 15 nucleobases de un segmento diana. También se contemplan compuestos antisentido que son complementarios de al menos una porción de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleobases de un segmento diana, o un rango definido por cualquiera de estos dos valores.

Identidad

[0086] Los compuestos antisentido descritos en este documento también pueden tener un porcentaje de identidad se define a un nucleótido particular, secuencia, SEQ ID NO, o compuesto representado por un número Isis específico, o porción del mismo. Como se usa en el presente documento, un compuesto antisentido es idéntico a la secuencia descrita en el presente documento si tiene la misma capacidad de emparejamiento de nucleobase. Por ejemplo, un ARN que contiene uracilo en lugar de timidina en una secuencia de ADN descrita se consideraría idéntico a la secuencia de ADN ya que tanto el uracilo como la timidina se emparejan con adenina. También se contemplan versiones acortadas y alargadas de los compuestos antisentido descritos en el presente documento, así como los compuestos que tienen bases no idénticas con respecto a los compuestos antisentido descritos en el presente documento. Las bases no idénticas pueden ser adyacentes entre sí o dispersas por todo el compuesto antisentido. El porcentaje de identidad de un compuesto antisentido se calcula de acuerdo con el número de bases que tienen un emparejamiento de bases idéntico en relación con la secuencia con la que se compara.

[0087] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido, o porciones de los mismos, son al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntico a uno o más de los compuestos antisentido o SEQ ID NO, o una porción de los mismos, descritos aquí.

Modificaciones

[0088] Un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La porción de nucleobase (también conocida como base) del nucleósido es normalmente un resto de base heterocíclica. Los nucleótidos son nucleósidos que además incluyen un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede unirse al resto hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. Los oligonucleótidos se forman a través del enlace covalente de nucleósidos adyacentes entre sí, para formar un oligonucleótido polimérico lineal. Dentro de la estructura oligonucleotídica, los grupos fosfato se denominan comúnmente formando los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido.

[0089] Las modificaciones a compuestos antisentido abarcan sustituciones o modificaciones de enlaces internucleósido, restos de azúcar, o nucleobases. Los compuestos antisentido modificados a menudo se prefieren a las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, p. ej., captación celular mejorada, afinidad mejorada por la diana de ácido nucleico, mayor estabilidad en presencia de nucleasas o mayor actividad inhibitoria.

[0090] Nucleósidos químicamente modificados también se pueden emplear para aumentar la afinidad de unión de un oligonucleótido antisentido acortado o truncado por su ácido nucleico diana. En consecuencia, a menudo se pueden obtener resultados comparables con compuestos antisentido más cortos que tienen tales nucleósidos modificados químicamente.

Enlaces modificados internucleosídicos

[0091] El enlace internucleosídico de origen natural de ARN y ADN es un enlace 3' a 5' fosfodiéster. Los compuestos antisentido que tienen uno o más enlaces internucleosídicos modificados, es decir, de origen no natural, a menudo se seleccionan sobre los compuestos antisentido que tienen enlaces internucleosídicos de origen natural debido a

propiedades deseables tales como, p. ej., captación celular mejorada, afinidad mejorada por los ácidos nucleicos diana y aumento de estabilidad en presencia de nucleasas.

[0092] Los oligonucleótidos que tienen enlaces internucleosídicos modificados incluyen enlaces internucleosídicos que retienen un átomo de fósforo, así como enlaces internucleósidos que no tienen un átomo de fósforo. Los enlaces internucleosídicos que contienen fósforo representativos incluyen, pero no se limitan a, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidato y fosforotioatos. Los métodos de preparación de enlaces que contienen fósforo y no fósforo son bien conocidos.

[0093] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico TMPRSS6 comprenden uno o más enlaces internucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, los enlaces internucleosídicos modificados son enlaces de fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico de un compuesto antisentido es un enlace internucleósido de fosforotioato.

Restos de azúcar modificados

[0094] Los compuestos antisentido pueden contener opcionalmente uno o más nucleósidos en donde el grupo azúcar se ha modificado. Dichos nucleósidos modificados con azúcar pueden impartir mayor estabilidad de la nucleasa, mayor afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, los nucleósidos comprenden restos de anillo de ribofuranosa modificados quimicamente. Los ejemplos de anillos de ribofuranosa modificados químicamente incluyen, sin limitación, la adición de grupos sustituyentes (incluidos grupos sustituyentes 5' y 2', puente de átomos de anillo no geminal para formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA), reemplazo del átomo de oxígeno del anillo de ribosilo con S, N(R) o C(R^1) (R^2) (R, R^1 y R^2 son cada uno independientemente H, alquilo C_1-C_{12} o un grupo protector) y combinaciones de los mismos. Ejemplos de azúcares modificados químicamente incluyen 2' -F-5'-nucleósido sustituido con metilo (consulte la solicitud internacional PCT WO 2008/101157 publicada el 21/08/08 para otros nucleósidos 5', 2'-bis sustituidos descritos) o la sustitución del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con Scon sustitución adicional en la posición 2' (véase la solicitud de patente de EE.UU. publicada US2005-0130923, publicada el 16 de junio de 2005) o, alternativamente, la sustitución 5' de un BNA (véase la solicitud internacional PCT WO 2007/134181 publicada el 22/11/07 en donde LNA está sustituido con, p. ej., un extremo 5' metilo o un grupo 5'-vinilo).

[0095] Ejemplos de nucleósidos que tienen restos de azúcar modificados incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden grupos sustituyentes 5'-vinilo, 5'-metilo (*R* o *S*), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH_3, 2'-OCH_2CH_3, 2'-OCH_2CH_2F y 2'-$O(CH_2)_2OCH_3$. El sustituyente en la posición 2' también se puede seleccionar de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-C_1-C_{10} alquilo, OCF_3, OCH_2F, O $(CH_2)_2$ SCH_3, $O(CH_2)_2$-O-N(R_m)(R_n), O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n), y O-CH_2-C(=O)-N(R^1)-$(CH_2)_2$ -N(R_m)(R_n), donde cada R^1, R_m y R_n es, independientemente, H o alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido.

[0096] Como se usa en este documento, "nucleósidos bicíclicos" se refieren a nucleósidos modificados que comprenden un resto de azúcar bicíclico. Los ejemplos de nucleósidos bicíclicos incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo ribosilo 4' y 2'. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido descritos en este documento incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos que comprenden un puente de 4' a 2'. Los ejemplos de tales nucleósidos bicíclicos puenteados de 4' a 2' incluyen, entre otros, una de las 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 Estados Unidos 7,399,845, emitida el 15 de julio de 2008); 4'-C(CH_3) (CH_3)-O-2' (y análogos de los mismos ver solicitud internacional publicada WO/2009/006478, publicada el 8 de enero de, 2009); 4'-CH_2-N(OCH_3)-2' (y análogos de los mismos ver solicitud internacional publicada WO/2008/150729, publicada el 11 de diciembre de 2008); 4'-CH_2-O-N(CH_3)-2' (véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos desde 2004-0171570, publicada el 2 de septiembre del 2004); 4'-CH_2-N(R)-O-2', en donde R es H, C_1-C_{12} alquilo, o un grupo protector (véase la patente de EE.UU. 7,427,672, expedida el 23 de septiembre de 2008); 4'-CH_2-C(H)(CH_3)-2' (ver Chattopadhyaya et al, J. Org Chem, 2009, 74, 118-134...); y 4' CH_2-C(=CH_2)-2' (y análogos de los mismos ver la solicitud internacional publicada WO 2008/154401, publicada el 8 de diciembre, 2008).

[0097] Otros informes relacionados con los nucleósidos bicíclicos que también se encuentran en la literatura publicada (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. EE.UU., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007,129 (26) 8362-8379; Elayadi et al., Curr. Opinion Invest. Drugs, 2001,2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8,1-7; y Orum et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239 -243; patentes estadounidenses números 6,268,490; 6,525,191; 6,670,461; 6,770,748; 6,794,499; 7,034,133; 7,053,207; 7,399,845; 7,547,684; y 7,696,345; publicación número de patente de Estados Unidos US2008-0039618; US2009-0012281; números de patente estadounidense 98,974. 61/026,995; 61/026,998; 61/056,564; 61/086,231; 61/097,787; y 61/099,844; Solicitudes PCT internacionales publicadas WO 1994/014226; WO 2004/106356; WO 2005/02 1570; WO 2007/134181; WO 2008/150729; WO 2008/154401; y WO 2009/006478. Cada uno de los nucleósidos bicíclicos anteriores se puede preparar con una o más configuraciones de azúcar estereoquímicas que incluyen, p. ej., α-L-ribofuranosa y β-D-ribofuranosa (véase la solicitud internacional PCT PCT/DK98/00393, publicada el 25 de marzo de 1999 como WO 99/14226).

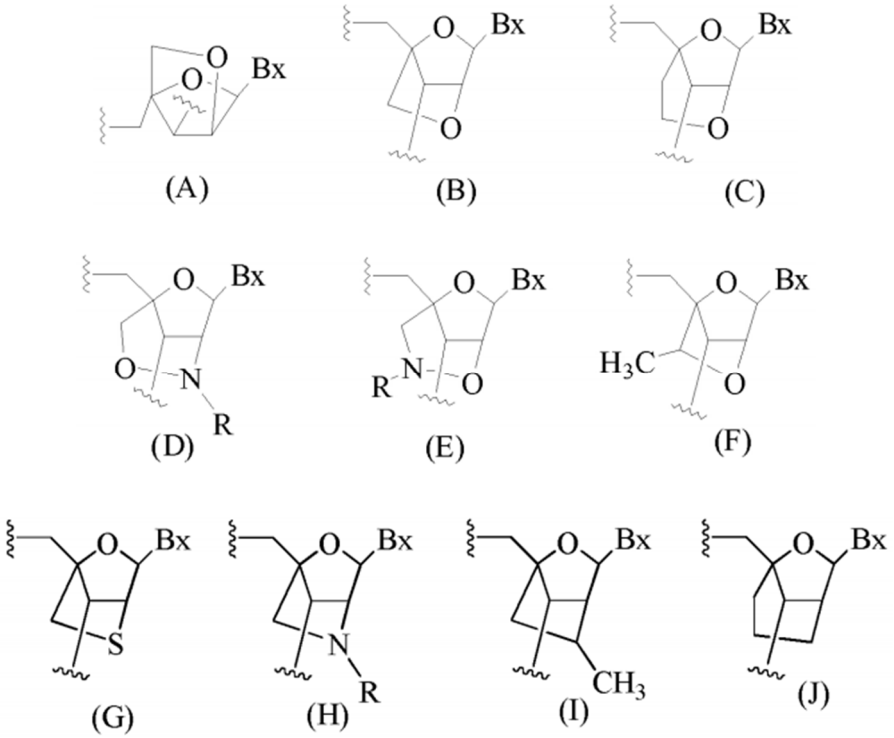
[0098] En ciertas realizaciones, restos de azúcares bicíclicos de nucleósidos BNA incluyen, pero no se limitan a, compuestos que tienen al menos un puente entre la posición 4' y la posición 2' del resto de azúcar pentofuranosilo en donde dichos puentes comprende independientemente 1 o de 2 a 4 grupos vinculados seleccionados independientemente de -[C(R_a) (R_b)] *n*-, -C(R_a) = C(R_b)-, -C(R_a) = N-, -C(=O)-, -C(=NR_a)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R_a)$_2$-, -S(=O)$_x$ -, y -N(R_a)-;
en donde:

x es 0, 1 o 2;
n es 1,2, 3 o 4;
cada R^a y R^b es, independientemente, H, un grupo protector, hidroxilo, C_1-C_{12} alquilo, C_1-C_{12} alquilo sustituido, C_2-C_{12} alquenilo, C_2-C_{12} alquenilo sustituido, C_2-C_{12} alquinilo, C_2-C_{12} alquinilo sustituido, C_5-C_{20} arilo, sustituido, C_5-C_{20} arilo, heterociclo radical, heterociclo radical sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, C_5-C_7 radical alicíclico, radical C_5-C_7 alicíclico sustituido, halógeno, OJ_1, NJ_1J_2, SJ_1, N_3, $COOJ_1$, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, CN, sulfonilo (S(=O)$_2$-J_1) o sulfoxilo (S(=O)-J_1); y
cada J_1 y J_2 es, independientemente, H, C_1-C_{12} alquilo, C_1-C_{12} alquilo sustituido, C_2-C_{12} alquenilo, C_2-C_{12} alquenilo sustituido, C_2-C_{12} alquinilo, C_2-C_{12} alquinilo sustituido, C_5-C_{20} arilo, C_5-C_{20} arilo sustituido, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, C_1-C_{12} aminoalquilo, C_1-C_{12} aminoalquilo sustituido o un grupo protector.

[0099] En ciertas realizaciones, el puente de un resto de azúcar bicíclico es -[C(R^a) (R^b)]$_n$-, -[C(R^a)(R^b)]$_n$-O-, -C(R^aR^b)-N(R)-O- o -C(R^aR^b)-O-N(R)-. En ciertas realizaciones, el puente es 4'-CH_2-2', 4'-$(CH_2)_2$-2', 4'-$(CH_2)_3$-2', 4'-CH_2-O-2', 4'-$(CH_2)_2$-O-2', 4'-CH_2-ON (R)-2' y 4'-CH_2-N(R)-O-2'-, en donde cada R es, independientemente, H, un protector de grupo o C_1-C_{12} alquilo.

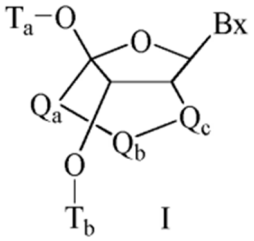
[0100] En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos se definen adicionalmente por configuración isomérica. Por ejemplo, un nucleósido que comprende un puente 4'-2' metileno-oxi, puede estar en la configuración α-L o en la configuración β-D. Anteriormente, α-L-metilenoxi (4'-CH_2-O-2') BNA de se han incorporado en oligonucleótidos antisentido que mostraban antisentido actividad (Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372).

[0101] En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos que incluyen, pero no se limitan a, (A) α-L-metilenoxi (4'-CH_2-O-2') BNA, (B) β-D-metilenoxi (4' -CH_2-O-2') BNA, (C) etileneoxi (4'-$(CH_2)_2$-O-2') BNA, (D) aminooxi (4'-CH_2-ON (R)-2') BNA, (E) oxiamino (4'-CH_2-N(R)-O-2') BNA y (F) metilo (metileneoxi) (4'-CH(CH_3)-O-2') BNA, (G) metileno-tio (4'-CH_2-S-2') BNA, (H) metileno-amino (4'-CH_2-N(R)-2') BNA, (I) metilo carbocíclico (4'-CH_2-CH(CH_3)-2') BNA, y (J) propileno carbocíclico (4'-$(CH_2)_3$-2') BNA como se muestra a continuación.



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

[0102] En ciertas realizaciones, se describen nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula I:

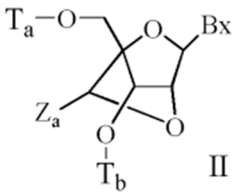


I

en donde:

Bx es un resto de base heterocíclico;
$-Q_a-Q_b-Q_c-$ 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 $-CN(R_C)-O-CH_2$;
R_c es C_1-C_{12} alquilo o un grupo protector de amino; y T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte.

[0103] En ciertas realizaciones, se describen nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula II:



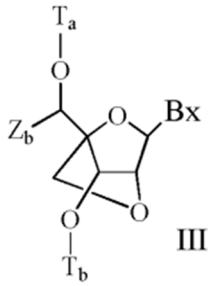
II

en donde:

Bx es un resto de base heterocíclico;
T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;
Z_a es C_1-C_6 alquilo, C_2-C_6 alquenilo, C_2-C_6 alquinilo, C_1-C_6 alquilo sustituido, C_2-C_6 alquenilo sustituido, C_2-C_6 alquinilo sustituido, acilo, acilo sustituido, amida sustituida, tiol o tio sustituido.

[0104] En una realización, cada uno de los grupos sustituidos es, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, oxo, hidroxilo, OJ_c, NJ_cJ_d, SJ_c, N_3, $O-C(=X)J_c$, y $NJ_eC(=X)\ NJ_cJ_d$, en donde cada J_c, J_d y J_e es, independientemente, H, alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido y X es O o NJ_c.

[0105] En ciertas realizaciones, se describen nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula III:

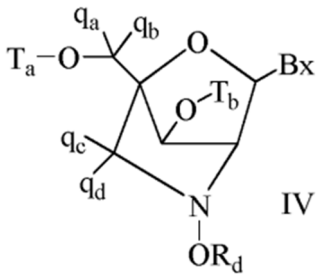


III

en donde:

Bx es un resto de base heterocíclico;
T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;
Z_b es C_1-C_6 alquilo, C_2-C_6 alquenilo, C_2-C_6 alquinilo, C_1-C_6 alquilo sustituido, C_2-C_6 alquenilo sustituido, C_2-C_6 alquinilo sustituido o acilo sustituido (C(=O)-).

[0106] En ciertas realizaciones, se describen nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula IV:

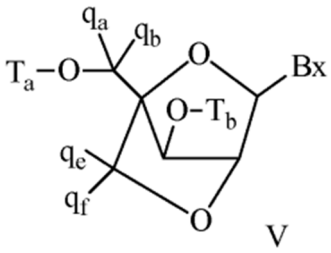


IV

en donde:

Bx es un resto de base heterocíclico; T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte; R_d es C_1-C_6 alquilo, alquilo C_1-C_6 alquilo sustituido, C_2-C_6 alquenilo, sustituido C_2-C_6 alquenilo, C_2-C_6 alquinilo o sustituido C_2-C_6 alquinilo; cada q_a, q_b, q_c y q_d es, independientemente, H, halógeno, C_1-C_6 alquilo, C_1-C_6 alquilo sustituido, C_2-C_6 alquenilo, sustituido C_2-C_6 alquenilo, C_2-C_6 alquinilo o C_2-C_6 alquinilo sustituido, C_1-C_6 alcoxilo, sustituido C_1-C_6 alcoxilo, acilo, acilo sustituido, C_1-C_6 aminoalquilo o C_1-C_6 aminoalquilo sustituido;

[0107] En ciertas realizaciones, se describen nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula V:



V

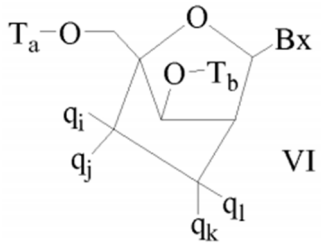
en donde:

Bx es un resto de base heterocíclica;
T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;
q_a, q_b, q_e y q_f son cada uno, independientemente, hidrógeno, halógeno, C_1-C_{12} alquilo, C_1-C_{12} alquilo sustituido, C_2-C_{12} alquenilo, C_2-C_{12} alquenilo sustituido, C_2-C_{12} alquinilo, C_2-C_{12} alquinilo sustituido, C_1-C_{12} alcoxi, C_1-C_{12} alcoxi sustituido, O_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-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 son = C(q_g) (q_h);
q_g y q_h son cada uno, independientemente, H, halógeno, C_1-C_{12} alquilo o C_1-C_{12} alquilo sustituido.

[0108] La síntesis y la preparación de metilenoxi (4'-CH_2-O-2') BNA monómeros adenina, citosina, guanina, 5-metilo-citosina, timina y uracilo, junto con su oligomerización y las propiedades de reconocimiento de ácidos nucleicos han sido descritos (Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630). Los BNA y la preparación de los mismos también se describen en los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226.

[0109] Los análogos de metilenoxi (4'-CH_2-O-2') BNA y 2'-tio-BNA, también han sido preparados (Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222). También se ha descrito la preparación de análogos de nucleósidos bloqueados que comprenden dúplex de oligodesoxirribonucleótidos como sustratos para polimerasas de ácido nucleico (Wengel et al., WO 99/14226). Además, la síntesis de 2'-amino-BNA, un novedoso análogo de oligonucleótido de alta afinidad restringido por la conformación se ha descrito en la técnica (Singh y col., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039). Además, se han preparado 2'-amino- y 2'-metilamino-BNA y se ha informado previamente sobre la estabilidad térmica de sus dúplex con hebras complementarias de ARN y ADN.

[0110] En ciertas realizaciones, se describen nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula VI:



VI

en donde:

Bx es un resto de base heterocíclico;

T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte; cada q_i, q_j, q_k y q_l es, independientemente, H, halógeno, C_1-C_{12} alquilo, C_1-C_{12} alquilo sustituido, C_2-C_{12} alquenilo, C_2-C_{12} alquenilo sustituido, C_2-C_{12} alquinilo, C_2-C_{12} alquinilo sustituido, C_1-C_{12} alcoxilo, C_1-C_{12} alcoxilo sustituido, 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 son = $C(q_g)(q_h)$, en donde q_g y q_h son cada uno, independientemente, H, halógeno, C_1-C_{12} alquilo o C_1-C_{12} alquilo sustituido.

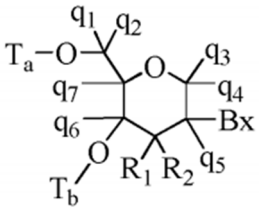
[0111] Se ha descrito un nucleósido carbocíclico bicíclico que tiene un puente 4'-$(CH_2)_3$-2' y el puente análogo alquenílico 4'-CH=CH-CH_2-2' (Freier et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25 (22), 4429-4443 y Albaek et al., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740). También se ha descrito la síntesis y preparación de nucleósidos bicíclicos carbocíclicos junto con su oligomerización y estudios bioquímicos (Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129 (26), 8362-8379).

[0112] Como se usa en el presente documento, "nucleósido bicíclico 4'-2'" o "nucleósido bicíclico 4' a 2'" se refiere a un nucleósido bicíclico que comprende un anillo de furanosa que comprende un puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de furanosa conecta el 2' átomo de carbono y el átomo de carbono 4' del anillo de azúcar.

[0113] Como se usa en este documento, "nucleósidos monocíclicos" se refieren a nucleósidos que comprenden restos de azúcar modificados que no son restos de azúcares bicíclicos. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar, o análogo de resto de azúcar, de un nucleósido puede modificarse o sustituirse en cualquier posición.

[0114] Como se usa en el presente documento, "azúcar 2'-modificado" significa un azúcar de furanosilo modificado en la posición 2'. En ciertas realizaciones, tales modificaciones incluyen sustituyentes seleccionados entre: un haluro, que incluye, pero no se limita a, alcoxi sustituido y no sustituido, tioalquilo sustituido y no sustituido, aminoalquilo sustituido y no sustituido, alquilo sustituido y no sustituido, alilo sustituido y no sustituido, alquinilo sustituido y no sustituido. En ciertas realizaciones, las modificaciones 2' se seleccionan de sustituyentes que incluyen, pero no se limitan a: $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nF$, $O(CH_2)_nONH_2$, $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$ y $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros grupos sustituyentes 2' también pueden seleccionarse a partir de: C_1-C_{12} alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquinilo, alcarilo, aralquilo, o-alcarilo o o-aralquilo, SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, F, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un compuesto antisentido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. En ciertas realizaciones, los nucleósidos modificados comprenden una cadena lateral 2'-MOE (Baker et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000). Dicha sustitución de 2'-MOE se ha descrito que tiene una afinidad de unión mejorada en comparación con nucleósidos no modificados y con otros nucleósidos modificados, tales como 2'-*O*-metilo, *O*-propilo y *O*-aminopropilo. También se ha demostrado que los oligonucleótidos que tienen el sustituyente 2'-MOE son inhibidores antisentido de la expresión génica con características prometedoras para uso *in vivo* (Martin, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann et al., Chimia, 1996, 50, 168-176; Altmann y col., Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637; y Altmann y col., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926).

[0115] Como se usa en este documento, un "nucleósido de tetrahidropirano modificado" o "nucleósido THP modificado" significa un nucleósido que tiene un "azúcar" de tetrahidropiran de seis miembros sustituido por el residuo pentofuranosilo en nucleósidos normales (un sustituto de azúcar). Los nucleósidos de THP modificados incluyen, entre otros, lo que se conoce en la técnica como ácido nucleico de hexitol (HNA), ácido nucleico de anitol (ANA), ácido nucleico de manitol (MNA) (véase Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841-854), fluoro HNA (F-HNA) o aquellos compuestos que tienen la Fórmula VII:



VII

en donde independientemente para cada uno de dichos al menos un análogo de nucleósido tetrahidropirano de Fórmula VII:

Bx es un resto de base heterocíclico;
T_a y T_b son cada uno, independientemente, un grupo de enlace internucleosídico que une el análogo de nucleósido de tetrahidropirano al compuesto antisentido o uno de T_a y T_b es un grupo de enlace internucleósido que une el análogo de nucleósido de tetrahidropirano al compuesto antisentido y el otro de T_aç y T_b es H, un grupo protector de hidroxilo, un ligado grupo conjugado o un 5' o grupo 3'-terminal; q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6 y q_7 son cada uno independientemente, H, C_1-C_6 alquilo, alquilo C_1-C_6 alquilo sustituido, C_2-C_6 alquenilo, C_2-C_6 alquenilo sustituido, C_2-C_6 alquinilo o C_2-C_6 alquinilo sustituido; y cada uno de R^1 y R^2 se selecciona de hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alcoxi sustituido o no sustituido, NJ_1J_2, SJi, N_3, O-C(=X)J_1, O-C(=X) NJ_1J_2, $NJ_3C(=X)$ NJ_1J_2 y CN, en donde X es O, $SoNJ_1$ y cada J_1, J_2 y J_3 es, independientemente, H o alquilo C_1-C_6.

[0116] En ciertas realizaciones, se describen los nucleósidos THP modificados de Fórmula VII en donde q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6 y q_7 son cada uno H. En ciertas realizaciones, al menos uno de q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6 yq $_7$ es distinto de H. En ciertas realizaciones, al menos uno de q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6 y q_7 es metilo. En ciertas realizaciones, los nucleósidos de THP de la Fórmula VII se dan a conocer en donde uno de R^1 y R^2 es fluoro. En ciertas realizaciones, R^1 es fluoro y R^2 es H; R^1 es metoxi y R^2 es H, y R^1 es metoxietoxi y R^2 es H.

[0117] Como se usa en este documento, "modificado en 2'" o "2'-sustituido" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende sustituyente en la posición 2' que no sea H u OH. Los nucleósidos modificados en 2' incluyen, pero no se limitan a, nucleósidos bicíclicos en los que el puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de azúcar conecta el carbono 2' y otro carbono del anillo de azúcar; y nucleósidos con sustituyentes 2 que no forman puentes, tales como alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-C_1-C_{10} alquilo, -OCF_3, O-$(CH_2)_2$-O-CH_3, 2'-O$(CH_2)_2SCH_3$, O-$(CH_2)_2$ -O-N$(R_m)(R_n)$ u O-CH_2-C(=O)-N$(R_m)(R_n)$, donde cada R_m y R_n es, independientemente, H o C_1-C_{10} alquilo sustituido o no sustituido. Los nucleósidos modificados en 2' pueden comprender además otras modificaciones, por ejemplo en otras posiciones del azúcar y/o en la nucleobase.

[0118] Como se usa en este documento, "2 '-F" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo fluoro en la posición 2'.

[0119] Como se usa en este documento, "2'-OMe" o "2'-OCH_3 " o "2'-O-metilo" cada refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo -OCH_3 en la posición 2' del anillo de azúcar.

[0120] Como se usa en el presente documento, "MOE" o "2'-MOE" o "2'-$OCH_2CH_2OCH_3$ " o "2'-O-metoxietilo" se refieren cada uno a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo -$OCH_2CH_2OCH_3$ en la posición 2' del anillo de azúcar.

[0121] Como se usa en el presente documento, "oligonucleótido" se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, se modifica uno o más de la pluralidad de nucleósidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido comprende uno o más ribonucleósidos (ARN) y/o desoxirribonucleósidos (ADN).

[0122] Muchos otros sistemas de anillos sustitutos de azúcar biciclo y triciclo también son conocidos en la técnica que pueden usarse para ósidos para su incorporación en compuestos antisentido (ver, p. ej., artículo de revisión: Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841-854). Dichos sistemas de anillo pueden sufrir varias sustituciones adicionales para mejorar la actividad.

[0123] Los métodos para la preparación de azúcares modificados son bien conocidos por los expertos en la materia.

[0124] En los nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados, los restos de nucleobase (naturales, modificados o una combinación de los mismos) se mantienen para la hibridación con un objetivo de ácido nucleico apropiado.

[0125] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido comprenden uno o más nucleósidos que tienen restos de azúcar modificados. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar modificado es 2'-MOE. En ciertas realizaciones, los nucleósidos modificados con 2'-MOE están dispuestos en un motivo gapmer. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar modificado es un nucleósido bicíclico que tiene un grupo puente (4'-CH(CH_3)-O-2'). En ciertas realizaciones, los nucleósidos modificados (4'-CH(CH_3)-O-2') están dispuestos a lo largo de las alas de un motivo gapmer.

Nucleobases modificadas

[0126] Las modificaciones o sustituciones de nucleobase (o base) son estructuralmente distinguibles, pero funcionalmente intercambiables con nucleobases no modificadas de origen natural o sintético. Tanto las nucleobases naturales como las modificadas son capaces de participar en enlaces de hidrógeno. Dichas modificaciones de nucleobase pueden impartir estabilidad de nucleasa, afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a compuestos antisentido. Las nucleobases modificadas incluyen nucleobases sintéticas y naturales tales como, p. ej., 5-metilcitosina (5-me-C). Ciertas sustituciones de nucleobase, incluidas las sustituciones de 5-metilcitosina, son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de un compuesto antisentido por un ácido nucleico diana. Por ejemplo, se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2°C (Sanghvi, YS, Crooke, ST y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278).

[0127] Nucleobases adicionales no modificadas incluyen 5-hidroximetilo citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinilo (-C≡C-CH_3) uracilo y citosina y otros derivados alquinilo de bases pirimidínicas, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos 5-sustituidos y citosinas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

[0128] Restos de bases heterocíclicos también pueden incluir aquellos en los que la base de purina o pirimidina se reemplaza con otros heterociclos, por ejemplo 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Las nucleobases que son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos antisentido incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, que incluyen 2 aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina.

[0129] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico TMPRSS6 comprenden una o más nucleobases modificadas. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido ensanchados dirigidos a un ácido nucleico TMPRSS6 que comprenden una o más nucleobases modificadas. En ciertas realizaciones, la nucleobase modificada es 5-metilcitosina. En ciertas realizaciones, cada citosina es una 5-metilcitosina.

Composiciones y métodos para formular composiciones farmacéuticas

[0130] Los oligonucleótidos antisentido pueden mezclarse con una sustancia activa o inerte farmacéuticamente aceptable para la preparación de composiciones o formulaciones farmacéuticas. Las composiciones y los métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas dependen de una serie de criterios, que incluyen, entre otros, la vía de administración, el alcance de la enfermedad o la dosis a administrar.

[0131] El compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico TMPRSS6 se puede utilizar en composiciones farmacéuticas combinando el compuesto antisentido con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye solución salina tamponada con fosfato (PBS). PBS es un diluyente adecuado para su uso en composiciones que se administrarán por vía parenteral. Por consiguiente, en una realización, se emplea en los métodos descritos en el presente documento una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico TMPRSS6 y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, el diluyente farmacéuticamente aceptable es PBS. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido.

[0132] Las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos antisentido abarcan cualquier sal, éster o sal farmacéuticamente aceptable de dichos ésteres, o cualquier otro oligonucleótido que, tras la administración a un animal, incluido un humano, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el producto biológicamente activo. metabolito o residuo del mismo. Por consiguiente, p. ej., la divulgación también se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de compuestos antisentido, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales de sodio y potasio.

[0133] Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la presente memoria pueden prepararse por métodos bien conocidos en la técnica. Para una revisión de las sales farmacéuticamente aceptables, ver Stahl y Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use (Wiley-VCH, Weinheim,

Alemania, 2002). Las sales de sodio de los oligonucleótidos antisentido son útiles y están bien aceptadas para la administración terapéutica en humanos. Por consiguiente, en una realización, los compuestos descritos en el presente documento están en forma de una sal de sodio.

[0134] Un profármaco puede incluir la incorporación de nucleósidos adicionales en uno o ambos extremos de un compuesto antisentido que se escinden por nucleasas endógenas dentro del cuerpo, para formar el compuesto antisentido activo.

Dosificación

[0135] En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran de acuerdo con un régimen de dosificación (p. ej., dosis, frecuencia de dosis y duración) en donde el régimen de dosificación se puede seleccionar para lograr un efecto deseado. El efecto deseado puede ser, p. ej., la reducción de TMPRSS6 o la prevención, reducción, mejora o disminución de la progresión de una enfermedad, trastorno o afección asociada con TMPRSS6.

[0136] En ciertas realizaciones, las variables del régimen de dosificación se ajustan para dar como resultado una concentración deseada de composición farmacéutica en un sujeto. La "concentración de composición farmacéutica" tal como se usa con respecto al régimen de dosis puede referirse al compuesto, oligonucleótido o ingrediente activo de la composición farmacéutica. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la dosis y la frecuencia de dosis se ajustan para proporcionar una concentración de tejido o concentración de plasma de una composición farmacéutica en una cantidad suficiente para lograr un efecto deseado.

[0137] La dosificación depende de la gravedad y la capacidad de respuesta del estado de la enfermedad a tratar, con una duración del tratamiento de varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución del estado de la enfermedad. La dosificación también depende de la potencia del fármaco y el metabolismo. En ciertas realizaciones, la dosis es de 0,01 µg a 100 mg por kg de peso corporal, o dentro de un rango de dosificación de 0,001 mg a 1000 mg, y se puede administrar una o más veces al día, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Después de un tratamiento exitoso, puede ser deseable que el paciente se someta a una terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado de la enfermedad, en donde el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que van desde 0,01 µg hasta 100 mg por kg de peso corporal, una vez o más al día, a una vez cada 20 años o con una dosis de 0,001mg a 1000mg.

Administración

[0138] Los compuestos o composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse de varias maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área a tratar. La administración puede ser oral, inhalada o parenteral.

[0139] En ciertas realizaciones, los compuestos y composiciones como se describen en el presente documento se administran parenteralmente. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, p. ej., intratecal o intraventricular.

[0140] En ciertas realizaciones, la administración parenteral es por infusión. La infusión puede ser crónica o continua o corta o intermitente. En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos infundidos se entregan con una bomba.

[0141] En ciertas realizaciones, la administración parenteral es por inyección. La inyección puede administrarse con una jeringa o una bomba. En ciertas realizaciones, la inyección es una inyección en bolo. En ciertas realizaciones, la inyección se administra directamente a un tejido u órgano.

[0142] En ciertas realizaciones, las formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, entre otros, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

[0143] En ciertas realizaciones, las formulaciones para administración oral de los compuestos o composiciones pueden incluir, pero no se limitan a, vehículos farmacéuticos, excipientes, polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, bolsitas, tabletas o minitabletas. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, dispersantes o aglutinantes. En ciertas realizaciones, las formulaciones orales son aquellas en las que los compuestos descritos en el presente documento se administran junto con uno o más potenciadores de la penetración, tensioactivos y quelantes.

[0144] En ciertas realizaciones, la administración incluye la administración pulmonar. En ciertas realizaciones, la administración pulmonar comprende la administración de oligonucleótidos en aerosol al pulmón de un sujeto por inhalación. Después de la inhalación por un sujeto de oligonucleótido en aerosol, el oligonucleótido se distribuye a las células del tejido pulmonar normal e inflamado, incluidos los macrófagos alveolares, los eosinófilos, el epitelio, el endotelio de los vasos sanguíneos y el epitelio bronquiolar. Un dispositivo adecuado para el suministro de una

composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido modificado incluye, pero no se limita a, un dispositivo nebulizador estándar. Los dispositivos adecuados adicionales incluyen inhaladores de polvo seco o inhaladores de dosis medida.

[0145] En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran para lograr exposiciones locales en lugar de sistémicas. Por ejemplo, la administración pulmonar administra una composición farmacéutica al pulmón, con una exposición sistémica mínima.

[0146] Las rutas de administración adecuadas adicionales incluyen, pero no se limitan a, rectal, transmucosal, intestinal, enteral, tópica, supositorio, intratecal, intraventricular, intraperitoneal, intranasal, intraocular, intramuscular, intramedular e intratumoral.

Compuestos antisentido conjugados

[0147] En ciertas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento pueden unirse covalentemente a uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular de los oligonucleótidos antisentido resultantes. Los grupos conjugados típicos incluyen restos de colesterol y restos de lípidos. Grupos conjugados adicionales incluyen carbohidratos, fosfolípidos, biotina, fenazina, ácido fólico, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes.

[0148] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido también pueden modificarse para tener uno o más grupos estabilizadores que generalmente están unidos a uno o ambos extremos de compuestos antisentido para mejorar propiedades tales como, p. ej., la estabilidad de la nucleasa. Se incluyen en los grupos estabilizadores las estructuras de tapa. Estas modificaciones terminales protegen el compuesto antisentido que tiene ácido nucleico terminal de la degradación de exonucleasa, y pueden ayudar en el suministro y/o localización dentro de una célula. La tapa puede estar presente en el terminal 5’ (5' tapa), o en el terminal 3’ (3' tapa), o puede estar presente en ambas terminales. Las estructuras de tapa son bien conocidas en la técnica e incluyen, p. ej., tapas invertidas de desoxi abásicas. Otros grupos estabilizadores 3’ y 5' que pueden usarse para tapar uno o ambos extremos de un compuesto antisentido para impartir estabilidad nucleasa incluyen los descritos en el documento WO 03/004602 publicado el 16 de enero de 2003.

Cultivo celular y tratamiento de compuestos antisentido

[0149] Los efectos de los compuestos antisentido sobre el nivel, la actividad o la expresión de los ácidos nucleicos TMPRSS6 se pueden probar in vitro en una variedad de tipos de células. Los tipos de células utilizados para tales análisis están disponibles en proveedores comerciales (p. ej., American Type Culture Collection, Manassas, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walkersville, MD) y las células se cultivan de acuerdo con las instrucciones del proveedor utilizando reactivos disponibles en el mercado (p. ej., Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Los tipos de células ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, células HepG2, células Hep3B, células Huh7 (carcinoma hepatocelular), hepatocitos primarios, células A549, fibroblastos GM04281 y células LLCMK2.

Pruebas in vitro de oligonucleótidos antisentido

[0150] Aquí se describen métodos para el tratamiento de células con oligonucleótidos antisentido, que pueden modificarse apropiadamente para el tratamiento con otros compuestos antisentido.

[0151] En general, las células se tratan con oligonucleótidos antisentido cuando las células alcanzan aproximadamente 60-80% confluencia en el cultivo.

[0152] Un reactivo comúnmente usado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye el reactivo de transfección de lípidos catiónicos LIPOFECTIN® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los oligonucleótidos antisentido se mezclan con LIPOFECTIN® en OPTI-MEM® 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para lograr la concentración final deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración de LIPOFECTIN® que típicamente varía de 2 a 12 ug/mL por oligonucleótido antisentido 100 nM.

[0153] Otro reactivo utilizado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye LIPOFECTAMINE 2000® (Invitrogen, Carlsbad, CA). El oligonucleótido antisentido se mezcla con LIPOFECTAMINE 2000® en medio sérico reducido OPTI-MEM® 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para lograr la concentración deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración de LIPOFECTAMINE® que generalmente varía de 2 a 12 ug/mL por 100 nM antisentido oligonucleótido

[0154] Otro reactivo usado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye Cytofectin® (Invitrogen, Carlsbad, CA). El oligonucleótido antisentido se mezcla con Cytofectin® en medio sérico reducido OPTI-MEM® 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para lograr la concentración deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración de Cytofectin® que generalmente varía de 2 a 12 ug/ml por oligonucleótido antisentido 100 nM.

[0155] Otro reactivo usado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye Oligofectamine™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). El oligonucleótido antisentido se mezcla con Oligofectamine™ en Opti-MEM™ -1 medio sérico reducido (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) para lograr la concentración deseada de oligonucleótido con una relación Oligofectamine™ a oligonucleótido de aproximadamente 0,2 a 0,8 µL por 100 nM.

[0156] Otro reactivo utilizado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye FuGENE 6 (Roche Diagnostics Corp., Indianápolis, IN). El compuesto oligomérico antisentido se mezcló con FuGENE 6 en 1 ml de RPMI sin suero para lograr la concentración deseada de oligonucleótido con una relación de FuGENE 6 a compuesto oligomérico de 1 a 4 µL de FuGENE 6 por 100 nM.

[0157] Otra técnica utilizada para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye electroporación (Sambrook y Russell en Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Tercera Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. 2001).

[0158] Las células se tratan con oligonucleótidos antisentido por métodos de rutina. Las células se cosechan típicamente 16-24 horas después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido, momento en el cual los niveles de ARN o proteína de los ácidos nucleicos diana se miden por métodos conocidos en la técnica y descritos en este documento (Sambrook y Russell en Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Tercera Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001). En general, cuando los tratamientos se realizan en múltiples repeticiones, los datos se presentan como el promedio de los tratamientos replicados.

[0159] La concentración de oligonucleótido antisentido utilizada varía de una línea celular a otra. Los métodos para determinar la concentración óptima de oligonucleótidos antisentido para una línea celular particular son bien conocidos en la técnica (Sambrook y Russell en Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Tercera Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. 2001). Los oligonucleótidos antisentido se usan típicamente en concentraciones que varían de 1 nM a 300 nM cuando se transfectan con LIPOFECTAMINE 2000®, Lipofectina o Citofectina. Los oligonucleótidos antisentido se usan en concentraciones más altas que varían de 625 a 20.000 nM cuando se transfectan mediante electroporación.

Aislamiento de ARN

[0160] El análisis de ARN se puede realizar sobre el ARN celular total o poli(A) + ARNm. Los métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica (Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., 2001). El ARN se prepara utilizando métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., utilizando el reactivo TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con los protocolos recomendados por el fabricante.

Análisis de inhibición de niveles diana o expresión

[0161] La inhibición de niveles o expresión de un ácido nucleico TMPRSS6 se puede analizar de diversas maneras conocidas en la técnica (Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., 2001).) P. ej., los niveles de ácido nucleico diana pueden cuantificarse mediante, p. ej., análisis de transferencia Northern, reacción en cadena de polimerasa competitiva (PCR) o PCR cuantitativa en tiempo real. El análisis de ARN se puede realizar en ARN celular total o poli (A) + ARNm. Los métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. El análisis de transferencia Northern también es una rutina en la técnica. La PCR cuantitativa en tiempo real puede realizarse convenientemente utilizando el sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7600, 7700 o 7900 disponible en el mercado, disponible en PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y utilizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis cuantitativo de PCR en tiempo real de los niveles de ARN diana

[0162] La cuantificación de los niveles de ARN diana se puede lograr mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando el sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7600, 7700 o 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante. Los métodos de PCR cuantitativa en tiempo real son bien conocidos en la técnica.

[0163] Antes de la PCR en tiempo real, el ARN aislado se somete a una reacción de transcriptasa inversa (RT), que produce ADN complementario (ADNc) que es luego se usa como sustrato para la amplificación por PCR en tiempo real. Las reacciones de RT y PCR en tiempo real se realizan secuencialmente en la misma muestra. Los reactivos de RT y PCR en tiempo real se obtienen de Invitrogen (Carlsbad, CA). RT, las reacciones de PCR en tiempo real se llevan a cabo mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

[0164] Las cantidades objetivo de genes (o ARN) obtenidas por PCR en tiempo real se normalizan usando el nivel de expresión de un gen cuya expresión es constante, tal como ciclofilina A, o cuantificando ARN total usando RIBOGREEN® (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CALIFORNIA). La expresión de ciclofilina A se cuantifica por PCR en tiempo real, ejecutándose simultáneamente con el objetivo, multiplexando o por separado. El ARN total se cuantifica usando el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Invitrogen, Inc. Eugene, OR). Los métodos de cuantificación de

ARN por RIBOGREEN® se enseñan en Jones, LJ y col., (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374). Se utiliza un instrumento CYTOFLUOR® 4000 (PE Applied Biosystems) para medir la fluorescencia RIBOGREEN®.

[0165] Las sondas y los cebadores están diseñados para hibridarse a un ácido nucleico TMPRSS6. Los métodos para diseñar sondas y cebadores de PCR en tiempo real son bien conocidos en la técnica y pueden incluir el uso de software como PRIMER EXPRESS® (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Análisis de los niveles de proteína

[0166] La inhibición antisentido de los ácidos nucleicos TMPRSS6 se puede evaluar midiendo los niveles de proteína TMPRSS6. Los niveles de proteína de TMPRSS6 se pueden evaluar o cuantificar de varias maneras bien conocidas en la técnica, como inmunoprecipitación, análisis de transferencia Western (inmunotransferencia), ensayo de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA), ensayos cuantitativos de proteínas, ensayos de actividad proteica (por ejemplo, ensayos de actividad de caspasa), inmunohistoquímica, inmunocitoquímica o clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) (Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., 2001). Los anticuerpos dirigidos a un objetivo pueden identificarse y obtenerse de una variedad de fuentes, como el catálogo de anticuerpos MSRS (Aerie Corporation, Birmingham, MI), o pueden prepararse mediante métodos convencionales de generación de anticuerpos monoclonales o policlonales bien conocidos en la técnica.

Prueba in vivo de compuestos antisentido

[0167] Los compuestos antisentido, p. ej., oligonucleótidos antisentido, se prueban en animales para evaluar su capacidad de inhibir la expresión de TMPRSS6 y producir cambios fenotípicos, tales como la reducción de la acumulación de hierro en el cuerpo. Las pruebas se pueden realizar en animales normales o en modelos experimentales de enfermedades. Las pruebas se pueden realizar en animales normales o en modelos experimentales de enfermedades. Para la administración a animales, los oligonucleótidos antisentido se formulan en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato. La administración incluye vías de administración parenteral, como intraperitoneal, intravenosa y subcutánea. El cálculo de la dosificación de oligonucleótidos antisentido y la frecuencia de dosificación dependen de factores tales como la vía de administración y el peso corporal del animal. En una realización, después de un período de tratamiento con oligonucleótidos antisentido, se aísla el ARN del tejido hepático y se miden los cambios en la expresión del ácido nucleico TMPRSS6. Los cambios en los niveles de proteína TMPRSS6 también se pueden medir. Los cambios en la expresión de TMPRSS6 se pueden medir determinando el nivel de expresión de hepcidina, los niveles plasmáticos de hierro y el porcentaje de saturación de transferrina presente en el animal.

Ciertas indicaciones

[0168] En ciertas realizaciones, se describen en el presente documento métodos para tratar a un individuo que comprende administrar una o más composiciones farmacéuticas como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el individuo tiene o está en riesgo de una enfermedad, trastorno o afección por acumulación de hierro. En ciertas realizaciones, el individuo está en riesgo de una enfermedad, trastorno o afección por acumulación de hierro como se describe, anteriormente. En ciertas realizaciones, se describen en el presente documento métodos para reducir profilácticamente la expresión de TMPRSS6 en un individuo. Ciertas realizaciones incluyen tratar a un individuo que lo necesita administrando a un individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico TMPRSS6.

[0169] En ciertas realizaciones, la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico TMPRSS6 se acompaña de la monitorización de los niveles de TMPRSS6 en un individuo, para determinar la respuesta de un individuo a la administración del compuesto antisentido. En ciertas realizaciones, la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico TMPRSS6 se acompaña de la monitorización de los niveles de hepcidina en un individuo. En ciertas realizaciones, la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico TMPRSS6 se acompaña de la monitorización de los niveles de hierro en un individuo. En ciertas realizaciones, la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico TMPRSS6 se acompaña de la evaluación del porcentaje de saturación de transferrina en un individuo. Un médico utiliza una respuesta individual a la administración del compuesto antisentido para determinar la cantidad y la duración de la intervención terapéutica.

[0170] En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto antisentido dirigido a TMPRSS6 se usan para la preparación de un medicamento para tratar a un paciente que padece o es susceptible a una enfermedad, trastorno o afección por acumulación de hierro.

[0171] En ciertas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento incluyen administrar un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que tiene una porción de nucleobase contigua 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 complementarias a un ácido nucleico TMPRSS6.

Ciertas terapias de combinación

[0172] En ciertas realizaciones, un primer agente que comprende un oligonucleótido modificado descrito en el presente documento se administra conjuntamente con uno o más agentes secundarios. En ciertas realizaciones, dichos segundos agentes están diseñados para tratar la misma enfermedad, trastorno o afección por acumulación de hierro que el primer agente descrito aquí. En ciertas realizaciones, dichos segundos agentes están diseñados para tratar una enfermedad, trastorno o afección diferente como el primer agente descrito en este documento. En ciertas realizaciones, dichos segundos agentes están diseñados para tratar un efecto secundario no deseado de una o más composiciones farmacéuticas como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, dichos primeros agentes están diseñados para tratar un efecto secundario no deseado de un segundo agente. En ciertas realizaciones, los segundos agentes se administran conjuntamente con el primer agente para tratar un efecto no deseado del primer agente. En ciertas realizaciones, los segundos agentes se administran conjuntamente con el primer agente para producir un efecto combinacional. En ciertas realizaciones, los segundos agentes se administran conjuntamente con el primer agente para producir un efecto sinérgico. En ciertas realizaciones, la administración conjunta del primer y segundo agente permite el uso de dosis más bajas de las que se requerirían para lograr un efecto terapéutico o profiláctico si los agentes se administraran como terapia independiente.

[0173] En ciertas realizaciones, un primer agente y uno o más segundos agentes se administran al mismo tiempo. En ciertas realizaciones, el primer agente y uno o más segundos agentes se administran en diferentes momentos. En ciertas realizaciones, el primer agente y uno o más segundos agentes se preparan juntos en una sola formulación farmacéutica. En ciertas realizaciones, el primer agente y uno o más segundos agentes se preparan por separado.

[0174] En ciertas realizaciones, los segundos agentes incluyen, pero no se limitan a, compuestos de ácido nucleico. Dichos compuestos de ácido nucleico pueden incluir un ARNip, una ribozima o un compuesto antisentido dirigido a TMPRSS6 u otra diana.

[0175] En ciertas realizaciones, los segundos agentes incluyen, pero no se limitan a, compuestos no antisentido tales como quelantes de hierro, transferrina, proteínas morfogenéticas óseas 6 (BMP6), agonistas de hepcidina, células madre o agentes que generan hemoglobina fetal (HbF). En realizaciones adicionales, los quelantes de hierro se seleccionan de, pero no se limitan a, FBS0701 (FerroKin), Exjade, Desferal y Deferiprone. En ciertas realizaciones, los agentes que aumentan el HBF incluyen 5-hidroxilurea, derivados de ácido graso de cadena corta (SCFA) (p. ej., HQK1001), inhibidores de ADN metiltransferasa (p. ej., decitabina) o inhibidores de histona desacetilasa (HDAC) (p. ej., Zolina, Panobinostat). En ciertas realizaciones, el segundo agente se administra antes de la administración del primer agente. En ciertas realizaciones, el segundo agente se administra después de la administración del primer agente. En ciertas realizaciones, el segundo agente se administra al mismo tiempo que el primer agente. En ciertas realizaciones, la dosis de un segundo agente coadministrado es la misma que la dosis que se administraría si el segundo agente se administrara solo. En ciertas realizaciones, la dosis de un segundo agente coadministrado es menor que la dosis que se administraría si el segundo agente se administrara solo. En ciertas realizaciones, la dosis de un segundo agente coadministrado es mayor que la dosis que se administraría si el segundo agente se administrara solo. En ciertas realizaciones, el primer agente se administra al mismo tiempo que la terapia de flebotomía. En ciertas realizaciones, el primer agente se administra antes de la terapia de flebotomía. En ciertas realizaciones, el primer agente se administra después de la terapia de flebotomía. En ciertas realizaciones, la frecuencia de flebotomía disminuye. En ciertas realizaciones, se reduce el tiempo requerido para la flebotomía.

VENTAJAS DE LA INVENCIÓN

[0176] Aquí se describen, por primera vez, métodos y composiciones para la modulación de TMPRSS6 que pueden tratar, prevenir y/o mejorar una enfermedad de acumulación de hierro. En una realización particular, se describen inhibidores de TMPRSS6 tales como oligonucleótidos antisentido (oligonucleótidos dirigidos a un ácido nucleico que codifica la proteína TMPRSS6) para mejorar un trastorno de acumulación de hierro como hemocromatosis, policitemia o talasemia. La orientación de TMPRSS6 con inhibidores específicos de TMPRSS6 como se describe en el presente documento tiene varios efectos positivos que incluyen, pero no se limitan a: (a) aumentar los niveles de hepcidina, (b) prevenir la absorción excesiva de hierro y la sobrecarga de hierro, (c) aumentar las concentraciones de transferrina en suero, que disminuirá aún más la saturación de transferrina y la formación de hemicromos, (d) almacenará de forma segura el exceso de hierro en los macrófagos y (e) disminuirá la saturación de transferrina, lo que conducirá a una disminución del suministro de hierro para la eritropoyesis.

EJEMPLOS

Descripción no limitante

[0178] Si bien ciertos compuestos, composiciones y métodos descritos en el presente documento se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los siguientes ejemplos solo sirven para ilustrar los compuestos descritos aquí y no están destinados a limitar los mismos.

Ejemplo 1: Inhibición antisentido *in vivo* de la serina proteasa transmembrana murina tipo II (TMPRSS6)

[0179] Se diseñaron varios oligonucleótidos antisentido dirigidos al ARNm TMPRSS6 murino (Nº de acceso GENBANK NM_027902,2, incorporado aquí como SEQ ID NO: 1). Los sitios de inicio objetivo y las secuencias de cada oligonucleótido se presentan en la Tabla 1. Los oligonucleótidos antisentido quiméricos en la Tabla 1 se diseñaron como separadores de MOE 5-10-5. Los separadores tienen una longitud de 20 nucleósidos, en donde el segmento de separación central está compuesto por diez 2'-desoxinucleósidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden cinco nucleósidos cada una. Cada nucleósido en el segmento del ala 5' y cada nucleósido en el segmento del ala 3' tiene una modificación 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos en cada gapmer son enlaces de fosforotioato (P = S). Todos los residuos de citosina en cada separador son 5- metilcitosinas.

Tabla 1

Gapmers dirigidos a TMPRSS6 murino			
ISIS Nº	Secuencia	Sitio de inicio de destino	SEQ ID NO
537402	AGGCCTTCCGGGTCCACCTC	795	8
537450	TTTCTTTCCTACAGAGACCC	2933	9
537451	AGCCTTGATAGAGGCACCTT	3001	10
537452	GCTTAGAGTACAGCCCACTT	3044	11
537480	TCACCAGGCCTTCCGGGTCC	800	12
537524	AGGCATCCTAACCACCAGCT	2789	13

Tratamiento

[0180] Se inyectaron grupos de cuatro ratones C57BL/6 cada uno con 25 mg/kg de ISIS 537402, ISIS 537450, ISIS 537451, ISIS 537452, ISIS 537480 o ISIS 537524 dos veces por semana durante 4 semanas. A un grupo de cuatro ratones se les inyectó 25 mg/kg de oligonucleótido de control, ISIS 141923 (CCTTCCCTGAAGGTTCCTCC, designado aquí como SEQ ID NO: 14; un separador de MOE 5-10-5 sin diana murina conocida), dos veces por semana durante 4 semanas. Se inyectó un grupo control de ratones con solución salina tamponada con fosfato (PBS) dos veces por semana durante 4 semanas. Los ratones fueron sacrificados dos días después de la dosis final.

Análisis de ARN

[0181] Se extrajo ARN de tejido de hígado para análisis en tiempo real PCR de TMPRSS6, utilizando conjunto de sonda de cebador RTS3481 (ATTCCACGCTGGGCTGTTAT secuencia directa, designada aquí como SEQ ID NO: 15; CTGGTCAGGCCCCTTCAA secuencia inversa, designada aquí como SEQ ID NO: 16; secuencia de sonda TGAACCCAGGCCAGGTCCTCCC, designada aquí como SEQ ID NO: 17). El análisis RT-PCR de hepcidina también se realizó, usando el conjunto de sonda de cebador RTS1777 (secuencia directa TGCAGAAGAGAAGGAAGAGAGACA, designada aquí como SEQ ID NO: 18; secuencia inversa CACACTGGGAATTGTTACAGCATT, designada aquí como SEQ ID NO: 19; secuencia de sonda CAACTTCCCCATCTGCATCTTCTGCTQT, designada aquí ID NO: 20). Los niveles de ARNm se normalizaron usando RIBOGREEN®. Como se muestra en la Tabla 2, la mayoría de los oligonucleótidos antisentido lograron la reducción de TMPRSS6 murino sobre el control de PBS. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de TMPRSS6, en relación con el control. Como se muestra en la Tabla 3, la mayoría de los oligonucleótidos antisentido lograron un aumento en los niveles de hepcidina murina en comparación con el control de PBS. Los resultados se presentan como un cambio porcentual de los niveles de hepcidina, en relación con el control.

Tabla 2

Porcentaje de inhibición de los niveles de ARNm TMPRSS6 murino en ratones C57BL/6	
ISIS NO	% de inhibición de TMPRSS6
537402	65
537450	80
537451	39
537452	86
537480	60
537524	90
141923	0

Tabla 3

Aumento porcentual en los niveles de ARNm de hepcidina murina en ratones C57BL/6	
ISIS NO	% de hepcidina
537402	+28
537450	+113
537451	-7
537452	+201
537480	+13
537524	+181
141923	-38

Efecto sobre los niveles de hierro

[0182] Los niveles de hierro en suero se midieron usando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) (Siek, G. et al., Clin. Chem. 48: 161-166, 2002). Los resultados se presentan en la Tabla 4, expresados como µg/dL. Los resultados indican que varios de los oligonucleótidos ISIS redujeron los niveles de hierro.

Tabla 4

Niveles de hierro (µg/dL) en ratones C57BL/6	
	Hierro (µg/dL)
PBS	161
ISIS 537402	148
ISIS 537450	94
ISIS 537451	161
ISIS 537452	82
ISIS 537480	135
ISIS 537524	104
ISIS 141923	144

Pesos corporales y de órganos

[0183] El efecto de la inhibición antisentido de TMPRSS6 sobre la salud general de los animales, como lo demuestran los cambios en pesos corporales y de órganos, se evaluó. Como se muestra en la Tabla 5, no hubo cambios significativos en los pesos corporales de los ratones tratados con oligonucleótidos antisentido, en comparación con el control de PBS. De manera similar, como se muestra en la Tabla 6, hubo un cambio insignificante en los pesos de los órganos de los ratones tratados con oligonucleótido antisentido, en comparación con el control de PBS.

Tabla 5

Pesos corporales (g) de ratones C57BL/6	
	Peso corporal (g)
PBS	24,6
ISIS 537402	26,1
ISIS 537450	22,7
ISIS 537451	26,0
ISIS 537452	25,2
ISIS 537480	26,4
ISIS 537524	27,2
ISIS 141923	26,8

Tabla 6

Pesos de órganos (g) de ratones C57BL/6			
	Hígado	Riñón	Bazo
PBS	1,4	0,08	0,34
ISIS 537402	1,6	0,09	0,31
ISIS 537450	1,5	0,09	0,33
ISIS 537451	1,6	0,08	0,33
ISIS 537452	1,6	0,09	0,34
ISIS 537480	1,7	0,08	0,34
ISIS 537524	1,6	0,11	0,35
ISIS 141923	1,6	0,09	0,31

Función hepática

[0184] Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de transaminasas utilizando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) (Nyblom, H. et al., Alcohol & Alcoholism 39: 336-339, 2004; Tietz NW (Ed): Clinical Guide to Laboratory Tests, 3ª ed. WB Saunders, Filadelfia, PA, 1995). Se midieron las concentraciones plasmáticas de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) y los resultados se presentan en la Tabla 7 expresada en UI/L. Varios de los oligonucleótidos ISIS se consideraron tolerables en los ratones, como lo demuestra su perfil de transaminasas hepáticas.

Tabla 7

Niveles ALT y AST (UI/L) de ratones C57BL/6		
	ALT	AST
PBS	40	59
ISIS 537402	42	63
ISIS 537450	49	77
ISIS 537451	54	67
ISIS 537452	38	67
ISIS 537480	35	58
ISIS 537524	219	180
ISIS 141923	60	83

Función renal

[0185] Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de BUN utilizando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) (Nyblom, H. et al., Alcohol & Alcoholism 39: 336-339, 2004; Tietz NW (Ed): Clinical Guide to Laboratory Tests, 3ª ed. WB Saunders, Filadelfia, PA, 1995). Los resultados se presentan en la Tabla 8 expresada en mg/dL. Varios de los oligonucleótidos ISIS se consideraron tolerables en los ratones, como lo demuestra su perfil de BUN en plasma.

Tabla 8

Niveles de BUN (mg/dL) de ratones C57BL/6	
	BUN
PBS	41
ISIS 537402	43
ISIS 537450	42
ISIS 537451	47
ISIS 537452	37
ISIS 537480	34
ISIS 537524	40
ISIS 141923	35

Ejemplo 2: Efecto de la inhibición antisentido dependiente de la dosis de TMPRSS6 murino

[0186] El efecto del tratamiento con varias concentraciones de dosis de ISIS 537450 e ISIS 537452 se evaluó en ratones C57BL/6 de tipo silvestre.

Tratamiento

[0187] Se inyectaron grupos de tres de cuatro ratones C57BL/6, cada uno con 25 mg/kg, 50 mg/kg, o 100 mg/kg de ISIS 537450, la semana durante 4 semanas. Se inyectaron tres grupos de cuatro ratones C57BL/6 cada uno con 25 mg/kg, 50 mg/kg o 100 mg/kg de ISIS 537452, semanalmente durante 4 semanas. Se inyectó a un grupo de 4 ratones cada uno con 50 mg/kg de oligonucleótido de control, ISIS 141923 (SEQ ID NO: 14), semanalmente durante 4 semanas. Se inyectó a un grupo de ratones control con solución salina tamponada con fosfato (PBS) administrada semanalmente durante 4 semanas. Los ratones fueron sacrificados dos días después de la dosis final.

ARN Análisis

[0188] Se extrajo ARN de tejido de hígado para análisis en tiempo real PCR de TMPRSS6, utilizando conjunto de sonda de cebador RTS3481. El análisis RT-PCR de hepcidina también se realizó, usando el conjunto de sonda de cebador RTS1777. Los niveles de ARNm se normalizaron usando RIBOGREEN®. Como se muestra en la Tabla 9, los oligonucleótidos antisentido lograron una reducción dependiente de la dosis de TMPRSS6 murino sobre el control de PBS. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de TMPRSS6, en relación con el control. Como se muestra en la Tabla 10, los oligonucleótidos antisentido lograron un aumento dependiente de la dosis de los niveles de hepcidina murina en comparación con el control PBS. Los resultados se presentan como un porcentaje de aumento de hepcidina, en relación con el control.

Tabla 9

Porcentaje de inhibición de los niveles de ARNm TMPRSS6 murino en ratones C57BL/6		
	Dosis (mg/kg/semana)	% de inhibición
ISIS 537450	25	45
	50	76
	100	90
ISIS 537452	25	56
	50	50
	100	100
ISIS 141923	100	27

Tabla 10

Aumento porcentual en los niveles de ARNm de hepcidina murina en ratones C57BL/6		
Dosis (mg/kg/semana)	% de aumento	
ISIS 537450	25	28
	50	110
	100	372
ISIS 537452	25	55
	50	268
	100	349
ISIS 141923	100	109

Efecto sobre los niveles de hierro

[0189] La capacidad de unión al hierro insaturado (UIBC) se usa frecuentemente junto con una prueba de hierro en suero para evaluar la sobrecarga de hierro en pacientes con hemocromatosis (Yamanishi, H. et al., Clin. Chem. 49: 175-178, 2003). Estas dos pruebas se utilizan para calcular la saturación de transferrina, un indicador más útil del estado del hierro que solo el hierro o el UIBC solo (Adams, PC et al., N Engl. J. Med. 352: 1769-1778, 2005). Los niveles de hierro y la capacidad de unión de hierro insaturado de las moléculas de transferrina se midieron usando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) (Siek, G. et al., Clin. Chem. 48: 161-166, 2002). Los resultados para niveles de hierro, niveles de transferrina y porcentaje de saturación de transferrina se presentan en las Tablas 11 y 12, e indican que el tratamiento con oligonucleótidos ISIS redujo los niveles de hierro y el porcentaje de saturación de transferrina y aumentó los niveles de transferrina.

Tabla 11

Niveles de hierro de ratones C57BL/6		
	Dosis (mg/kg/semana)	Hierro (µg/dL)
PBS	-	109
ISIS 537450	25	102
	50	56
	100	38
ISIS 537452	25	93
	50	53
	100	44
ISIS 141923	100	87

Tabla 12

Porcentaje de saturación de transferrina y niveles de transferrina en ratones C57BL/6			
	Dosis (mg/kg/semana)	Saturación de transferrina (%)	Transferrina (ng/ml)
PBS	-	35	122
ISIS 537450	25	28	136
	50	14	151
	100	9	159
ISIS 537452	25	25	142
	50	11	164
	100	8	183
ISIS 141923	100	23	144

Función hepática

[0190] Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de transaminasas usando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) (Nyblom, H. et al., Alcohol & Alcoholism 39: 336-339, 2004; Tietz NW (Ed): Clinical Guide to Laboratory Tests, 3ª ed. WB Saunders, Filadelfia, PA, 1995). Se midieron las concentraciones plasmáticas de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) y los resultados se presentan en la Tabla 13 expresada en UI/L. Los oligonucleótidos ISIS dirigidos a TMPRSS6 se consideraron tolerables en los ratones, como lo demuestra su perfil de transaminasas hepáticas.

Tabla 13

Niveles ALT y AST (UI/L) de ratones C57BL/6			
	Dosis (mg/kg/semana)	ALT	AST
PBS	-	45	79
ISIS 537450	25	50	95
	50	22	62
	100	24	66
ISIS 537452	25	17	38
	50	54	60
	100	38	76
ISIS 141923	100	112	172

Función renal

[0191] Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de BUN usando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) (Nyblom, H. et al., Alcohol & Alcoholism 39: 336-339, 2004; Tietz NW (Ed): Clinical Guide to Laboratory Tests, 3ª ed. WB Saunders, Filadelfia, Pensilvania, 1995). Los resultados se presentan en la Tabla 14 expresada en mg/dL. Los objetivos de oligonucleótidos ISIS se consideraron tolerables en los ratones, como lo demuestra su perfil de BUN en plasma.

Tabla 14

Niveles de BUN (mg/dL) de ratones C57BL/6		
	Dosis (mg/kg/semana)	BUN
PBS	-	36
ISIS 537450	25	32
	50	33
	100	32
ISIS 537452	25	32
	50	32
	100	35
ISIS 141923	100	32

Ejemplo 3: Efecto de la inhibición antisentido de TMPRSS6 murino en ratones inactivados con HFE

[0192] El efecto del tratamiento de oligonucleótido antisentido dirigido a TMPRSS6 murino se evaluó en ratones HFE $^{-/-}$. Los ratones HFE $^{-/-}$ tienen profundas diferencias en los parámetros de la homeostasis del hierro en comparación con los compañeros de camada de tipo silvestre. La saturación de transferrina en ayunas es significativamente elevada y las concentraciones de hierro hepático son significativamente más altas que los ratones de control. Por lo tanto, los ratones inactivados con HFE se consideran un modelo estándar de hemocromatosis hereditaria (Zhou, XY y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 1998. 95: 2492-2497).

[0193] ISIS 537450 (TTTCTTTCCTACAGAGACCC; SEQ ID NO: 9) es un gapmer 5-10-5 MOE, 20 nucleósidos de longitud, en donde el segmento gap central está compuesto por diez 2'-desoxinucleósidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden cinco nucleósidos cada una. Cada nucleósido en el segmento del ala 5' y cada nucleósido en el segmento del ala 3' tiene una modificación 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos en todo el gapmer son enlaces de fosforotioato (P = S). Todos los residuos de citosina en todo el gapmer son 5-metilcitosinas. ISIS 537450 se dirige a ARNm TMPRSS6 murino (Nº de acceso GENBANK NM_027902,2, incorporado aquí como SEQ ID NO: 1) con un sitio de inicio diana de 2933.

[0194] Se evaluó el efecto del tratamiento de los ratones con ISIS 537450 en los niveles TMPRSS6 ARNm y hierro.

Tratamiento

[0195] Un grupo de 12 ratones HFE$^{-/-}$ macho y hembra fueron inyectados con 100 mg/kg de ISIS 537450 semanal durante 6 semanas. Un grupo de control de 11 ratones HFE $^{-/-}$ machos y hembras se inyectó con PBS semanalmente durante 6 semanas. Los ratones recibieron comida normal durante el período de estudio. Los ratones fueron sacrificados 2 días después de la dosis final de oligonucleótido antisentido o PBS.

Análisis de ARN

[0196] Se extrajo ARN de tejido de hígado para análisis en tiempo real PCR de TMPRSS6, utilizando un conjunto de sonda de cebador RTS3481 (ATTCCACGCTGGGCTGTTAT secuencia directa, designada aquí como SEQ ID NO: 15; CTGGTCAGGCCCCTTCAA secuencia inversa, designada aquí como SEQ ID NO: 16; secuencia de sonda TGAACCCAGGCCAGGTCCTCCC, designada aquí como SEQ ID NO: 17). El análisis RT-PCR de hepcidina también se realizó, usando el conjunto de sonda de cebador RTS1777 (secuencia directa TGCAGAAGAGAAGGAAGAGAGACA, designada aquí como SEQ ID NO: 18; secuencia inversa CACACTGGGAATTGTTACAGCATT, designada aquí como SEQ ID NO: 19; secuencia de sonda CAACTTCCCCATCTGCATCTTCTGCTQT, designada aquí ID NO: 20). Los niveles de ARNm se normalizaron usando RIBOGREEN®. El tratamiento con ISIS 537450 logró una reducción del 88% de TMPRSS6 murino sobre el control de PBS. El tratamiento con ISIS 537450 también logró un aumento del 152% de los niveles de hepcidina murina en comparación con el control de PBS.

Efecto sobre los niveles de hierro

[0197] Los niveles de hierro se midieron usando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) (Siek, G. et al.., Clin. Chem. 48: 161-166, 2002). Los resultados para los niveles de transferrina, los niveles de hierro y el porcentaje de saturación de transferrina se presentan en la Tabla 15, e indican que el tratamiento con oligonucleótidos ISIS aumentó los niveles de transferrina y redujo los niveles de hierro y el porcentaje de saturación de transferrina. En comparación, los niveles de hierro en ratones de tipo silvestre no tratados (C57BL/6) mostrados anteriormente son generalmente de aproximadamente 110 µg/dL, los niveles de transferrina son de aproximadamente 122 ng/ml y la saturación de transferrina es de aproximadamente el 35%. Por lo tanto, la inhibición antisentido de

TMPRSS6 en este modelo resultó en una mejora de los niveles de hierro, niveles de transferrina y niveles de saturación de transferrina cercanos a los encontrados en ratones de tipo silvestre.

[0198] Los niveles de hierro en el hígado y el bazo fueron medidos por Exova (Santa Fe Springs, CA). Los datos se presentan en la Tabla 16. Los resultados indican que la inhibición antisentido de TMPRSS6 produjo una disminución en la acumulación hepática de hierro y un aumento en la retención de hierro en los macrófagos de los ratones HFE $^{-/-}$. La reducción de hierro del tejido hepático y la absorción simultánea de hierro sérico no unido por los macrófagos indican que la inhibición antisentido de TMPRSS6 en este modelo da como resultado la mejora de la sobrecarga de hierro en los tejidos (Nemeth, E. et al., Science. 2004. 306: 2090-3).

Tabla 15

Niveles séricos de hierro, saturación de transferrina y niveles de transferrina en ratones HFE $^{-/-}$			
	Suero de hierro (µg/dL)	Saturación de transferrina (%)	Transferrina (ng/ml)
PBS	318	93	132
ISIS 537450	142	26	183

Tabla 16

Niveles de hierro en hígado y macrófagos de ratones HFE $^{-/-}$ (µg/g de tejido)		
	Hígado	Macrófagos
PBS	388	468
ISIS 537450	256	683

Ejemplo 4: Efecto de la inhibición antisentido de TMPRSS6 murino en ratones th3/+

[0199] El modelo de ratones th3/+, un modelo de β-talasemia, alberga una deleción heterocigótica de genes β^{menor} y β^{mayor} (Yang, B. et al.., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 1995. 92: 11608-12; Ciavetta, DJ et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 1995. 92: 9259-63) y exhibe características comparables a las de pacientes afectados por β-talasemia intermedia (TI). El efecto del tratamiento con un oligonucleótido antisentido dirigido a TMPRSS6 murino se evaluó en ratones th3/+.

[0200] ISIS 537452 (GCTTAGAGTACAGCCCACTT; SEQ ID NO: 11) es un gapmer 5-10-5 MOE, 20 nucleósidos de longitud, en donde el segmento de hueco central está compuesto por diez 2'-desoxinucleósidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden cinco nucleósidos cada una. Cada nucleósido en el segmento del ala 5' y cada nucleósido en el segmento del ala 3' tiene una modificación 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos en todo el gapmer son enlaces de fosforotioato (P = S). Todos los residuos de citosina en todo el gapmer son 5-metilcitosinas. ISIS 537452 se dirige a ARNm TMPRSS6 murino (Nº de acceso GENBANK NM_027902,2, incorporado aquí como SEQ ID NO: 1) con un sitio de inicio diana de 3044.

[0201] Se evaluó el efecto del tratamiento de los ratones con ISIS 537452 en varios parámetros en los ratones.

Tratamiento

[0202] Un grupo de igual número de ratones th3/+ machos y hembras, de 10-15 semanas de edad, se inyectó con 100 mg/kg de ISIS 537452 semanalmente durante 6 semanas. Un grupo de control de ratones th3/+ machos y hembras se inyectó con PBS semanalmente durante 6 semanas. Los ratones recibieron comida normal durante el período de estudio. Los ratones fueron sacrificados 2 días después de la dosis final de oligonucleótido antisentido o PBS. Los grupos de hombres y mujeres se evaluaron por separado.

Análisis ARN

[0203] Se extrajo ARN de tejido de hígado para análisis en tiempo real PCR de TMPRSS6, utilizando el conjunto de sonda de cebador RTS3481. También se realizó un análisis por RT-PCR de hepcidina, usando el conjunto de sonda de cebador RTS1777. Los niveles de ARNm se normalizaron usando RIBOGREEN®. Los datos se presentan en la Tabla 17. Los resultados indican que ISIS 537452 redujo significativamente los niveles de TMPRSS6 en el hígado. La inhibición antisentido de los niveles de TMPRSS6 se asoció con un aumento modesto en la expresión absoluta de hepcidina en los ratones th3/+. Sin embargo, cuando la expresión de hepcidina se normalizó por la concentración de hierro en el hígado, la diferencia entre los ratones de hielo th3/+ no tratados y tratados fue significativa, lo que corresponde a un aumento de 3,4 veces en los machos y un aumento de 2,0 veces en las hembras. Los niveles de TMPRSS6 y hepcidina se expresan como un porcentaje del grupo de control PBS masculino.

Tabla 17

% de cambio en ratones th3/+		
	TMPRSS6	Hepcidina
PBS-Hembra	+4	+34
ISIS 537452-Hembra	-85	+64
ISIS 537452-Macho	-85	+67

Análisis del suero

[0204] Niveles de hierro y transferrina se midieron usando un analizador de química clínica automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) (Siek, G. et al, Clin Chem 2002 48: 161-166). Se calculó la saturación de transferrina. Los datos se presentan en la Tabla 18 e indican que el tratamiento con oligonucleótidos ISIS redujo los niveles de hierro y el porcentaje de saturación de transferrina.

[0205] Niveles de bilirrubina total se midieron también por el mismo analizador de química clínica. Los datos también se presentan en la Tabla 18. Los resultados indican que la inhibición antisentido de TMPRSS6 resultó en una disminución en los niveles totales de Bilirrubina de los ratones. Además, la mayoría de la bilirrubina era bilirrubina indirecta (datos no mostrados) en los ratones th3/+, lo que indica que la inhibición antisentido disminuyó la hemólisis.

Tabla 18

Parámetros séricos en ratones th3/+					
		Niveles de hierro (µg/dL)	Transferrina (ng/ml)	Saturación de transferrina (%)	Bilirrubina total (mg/dL)
Masculino	PBS	199	138	63	0,32
	ISIS 537452	134	172	26	0,16
Hembra	PBS	179	135	55	0,30
	ISIS 537452	111	164	20	0,15

Análisis de órganos

[0206] Los niveles de hierro en el bazo y el hígado fueron medidos por el Centro de Diagnóstico para la Población y la Salud Animal (DCPAH) (Michigan State University, Lansing, MI). Los datos se presentan en las Tablas 19 y 20. Los resultados indican que el tratamiento con oligonucleótidos ISIS redujo la concentración de hierro en el hígado. La medición del peso del bazo indicó que la inhibición antisentido de TMPRSS6 también redujo el peso del bazo en comparación con los grupos de control. El peso del bazo se expresa como un porcentaje del peso medido en un grupo de ratones al comienzo del experimento. La tinción con azul de Prusia de Pearl indicó que el hierro en el bazo se localizó predominantemente en macrófagos (datos no mostrados) como se esperaba por el aumento de la expresión de hepcidina. La reducción de hierro del tejido hepático y la absorción simultánea de hierro sérico no unido por los macrófagos indican que la inhibición antisentido de TMPRSS6 en este modelo da como resultado la mejora de la sobrecarga de hierro en los tejidos (Nemeth, E. et al., Science. 2004. 306: 2090-3).

[0207] Por lo tanto, la inhibición de antisentido TMPRSS6 reduce la acumulación hepática de hierro y esplenomegalia asociada con este modelo de ratón (Pippard, MJ et al, Lancet 1979. 2: 819-21; Yang, B. et al, Proc Natl Acad. Sci. EE.UU. 1995. 92: 11608-12).

Tabla 19

Análisis de la concentración de hierro en el hígado en ratones th3/+		
		Conc. de hierro en hígado (µg/dL)
Masculino	PBS	605
	ISIS 537452	315
Hembra	PBS	1321
	ISIS 537452	816

Tabla 20

Análisis del peso del bazo en ratones th3/+		
		Peso relativo del bazo (%)
Masculino	PBS	1,1
	ISIS 537452	0,1
Hembra	PBS	1,6
	ISIS 537452	0,1

Análisis hematológico

[0208] El recuento de glóbulos rojos (RBC), recuento de reticulocitos, hemoglobina (HGB) y hematocrito (HCT) se midieron en el día 42 usando un Analizador de hematología ADVIA120 (Bayer, EE.UU.). Los datos se presentan en la Tabla 21 e indican que el tratamiento con oligonucleótidos ISIS aumentó el recuento de glóbulos rojos, los niveles de HGB y HCT, y disminuyó el recuento de reticulocitos (es decir, el número de reticulocitos como porcentaje del número de glóbulos rojos). El aumento de glóbulos rojos y la disminución del recuento de reticulocitos indica que el tratamiento antisentido mejoró la producción de glóbulos rojos.

[0209] Además, los ratones tratados con th3/+ exhibieron valores más bajos de MCHy MCV, lo que sugiere, como se observó anteriormente (Gardenghi et al., J Clin Invest, 2010, 120: 4466-4477), que niveles más bajos de saturación de transferrina se asociaron con una ingesta de hierro disminuida y formación de hemicromos.

[0210] Los resultados indican que la inhibición antisentido de TMPRSS6 mejoró el fenotipo anémico en este modelo.

Tabla 21

Análisis del fenotipo anémico en ratones th3/+					
		RBC ($x10^6$ células/µL)	Reticulocitos ($x10^5$ células/µL)	HGB (g/dL)	HCT (g/dL)
Masculino	Día 0	8,3	1404	7,6	28,6
	Día 42	11,1	472	9,2	34,5
Hembra	Día 0	8,5	1818	7,8	30,5
	Día 42	11,3	1029	10,0	36,5

LISTADO DE SECUENCIAS

[0211]

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc.
Shuling Guo

<120> MODULACIÓN DE EXPRESIÓN DE TMPRSS6

<130> BIOL0162WO

<150> 61/556,755
<151> 2011-11-07

<150> 61/710,636
<151> 2012-10-05

<160> 20

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 3206
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 1

agtttcattg tcgccctgga cctgacagga gaggcccatg gaacttgggg ccacaggcca 60
caagggacaa gggccagaca ccccagccat ggctccaggc cattgatcca acctaagctg 120
gccagttggg ggtggaaaga ccttggcctg gataaacaga ggcctccagg cctgtgtgca 180
ggcccggcac ctaccttcca ctcttgaaga tgccgagatg tttccagctc ccctgttcta 240
ccaggatgcc caccaccgag gtcccccaag cggctgatgg tcagggcgat gcgggtgatg 300
gagaggaagc tgctgagcca gaggggaagt tcaagccccc aaaaaacacc aagagaaaaa 360
accgggacta cgtccgcttc acgccactgt tgctggtctt ggctgcgctg gtctcagcag 420
gggtcatgct ttggtatttc ctagggtaca aagcggaagt gaccgtaagc caggtgtact 480
ctggcagcct ccgggtgctc aaccgtcatt tctcccagga cctgggccga cgggagtcta 540
ttgctttccg cagtgaatct gccaaagccc agaagatgct ccaagaactg gttgccagca 600
cccgcctggg tacttactac aactctagtt ctgtctactc ctttggggag ggacccctca 660
cctgcttctt ctggtttatc cttgacatcc ctgagtacca gcgactgacc ctgagccctg 720
aagtagtgcg cgagctcctg gtggatgagc tactgtccaa cagctcaacc ctggcttcct 780
ataagaccga atatgaggtg gacccggaag gcctggtgat cctggaagcc agtgtgaacg 840
acatagtcgt actgaattcc acgctgggct gttatcgcta cagctatgtg aacccaggcc 900
aggtcctccc attgaagggg cctgaccagc agaccacaag ctgcctgtgg catctgcaag 960
ggcccgaaga cctcatgatc aaagtgcggc tggagtggac ccgggtcgat tgcagagaca 1020
gggtggcgat gtacgacgca gctgggcccc tggagaagag acttatcacc tcggtctatg 1080
ggtgcagccg ccaggaacct gtgatggagg tgctggcatc gggctccgtc atggccgtgg 1140
tgtggaaaaa gggcatgcat agctactatg acccttcct gctctcagtg aagtctgtgg 1200
ccttccagga ctgccaggtg aacctgacac tggagggccg gctggacaca cagggcttcc 1260
tccgtacacc ctactacccc agttactact ctcccagtac ccactgctcc tggcatctca 1320
cggtaccctc tctggactac ggcttggcgc tctggttcga tgcctacgca ctgaggaggc 1380
agaagtacaa ccgactgtgt actcagggcc agtggatgat ccagaacagg aggctgtgtg 1440
gcttccgtac cctgcagcca tatgctgaga ggatccccat ggtggcctca gatggtgtca 1500
ccatcaactt cacctcccag atctccctca caggcccggg tgtgcaagtg tactacagct 1560
tgtacaacca atcagacccc tgccctggtg agttcctctg ctctgtgaat ggactgtgtg 1620
tccctgcgtg tgacgggatc aaggactgcc ccaatggcct ggatgagaga aactgtgtct 1680
gcagagccat gttccagtgc caagaggaca gcacgtgcat ttcactgcct agagtctgtg 1740
accggcagcc cgactgtctc aatggcagtg acgaagaaca gtgccaagaa ggagtgccct 1800
gtgggacatt cactttccag tgtgaggacc ggagctgtgt gaagaagccc aacccagagt 1860
gtgacggcca gtcagattgc agagacggct cagatgagca acactgtgac tgtggcctcc 1920
agggcctctc cagccgtatt gtgggcggga ccgtgtcctc cgagggtgag tggccatggc 1980
aggccagcct ccagattcgg ggtcgacaca tctgtggggg ggctctcatc gctgaccgct 2040
gggtcataac ggccgcccac tgcttccagg aggacagcat ggcctccccg aagctgtgga 2100
ccgtgttcct gggaaagatg cggcagaact cgcgctggcc aggcgaggtg tccttcaagg 2160

tgagccgtct gttcctgcac ccgtaccacg aggaggacag ccatgactac gacgtggccc 2220
tgctgcagct cgaccacccc gtggtgtact cggccactgt gcgccccgtc tgcctgcctg 2280
cccgctccca cttctttgag ccaggccagc actgctggat cacaggctgg ggagcccagc 2340
gagagggtgg tccggtgagc aacaccctgc agaaggtgga cgtacagctg gtccctcagg 2400
acctctgcag tgaggcctac cgctaccagg tgtccccacg catgctctgt gctggctacc 2460
gcaagggcaa gaaagatgcc tgccagggtg actctggagg cccactggtt tgcagggagc 2520
ccagtggccg ctggttcctg gcagggttgg ttagctgggg cctgggctgt ggccgaccca 2580
atttctttgg cgtctacacc cgtgtcacac gtgtgatcaa ctggatccag caggtgctga 2640
cctgagggct gttctacaga gctggacctg cctccaggcc aagttcaggg tgtccaccca 2700
gccaggacac aagtattctg gggcaagtga ccctgctaag gcctgtttcc ctcaggccta 2760
ccccagtgac agtacagaga aggatgtcag ctggtggtta ggatgcctcc tgaggtccag 2820
gggccagcct cggctaggtt tcacttctaa ccctttctta ttctagtcct ttcccctccc 2880
tgctcctacc actgttttgg agtggggtct ggcggccatg accttggcct ccgggtctct 2940
gtaggaaaga aagaatcctt ccccttgcaa aagcctcttg ggggaactgc acagagaaag 3000
aaggtgcctc tatcaaggct ctatcagagc ccttgagtct gccaagtggg ctgtactcta 3060
agccaaatca ccgggcagcc tcagctgcag atgcctgctg aagctctgcc tgctacaggg 3120
gcctccctgc cattcactgg aggcccactg tctgttctgg gaataaagca cttgaccaag 3180
ccctgacact gaaaaaaaaa aaaaaa 3206

<210> 2
<211> 3212
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 2

cttgagccag acccagtcca gctctggtgc ctgccctctg gtgcgagctg acctgagatg 60
cacttccctc ctctgtgagc tgtctcggca cccacttgca gtcactgccg cctgatgttg 120
ttactcttcc actccaaaag gatgcccgtg gccgaggccc cccaggtggc tggcgggcag 180
ggggacggag gtgatggcga ggaagcggag ccggagggga tgttcaaggc ctgtgaggac 240
tccaagagaa aagcccgggg ctacctccgc ctggtgcccc tgtttgtgct gctggccctg 300
ctcgtgctgg cttcggcggg ggtgctactc tggtatttcc tagggtacaa ggcggaggtg 360
atggtcagcc aggtgtactc aggcagtctg cgtgtactca atcgccactt ctcccaggat 420
cttacccgcc gggaatctag tgccttccgc agtgaaaccg ccaaagccca gaagatgctc 480
aaggagctca tcaccagcac ccgcctggga acttactaca actccagctc cgtctattcc 540
tttggggagg gacccctcac ctgcttcttc tggttcattc tccaaatccc cgagcaccgc 600
cggctgatgc tgagccccga ggtggtgcag gcactgctgg tggaggagct gctgtccaca 660
gtcaacagct cggctgccgt cccctacagg gccgagtacg aagtggaccc cgagggccta 720
gtgatcctgg aagccagtgt gaaagacata gctgcattga attccacgct gggttgttac 780
cgctacagct acgtgggcca gggccaggtc ctccggctga aggggcctga ccacctggcc 840
tccagctgcc tgtggcacct gcagggcccc aaggacctca tgctcaaact ccggctggag 900
tggacgctgg cagagtgccg ggaccgactg gccatgtatg acgtggccgg gcccctggag 960
aagaggctca tcacctcggt gtacggctgc agccgccagg agcccgtggt ggaggttctg 1020
gcgtcggggg ccatcatggc ggtcgtctgg aagaagggcc tgcacagcta ctacgacccc 1080
ttcgtgctct ccgtgcagcc ggtggtcttc caggcctgtg aagtgaacct gacgctggac 1140
aacaggctcg actcccaggg cgtcctcagc accccgtact tccccagcta ctactcgccc 1200
caaacccact gctcctggca cctcacggtg ccctctctgg actacggctt ggccctctgg 1260
tttgatgcct atgcactgag gaggcagaag tatgatttgc cgtgcaccca gggccagtgg 1320
acgatccaga acaggaggct gtgtggcttg cgcatcctgc agccctacgc cgagaggatc 1380
cccgtggtgg ccacggccgg gatcaccatc aacttcacct cccagatctc cctcaccggg 1440
cccggtgtgc gggtgcacta tggcttgtac aaccagtcgg acccctgccc tggagagttc 1500
ctctgttctg tgaatggact ctgtgtccct gcctgtgatg gggtcaagga ctgccccaac 1560
ggcctggatg agagaaactg cgtttgcaga gccacattcc agtgcaaaga ggacagcaca 1620
tgcatctcac tgcccaaggt ctgtgatggg cagcctgatt gtctcaacgg cagcgacgaa 1680
gagcagtgcc aggaaggggt gccatgtggg acattcacct tccagtgtga ggaccggagc 1740
tgcgtgaaga agcccaaccc gcagtgtgat gggcggcccg actgcaggga cggctcggat 1800
gaggagcact gtgactgtgg cctccagggc ccctccagcc gcattgttgg tggagctgtg 1860
tcctccgagg gtgagtggcc atggcaggcc agcctccagg ttcggggtcg acacatctgt 1920
gggggggccc tcatcgctga ccgctgggtg ataacagctg cccactgctt ccaggaggac 1980
agcatggcct ccacggtgct gtggaccgtg ttcctgggca aggtgtggca gaactcgcgc 2040
tggcctggag aggtgtcctt caaggtgagc cgcctgctcc tgcacccgta ccacgaagag 2100
gacagccatg actacgacgt ggcgctgctg cagctcgacc acccggtggt gcgctcggcc 2160
gccgtgcgcc ccgtctgcct gcccgcgcgc tcccacttct tcgagcccgg cctgcactgc 2220
tggattacgg gctggggcgc cttgcgcgag ggcggcccca tcagcaacgc tctgcagaaa 2280

gtggatgtgc agttgatccc acaggacctg tgcagcgagg tctatcgcta ccaggtgacg 2340
ccacgcatgc tgtgtgccgg ctaccgcaag ggcaagaagg atgcctgtca gggtgactca 2400
ggtggtccgc tggtgtgcaa ggcactcagt ggccgctggt tcctggcggg gctggtcagc 2460
tggggcctgg gctgtggccg gcctaactac ttcggcgtct acacccgcat cacaggtgtg 2520
atcagctgga tccagcaagt ggtgacctga ggaactgccc ccctgcaaag cagggcccac 2580
ctcctggact cagagagccc agggcaactg ccaagcaggg ggacaagtat tctggcgggg 2640
ggtgggggag agagcaggcc ctgtggtggc aggaggtggc atcttgtctc gtccctgatg 2700
tctgctccag tgatggcagg aggatggaga agtgccagca gctgggggtc aagacgtccc 2760
ctgaggaccc aggcccacac ccagcccttc tgcctcccaa ttctctctcc tccgtcccct 2820
tcctccactg ctgcctaatg caaggcagtg gctcagcagc aagaatgctg gttctacatc 2880
ccgaggagtg tctgaggtgc gccccactct gtacagaggc tgtttgggca gccttgcctc 2940
cagagagcag attccagctt cggaagcccc tggtctaact tgggatctgg gaatggaagg 3000
tgctcccatc ggaggggacc ctcagagccc tggagactgc caggtgggcc tgctgccact 3060
gtaagccaaa aggtggggaa gtcctgactc cagggtcctt gccccacccc tgcctgccac 3120
ctgggccctc acagcccaga ccctcactgg gaggtgagct cagctgccct ttggaataaa 3180
gctgcctgat caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 3212

<210> 3
<211> 41251
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 3

atagtaagag gagatgaact tcgcagtagt ctggagcctt tgctctcccg gtgggtgggt 60
caaaggcttt ctctgtactg tggggaaacc tgcgtcaaag gccaaataca ttgggatgtt 120
tgcttgaaag ggtctcaaaa tagagttgga accctggagc gtggagaggg gcgacattca 180
gttgctattt aatcatgatt tgttaattaa cagctcattt atgggaggca tcttagattc 240
gtggaaaaag cagggagtca gacatctaga ctcaacctcc acttccctgc tgtgtgatct 300
tgggcaagcg gcttagcctc tctgggcttc agggtttttt taatctgtaa aatgcgtctg 360
ggagtgaatg tcaggtattc aaatcacact gggaaaatgg ggctaggaaa agccctagac 420
tgagttagtg ctagaacact ctgggtctca gtttccttat ctgttcaatg ggtgcagaac 480
tggaggttta agtgagataa agcaggtgaa gtacccacgt ggtgtgggct ggaggaagaa 540
aacatgggac aatggttcca catccctggg tgacctgaaa attaagtgtg agatgtctca 600
tgagggcacg aaatgaatat tagtttttgt tcccttcctc tgccacaaga ctttgagagc 660
agaaaggtga gagagacggt actctgtgaa ggaaggcagg tccccggccc agcgcagtgc 720
cagctcaggg gattctgggg cgggggctaa gtgcatggac tgtgtgggcg tggtgggaag 780
ctccgtgaac cagaaccagg agcaagaaac agcattcctt gcgtggacgg gaaatgaggg 840
caagaggtca gatgtctaca gaagtctgca ccccatgtac ttcagttctg tctgtgggtg 900
cagcctctag ggaggtgggt gtttaggtac tgagacctcc gtctgtcctc tgaccatagg 960
gaagccagtg ggaagcaaag gtggggttct tgagccagac ccagtccagc tctggtgcct 1020
gccctctggt gcgagctgac ctgagatgca cttccctcct ctgtgagctg tctcggcacc 1080
cacttgcagt cactgccgcc tgatgttgtt actcttccac tccaaaaggc agggaagtcc 1140
tgcttccgtg ccccaccggt gctcagcaga ggctcccttg caaatgcgag gctgtttcca 1200
actttggtct gtttccctgg caggatgccc gtggccgagg ccccccaggt ggctggcggg 1260
caggggacg gaggtgatgg cgaggaagcg gagccggagg ggatgttcaa ggcctgtgag 1320
gactccaaga gaaaagcccg gggctacctc cgcctggtgc ccctgtttgt gctgctggcc 1380
ctgctcgtgc tggcttcggc gggggtgcta ctctggtatt tcctaggtaa cgttgtggga 1440
ccgcctggga gaggcacctg gggaggactt ggggtgactg tagcaggcac agcaggacag 1500
gactgggttc caggctcagc cgtgcttagc atattgctgt gtgaccttgg gcaagtcact 1560
tctgttctct gggtctccct ccctgtcctt ccagctggag atgctgtcag accctggctc 1620
caggtcctat ggctcgggtc tgcttcctgc ttgggcaaag tgccccaaag ctccccacca 1680
ggtggggaaa gtgggccctc ctagcaccca gttcttgtga gccagccagc ccacagagca 1740
taaacatcgc cttcccttgc ctgcagtcct cctgggttgc ccctgaggct tggagccaac 1800
ccagccctaa agaaggaggc ccagaggcac caatggtacc tggtaccaat tagtgcctct 1860
gctcacttga gcctagccta ggttctcctc taggctgggg accacagctc tatcccctct 1920
gggtctccag ggtccagcat gaatggggga cggagcaggc agctggagag cagccagcct 1980
tggggccctc tgccatgtcc ttaattatgg ctggcccctc cctgatgtca cagccctcag 2040
tcagtcccct ggtgcccggg gagcaattgg cctgtgctct gggcccattc atccaggcct 2100
ccgttcattc attcatggaa taaatgctct tgagcatcta ttatctttct ctaagattga 2160
tggagtctct cctcttcctt ctgcctttga cagtgggaag taatggagaa accaaatcgg 2220
actgtgcctc tacactgtac actgtagaag gcccattcat ttgttcattt actcagtgcc 2280
aagcacctcc tgtgtgccag gttctgggga tagcccctgt ccttgtgatt tagccaaggc 2340
atcagacctg acatttacgc taaagcatag catgtgatgg gacagaggaa gctgagggct 2400

gggaagccac aggagggaca acccagatgc ctgcgtgatc agaagcatcc cattaaacat 2460
cctgcaaagg atagctagtg ctcttactgg ctgaatctcc tggtggaatt ccaggcctgt 2520
tgaaagcaac ctggggacca actttgtagc agtggagaga aatccatgta ggcctagatc 2580
caaggggtca gggttgggag tgtctggaac cagcatctgg gagtgacact attgggaacc 2640
ccaggtctga cacgggcctg cttgcaatga cttatagtga ttctacccag agttgagcaa 2700
cgcaggcagt agacgccatg tgcatttcac caccagcagg aagccagtgc cccagatagc 2760
acagggctgt gggggcctcc tcaggtagcg ggctaattag tctacagggt aaaccacggg 2820
gcactgggct ggagggccag gaactcacct gccaattatt tctctttgca gaggagttta 2880
attccccctg attatgctcc tggggtaaat caccccccac cccaggagag gtgctccatg 2940
gggctgagga cccaaggggt gagtgctccc aagcctctgc tgggggaagc caactccccc 3000
acagagggat taagggttga aggaggcact ttgggagctg tttgaaagac tcctcccgcc 3060
ttgaccaggc tgtgctcctg ggactgggcg ctgggcaagg aagtggatca gagacacgcc 3120
ctgccctgtc tggaagagga ggtgcacaag tgaccagtga cactggagca ggacaggccc 3180
caagcgagga ggacagcctg gcccgaggag agggtgtggc tggcttccta aggatggtag 3240
caggaccctt aataccacca accatatttc ctgggtcctt tccctttcct gctctcccag 3300
gcaagagttt tatgtgttct caagccccca gcacccgcct gcccctgtct cctgcttcag 3360
tgagaaaaca aaacagctta gaagagaagc cccatatatg ttggcccacc tgccctccca 3420
gctgcatcac gtgcactcct cctgggaccc cgatcccgcc ccctctgccc acacaatggc 3480
ccagcaccag caaggatgcc ctctctcccc cagtgtccct tggggtgcct cccccatttc 3540
tctgctcctt gaaagagctg tcagtccaca cacccagtct ctctgtgccc tttccaacct 3600
ggctccctct gccccccaac tccaatggcc attgtcaagc tcgccaacat cccaggttgc 3660
taaatccaat gtccacttct cagtcatcat tgcacttgac ccgggggctc acccccacct 3720
ccagaagccc tttcctccct agactttggg ccgccaccgg gtcctttccg ctcagcaggt 3780
tgctttttct gtgtccctgc tgatgggtgg ggcctctcct ttctctctcc acccgcttct 3840
ttcgtgatct catctgctac ccttagcttc aagtgcccct tataccctga taacacccac 3900
atttgcattt ctagcctggg cctctccctt gagcttgtct ctagagctgc ccctgctctt 3960
cctcttaatg tctaaggagc atctcggacc ctatgctttc agaccatgag gtctctgcat 4020
aatttccccc agacctgtac ctccaacatc ccagtccaag accacttctt tctggcacct 4080
tccccttact cctttctttc ttttccaccc agccccactt tgccagcaaa cctggtcatc 4140
tctaactcca aaacacatca aaagcagctg acgccaatca cttcccaccc tctcctctgc 4200
cacagctggg gccaggctct gtcccctgg acatctctcc cctggagccc tgcaggcgtg 4260
tcctcgatgc tctccctgcc tctgccctgc ctccttagag cctttctcaa cagcagaggg 4320
accatttgat aaagcaaacg aaatcctcta acttcgctgc ttaaaacctc gcttggggcc 4380
aggcgcgtgg ctcacgcccg taatcccagc actttgggag gccgaggcag atggatcacc 4440
tgaggtcagg agttcgagac cagcctgacc aatatgcaga aaccctgtct ctactaaaaa 4500
tacaaaatta accgggcgtg gtggtgcatg cctgtaatcc cagctacttg cgaggctgag 4560
gcaggagaat cgcttgaacc cgggaggcag aggttgtggt gagcggagat tgagccattg 4620
cactccaagc taggcaacaa gagcgaaact ctgtctcaaa aacaaaacaa aacaaaaaca 4680
aaaagaaaac aaaaaaacca cctcccattc ctcccatctt acccagggtg aaagcccgag 4740
tcctcccagg cctggaaagc cctacccagc ctctcccctt ccccatctca taccctcctg 4800
ctgtcctgtt gctcactctt tgctgctcct gaaacacacc aggcctttgc acttgccccc 4860
gcctgggaca ttctttccac agatgtacat caccttcttc cctgacctcc atatcgcagc 4920
ccgtcccatg ccctgattcc caccgcactg accacctcta acctgttata cacgatgtgt 4980
ggtttaccgt ctgattcctt gctagtctac aagctattaa gggcagtttt ttcttgatag 5040
ttctgtccgt tgttttgctc atatagtccc aagtactttg gctcagttcc tacacatagc 5100
aggctctcaa gaggtattta ctgagtaaat ggataggggt gtaaaccagg gctgtgagtc 5160
taccctcttc acttcagcca aaatagcctt tgcaaaacag aagtctgatg acatcattcc 5220
tgattttaaa cttttcatgg ttacccttgt tcatcgggta aagacccaat gggccctgcc 5280
ctgcggaggc cccagctcct tgccgccccc ccccatctct gactgctcca gccaaacagg 5340
ctttcagccc gggtcctcac catggtcccc gtgctaccgg ccccgtgccc catgctgctc 5400
cctctgctgg aaggtacttc cctccctctt ctcttaccaa tttacagttt ccccatccct 5460
acatctcagc tggagggtca ctccactctg gcccaggctg agtgtcctcg tcacatcccc 5520
tcaacagcac catgtggcac tgctccctga tggcactgcc cacagacaga tgccacatgc 5580
tgtgtggttg ccagagccac gcctttctta cccaccactg tcagcttcac aaggggaggc 5640
acatctgtct tggttaactg gcgtacccca tgtagtaggt ggttagcaca cactgtggga 5700
tccctgggtg acctcacgag tggaaggatg cctagtggtg ctgacccatg accttggcct 5760
cctgggccta tgtggatttc ctggccttca tgtcattggt gtcctggact ggtcactgtg 5820
tcagcctctc cctgggaacc tgtaggacac catccatctg ggagcctttc acctccctgg 5880
taccttgcag ccagtttgtc atccaataaa ctttagatga ccatgatgac aatgggagtg 5940
acaaagatga tgatgatgac attgatggtg ccatggagac ccaagacact gaggctgagc 6000
tgagggtgtg ggtggcagga gaaggcatgg aagagacagg agactttccc acctgcttcc 6060
tccactaacc ctgctggttc cttcctgggc agggtacaag gcggaggtga tggtcagcca 6120
ggtgtactca ggcagtctgc gtgtactcaa tcgccacttc tcccaggatc ttacccgccg 6180

ggaatctagt gccttccgca gtgaaaccgc caaagcccag aagatggtag gaaaggatct 6240
gggggatgag agggagggaa tatgggggtg aaaagagagg ggtggggtct gatcacatgg 6300
agccagttgg tcaacccatc tggagcattc acagggacca cagccctgct ccaggcacca 6360
tggaagcaga tgaggttgag ggtcatggga aagttagtgg atgtttgggt caatagcact 6420
cggattagat cctgatcatg cctcttacca ggggtggagc atgaccttgg gaaaggtccc 6480
acagtgcagc tgacactatt gagggcccgc tcctgcccct ccgttacagg acggtggccc 6540
gctcctcccc ctccgttaca ggacggtggc ccgctcctcc ccctccgtta caggacggtg 6600
gccgctcctg cccctccgtt acaggacggt ggccgctcct gcccctccgt tacaggacgg 6660
tggcccgctc ctccccctcc gttacaggac ggtggccctc tcctcccccc ccgttacagg 6720
acggtggccc tctcctcccc ctccgtaaca ggacggtggc cctctcctcc ccctccgtta 6780
caggacggtg gcccgctctt ccccctccgt tacaggacgg tggccgctcc tgcccctccg 6840
ttacaggacg gtggcccact cctgcccctc cgttacagga cagtggccgc tcctgcccct 6900
ccgttacagg acggtggccc gctcctgccc ctctgttaca agacggtggc ccgctcctgc 6960
ccctccgtta caggacggtg gccactcctg cccctctgtt acaggatggt ggctcactgc 7020
acggaggctg gtctactgcc tgccactctc aggctgcagg accactgccc agcaaggcag 7080
gccagaagtg ccggggagtt attcccagga gcaaccctga accatgagcg ctggagtggg 7140
tggatcaata ccgcagcttc tttggccctg gcaggggggaa tagttcacag aatgttccag 7200
gctgtctccc agagatgccc tattcggctg agctcagatg ctctcagctc tacactgcgc 7260
attcatggcc ctgtgttggt tgcccacttt ccagtctctc cctcccaact actgtttccc 7320
agaatcacct ccaaataaac cacttgcccc accttgtcaa tggagggtct gcttctgagg 7380
gacccagcct gaggctgccc gtttcctcct ccatgaggta ggggtgataa caacaggacc 7440
cggctgcaga tttgttgtgg gttgcagtga agttgagata acacgaacac tattcccacg 7500
ctgcgcaaat gcttaagagc ctgtaatcct gccagcagcg ctgtagttgg agatgcgcaa 7560
aaactaccca tcagagctgc tggcttgtcc caggccatgg gaggaggtgc agaggggacc 7620
caggagccga gtggggtttc tcagagttga ggagtgactt ttggcaaggg gcagaggggt 7680
catcagcagt gcaggtggag gtgagagtcg ggtgtagtgg aaacagaaag aaggggatgg 7740
ggtgtgagat tcatgcatgc cccggcccgg ccactcagca ctgtgtgacc gtgatcaagc 7800
ctgtccacct tggagaatca tgcatggagc ggggctgcca gtaggagcaa agggcacctc 7860
caggtaggaa gtgggcctgt ctgccctgca gagggtccca ggggctgttg tcttcccttc 7920
tcacagctca aggagctcat caccagcacc cgcctgggaa cttactacaa ctccagctcc 7980
gtctattcct ttgggtgagt tgtccttgcc cctgaccagc tcctgcaaga agctgagatt 8040
caaagaatgg gaggggcctc tgtaggcttc tgatgcaatg ccttcatgtt tcaaatgggg 8100
aaactaaggc atagagaggg aacttggctt cctgcatgtc accctccctt cactgggctc 8160
atctgtagaa tggaaacatg ggtgtgatag gtttgcacca gacaatgact gtgatggctg 8220
atcaagggcc tgacaccatc aggcgaggcg atgttggagg ggcatggggt taaaagcatt 8280
ggctccaggg cccgactgcc ccgtccacat ctggttctgc tacttgcggc atagtttatg 8340
agacacaagt tcacctctca tgcctcagtt ttctcattcg taaaataagg attatgagag 8400
cgcctccttc agaggtcgct aggaggcttc tgcgtgaaga cggacagcaa tggctgaggt 8460
gcggaaagtg ctcgatgtgc atgagcaggg gtggagctgg ggccagacct cagaatcctt 8520
ccctggcctc tctcacttct gcctgcctta gggagggacc cctcacctgc ttcttctggt 8580
tcattctcca aatccccgag caccgccggc tgatgctgag ccccgaggtg gtgcaggcac 8640
tgctggtgga ggagctgctg tccacagtca acagctcggc tgccgtcccc tacagggccg 8700
agtacgaagt ggaccccgag ggcctagtga tcctgggtca gtactgcgag tggaaacgtg 8760
gggttggcct catgaggttg ggggaaacaa gctgtggtgt ggcccgggga ggctgcctgc 8820
caggcctggg gtgctgtcag ggtgggcccc ccaggagagc cccccaggtg aggtagcagt 8880
gccattgcat tcaaggagcc aggaaagaag ggtgggatgg gggcatttag ggtaaatctc 8940
agacaaggct ggctccaagg gtctcctcta attttatttt cattgtattt tcttttcttt 9000
ttttttttt ttgttcttgt ttatttgttt gttcatttcc ttttatcaga agccagtgtg 9060
aaagacatag ctgcattgaa ttccacgctg ggtacgctat ttttttttcc cctccccatt 9120
ttccttttga gttggcattt gtcttgactt tgttgtgtat caggggggaca catggcttct 9180
gttgtgtgtg cagggagccc tggccaagag tcacccaggg gatgccatgg tggactcagc 9240
gatgtgtccc aagcaagtct tggagcctgt agggggagag gaggtggcga cgtgcatgcg 9300
tgtatttgtg tgtgtcttgt agacgggtgt gcatgcgttc ctgtgtgggt gtgaggatga 9360
gtcaggttta gtggtccacg aacgtgactc tcctctatca ttcacttcaa cctgcccaca 9420
agctagtttc cactgatggt agaaaatcat cttgccaatt cacggtttgt cagtcacgtt 9480
ggttttaaaa cttggtcttt tggaggtagc ggtgccattg cattcaagaa cgctccttcc 9540
ctcttttcct ttccttccca gtcaggctca tcagccctcc ctccctacct ggtgccgtat 9600
tgctagagtc accttgcatt tctccaagcg gacccacaat ctttcagctg accagcacag 9660
tcaccacgct gcacaaggca ggaggtgctg tccaagttgt agtttgtgtg agttgtgcag 9720
tgcaccaact ggctgctgga ctctatggcc cctaaattct cagattcctc ccacactatc 9780
tagtgttgtc acccagagcc aaggtggggg tgagcgtctc aacccccttct cagggaggga 9840
ggcagagttt aaatccttgt tataccttte cttaccttcc cgtcttccca tcctgctggt 9900
caaatgcttg cttctttgtt ggatggaggt gatgaggtca aagtacagtt ttcaaagagg 9960

tgaaatcatg attctcatac aaagatagag tgaccatgtg tcaaatattt atttggctga 10020
ttaatggggg aacgagtaga atggtaaaga atgcaagaaa ctgatctatt tgtctatcta 10080
tctatctatc tatctatcat ctctgttgat atctgtctgc ttgtctatct agttatctaa 10140
ctagctagct gtctattatc tatctgtctg tctctctgtc tctgtctgtc tagctagcta 10200
gctgtctgtt tatatctatc tatctatcta tctatctatc tatctatcta tctatctatc 10260
atcaatcatt aatggaaaaa gagaattgct agaataagat taccaagtta gatacaaacc 10320
tggttaaggt cctaccaggc aagaaaactc aaacctttgg agttgtcttt tctagtgaat 10380
taaaatcatt gacagcttat tacagtcttc tgaaagttaa catctacctc tacagagtct 10440
gaggttgata atctacaacc aatagtaagt cagagatatt actcctgaga gcctcagggg 10500
gacttaatca gatgatgctt ggagacagag actggctcat tgcagcctgg acaccgaatc 10560
tggtcaattg ctgcctgatt ttgtatagcc catgagccaa gaatgacata tatatatata 10620
taacagagtc tcactctgtc atccaggctg gagtgcagtg ccgcgatctt ggctcattgc 10680
aacctccacc tcccaggttc aagcaattct cctgcttcag cctcctgagt agctgggact 10740
acaggtgcct gccaccatgc ctggctaatt tgtatatttt tagaagagat gaggttttgc 10800
cgtgttggcc aggctggtct cgagctcctg acctcaggtg atccacctgc ctccacctcc 10860
caaagtgctg ggattacagg tgtgagccac cacgcctggc tccataggcc atttttcaat 10920
tattaaaaaa tataaaagtc agccaggcat ggtggctcat gcctgtaacc cagcactttg 10980
ggaggcagag gcaggcagat cacctgaggt caggagtttg agaccagcct ggccaagaag 11040
gcgaaacccc gtctcttcta aaaatataaa aattagccgg gcatggtggt gcgcacctgt 11100
agtcctaacc agtcaggagg ctgaggcagg agaatcactt gaacccggaa gatggagctt 11160
gcagtgagct gagattgtga ggttgtgcca ctgtactcca gcctgggcga cagagtgaga 11220
ctccatctca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaagaa agaaagaaag gaaaggaaaa 11280
ggtcctatgg aaagttattt tttctcctgc aatagaagtg ctatgtaata gcctcatgtt 11340
gcctcgtgcc tctgtgtccc catgttcctg gcagttgttc tgtaattatc tgtgctcagt 11400
gggtgttcgt ttcatgaatg aatgattgaa caaatgaatg aaagcatgaa tgaggagact 11460
ggttcagtgc atgtccagag cacagagtct caggggggcag agataacaac tcaaatcctt 11520
gaagtcgact ttatgagcac ttccttcatg ccaggcccca ttcctgcgct gaggacacca 11580
ggatgaccgt gtcctcaccc ctgccctcgg aggagcttta agccccatga gggagacaga 11640
cacataaaca gattctcata acaccaggtg ccagtgtgag aatagaggcc ccagaggcag 11700
tggagagagg gaattgttcg ttccaaagca gaagaggggg caaatcaaga gcctcacaca 11760
gagtcccaga tctacaggag ggaggggttg ctcctgactg ggggatcctg gaagacttca 11820
tggagggggc atcagatttg ggcatgggcc gggcgtggtg gcacaagcct gtaatcccag 11880
cactttggga ggccaagttg agcggatcac ctgaggtcag gagttcgagg ccagcctggc 11940
caacatggca aaaccccatc tctactgaaa atacaaaatt agctggtcat ggtggcccat 12000
gcctgtaatc ccagctactt gggaggctga ggcaggagaa ttgcttgaac ccaggaggtg 12060
gaggttgcag tgagccaaga ttgcaccatt gcactccagc ctgggcagca agagcaaatt 12120
ccattaaaaa aaaaattagc tggacatggt ggtgtgcacc tgtagtccta gctactcggg 12180
ggtgggggtg gggggctaag gtgggaggat cacccgagct caggaggtcg aggctgcaat 12240
gagctgttgt gatcgcatca ctgcgctcca gcctgagtga caggctgtct caacaataaa 12300
ataaaataat tttcaaaaga aaaagaaatt caggcatggg ggtaggcagg aatttgtcag 12360
ggcgagaaga agaaagggtt ccctgagcag agggaatggc aggggcaaag gctgggggag 12420
gggaacaccc aaggcgtgtt cagttaattc ctcccagccc cgagaggtgc caggctccct 12480
gaaggtgttt ctgattaaca agaggttagc acacacctct ccacggaatt cgtctcaaaa 12540
aaaaaaaaaa gggtaattat taaagtggca agagcaaaga atctgcttgg agcaagattt 12600
aaagaacaca aaaccctagg aagagccagc catctttccc cagctgctgg tggaggccct 12660
gtcccttccc taggcagaca ttgttgttct ctctctgggg aggtcagctc cccactgcag 12720
tcagcatggc caggggtcag ggagaagggg ctgagccaca ggtggcagca tcagagcaaa 12780
gtgtattcac ctccattccc ttcctggtcc tcagcactgc ccagaggagg tcataggaca 12840
gggattatta ttacatccat ttgacagaac ttggaatggc taagccactg gcccagactc 12900
agttaactac ccagaggtag tgaacatcta cctctacaga gtctgaggtt gataatctgc 12960
aaccaatagt aagtcagagt tattactcct gagagcctca gggggactta atcagacaat 13020
gattggggac agagactggc tcactgcagc ctggacaccg aatctggtcc actgctgcct 13080
gattttgtat ggcccatgag ccaagaatga catcatcaca cagctgatga gtgttggtgc 13140
taggtgggga gggtagtgcc cctccctcct tctctccagt tccctcccca tataccccct 13200
cccctggggg cccagcagat ggcactagcc tgggggggcct gccctcaggc tgaccaagct 13260
gacaggggga cttttgcttg cctgtggcct tccaaagaag acgatttaaa gcagagaaaa 13320
cagactgaaa actcaggttt tataatttca tgtcaccagg ctgcctccca catcccaggt 13380
tcattcctaa atccccactg gctcctggaa gaacaccagg cttctggcga ggtttaaatg 13440
agatactgga tgctccacgg gagagaacat gttcactggc agaccctggt gcctagatcg 13500
aacacacagt cggtgcacag tcactgtttt gaatgaatga atgaatgaat gaatgatgca 13560
ggtggtactg ctttgtaagt tctagcagtg catcagagct tacggattag atggaagagc 13620
agagactcac tggtgtgtgg ggtaggggggg tggggtatga tggtgaaaca gttgtgaagt 13680
gaggcagccg tgagatgggc taggtctgag cctcaggcgg ggccagctgc aggatgaaaa 13740

gtcacaggcc tttctcccca gccctacctg ctccgtctcc ctcacaccca cctgaggaac 13800
caggcactgc ctttattgag cccctactgt gcaaggtgct gtgctgggca ttcaaacgtg 13860
tatcatccta cagcctctgc tggcggccct gcaagggtgg tgttatcgtc ccattctata 13920
gatgaggaaa gcaaggccca ggaaagatta ggtggtggct gggcaaaccc agatgtgtct 13980
ggcccaggtc tgtgcaatgg acacaatcat tgaaagtatc tcatacagct gttgtgggca 14040
ttgagcgaga cagtgaggga aggcattcag ttcagtttct ggcctgtagc aaatgcttga 14100
taagcacctg ttttattctg atggcttcac catcattagc tcaaagctca tgtcctcccc 14160
ccagggcagc ctcccagact cctccttagg gcactccctt ctctctaccg gaagtgaagc 14220
cctcatccct tcttctcctc attgcctgtg gcctcgctgg tctccacagc agccagagga 14280
gtgtgtggtc caagccagcc catgtccagc cttgcccaac cttctgtggc tccctatggc 14340
tgcaggagaa agcagcgccc atcctcggaa tggcctgggc caggcctccc tgccttcagc 14400
ttgtcctcta gatacacgtg ccctgtgtgt acttttctca aagctgcccg gctcgcccca 14460
gcctctttgc tcacgcaggg acccccagga tgcccccagc ccacaggccg ggtttgaagc 14520
cgtcacctcc tgagctattc ttgcctgttc tgtgtctgtc tgtccccgct gtcatccatg 14580
tccccaggca gcgactggat ttttacctgg gcactgagaa ggcgtgaagc tcagtgtgtg 14640
tccattccat gagtgaatga ctgaaccaat gaacaaatgc atgaatgagg atactgacag 14700
ggaaagagaa ggatggggta gagcatgtct ggctatcccc acccggctcc cctgcccagc 14760
ccatcctgcc tggtggagga ccttgaggga cctggctccc cagggtcccc tccttctggc 14820
tcacaggaat caggggctgt gcccctctcc ccgctccagg ttgttaccgc tacagctacg 14880
tgggccaggg ccaggtcctc cggctgaagg ggcctgacca cctggcctcc agctgcctgt 14940
ggcacctgca gggccccaag gacctcatgc tcaaactccg gctggagtgg acgctggcag 15000
agtgccggga ccgactggcc atgtatgacg tggccgggcc cctggagaag aggctcatca 15060
cctcgtgagt ccctgggaag gagggcagga gggagggctg gaaaagggag tggttgatgg 15120
gggagttgaa agtcacacac agcattctta gacaagggag ggtaggacct tgggcctggg 15180
tatctgggag acaggacggc tagcttagag gggatagggg agaggaggct ggagatggtt 15240
gtgtactggg ggcgcttccc ctccgcgagc ctcagtttcc ccatctgtaa caaagccgtt 15300
gttgtagatg actcctgaag tcagctctgg gaggcaccgt ggcttgttgg gatgtttcag 15360
agtctggctg cagcctggac tttcaacctc tgggctcgtt cctaaatcct gactgcttcc 15420
tggtagaaca cccaccctct ctgcttccca ggcttctggt ggggtttaaa tgagatacta 15480
gattccccat gggaggggat gtcttcactg ccgggccctc gtgcctagac caaacgcaca 15540
gtaggtgtgc agtatctatt ttgagtgaac gaatgaatga tgtaggtggt actgctttgc 15600
aagttctagc aatgcatcag agctcacgga ttaaatgtaa gagcagagag gcttactggt 15660
gtgtggggcg ggggtgtggg gatgtgacgg ggaacccccc gtctcctagc tgcgtgccct 15720
aaggcaagtt actttgcctc ttagaacctg cttaccttgc cggatcattg gaggatttaa 15780
atcagactat ctgtgccatg atccttacac atagtgagtg cctagcactt acacgctagc 15840
cattattgtt atcattatat atgctctaac tgggactggg ccgcaaaagg cattgagtgc 15900
caggagccat ttggactttg atatttggta agtggggagc tattgaaagt tcttgagcac 15960
agaagtaggg ctttagggca taagatatgg agtggagtac agaagtgatc aggatcagag 16020
ggcaggtggt tgggggtggg gaggagggac tggaaatggc cttgacctct gggagcctgg 16080
tcctcccaca ggatggggag atgggtgtta gcctacaaag cactgcagga ggtggggaag 16140
atgctctggg ctgggcagtt ctcagcgatt gtttattgag cacttacttt gtgctgggcg 16200
tcaggctgat gcctcttctg tctcacttgg gctgtggcca gcctccaggc agatggggat 16260
gggaccagtg tgttcagatc aagcgcagtc tttgaatgtg agctggcaga ggttcttgcc 16320
acacccctcc cccagggcct ctccaagctg ctctctcctt gtcacccctc ctgctgtcct 16380
gctgggtgtg acctcgatct gcggcatgtg cgtgggctga gtttctggag ggctctggga 16440
agtgcagaga agccagacac catctgactt ccaggtccaa aaagggtggg gacacttagg 16500
ggtttcccct ggggcttctc caggtgcctc tcagcctggg aggggacctg actgccaggc 16560
ccagctctgt tcctactcac tgtggctcct ggtggctctc tcatcccaga cccttggaga 16620
agctctaaaa tgacaggtca gacaacattt ggggttctca agcttgtacc ccagacacct 16680
gctagggaat gggggtgagg gggactttgg tggtgatggg aagacagagc aggtggcccc 16740
ttgctcagtt tcaaccatgt gctttgattc tgcgttccat atttcattta taagaagggc 16800
tctgccgcta ggtaaataaa ataaaacccc ccaacaatga aagctaaagc ccccattaaa 16860
ggtgacctcc aggtctcttc catcctaata tcgtatctcc cacctcccag ggaagatgag 16920
ccggtaaggc caaaaaggac gtggctgtat gggagggtgg ggggcaccgg tgtggttggg 16980
gagacttggg tgctgcagca ggaagatcaa gctggaatgg taggaagaag ggacgagggc 17040
ctgggggggtg agggggggtgg tgcctgctac tggaggccac ctccctcccc tggcaagagg 17100
ccaggggaaa tgccccatcc ccggaccctg ggcaccaaga ccctcccagg gagacccttg 17160
gggttatgcc caccatgcct ccagctggct gcaggctgct tgggtgccat gtgtagcgat 17220
tttgaggctg tgcttggagg agctcaggta ctcgcttgcc aaggtgcctg aaatccctcc 17280
agcagcaccc cttcctcctg tcaaggccca ggtgcccacg cacagtctgc aggcagggag 17340
gctattgggt tgcccattca gagggaggtg gggccgttag tttcttataa attgacccat 17400
cagatgcgct ggactccaga gagtgttgcc attgacactg ggaagtttgg gggaggttgg 17460
tgagagggtg aaggggagct ggggaacccc tgtctgagac aggcagacca ggggcaccta 17520

catatgtggg agggtaccag ccatcacaga cagtgcctag cgcaggccta tctctgccat 17580
ggactgccgg tagggcctca gtttccctat ctggaaatca agcagctgac cccaacagtg 17640
tcaccagtct tttcagggct gacattccag atttctaaaa gcccagaagt ctaagatacg 17700
gttatttgtt ccgagcctcc caggcgccaa gctctgggca gatttctggg gcaccctggg 17760
ggtcacgaga ccacacctgc cttctccctg cctatccttg agcacagcca ggagtcgcgg 17820
tgccagaaac ggtggtccct gcagatgcca gtctagtctt cctgccaggg acgctagggg 17880
tcacagatga ttctgtagca gggtggaggg gtctggggag ggagcatggg actcgagcca 17940
gccgtcatca tcaaactgta agctccagaa gtctggggaa cctcctggcc tctctcaccc 18000
gaggagctag cctggtcctt ggagggcctt cagtctgtcc tctggggctg gggagacaca 18060
gaattctccc cacagacaca cagtggtctc tggtaggaga cccggaccca gaacccagat 18120
gtccagactc ccgtccaccc tcccccagca gccgcctgcc gccctccctg ccactcccct 18180
cccagacccc agcccagcct tgccaccttt ctgttctgcc agggtgtacg gctgcagccg 18240
ccaggagccc gtggtggagg ttctggcgtc gggggccatc atggcggtcg tctggaagaa 18300
gggcctgcac agctactacg acccccttcgt gctctccgtg cagccggtgg tcttccaggg 18360
tgagaggtca ggggtccctg gggcagggga ggggtggtgg tagaatccaa gggccctcca 18420
ctgggctcac tgctcacctt ttttgcccaa attgaggatg ggatggggag agggaagatt 18480
ctggaagctc ctgctgctct ccactcccca ccccggcccc cctcttcctt ccgtcgtttg 18540
cacttccacc cccctcttcc ccttgaccgt cctaccattc gcagtctctg tcttcctggc 18600
atcgctccct tgcttccctc ctctttctct gtccttcctt ctctctcctt ttctcttttc 18660
tgtgctgacc gcctctcctc cctcctcact cgcctggacc tgtgtccccct cccctctgcc 18720
cctcaccccc tccctgccct ctcccccttgg cacccaccgg tggctgggcc tggaacacgg 18780
gtctgtttgc agcaggacta agaactcctt ggattccgcc ctagacagtc cgcttacagc 18840
caagagggcg cagggagctt ggggaggtgt gatggcagca cagccaggcc atggccactg 18900
gtgtggcagg tctcccactg ccttcccagc ccccaccctc ctcctgcttc gggacctccc 18960
tccttgcccc cttcccagga agggcacgtc ccacccccgca tgggacagct gtcctgggcc 19020
tggaccagcc atacttctgc gcaggaggcc caaactttgc catttctgga gctcaggagg 19080
ggaggatggc agagaggagg ccatagagtg ttggcagctg cttctgcctc acctctctcc 19140
ccactcttct ccctcccact cagggtccca gccctcttct cggtttatcc ccaaactgtc 19200
tggcatagac ctgggtcccc agctggccaa actggagcgc taaatgggta gcagagctgt 19260
tcccttggga gtctgacaca ggctcgaggc gggagggaac aaagggcttt gggggccctg 19320
gcccaatgga gagatggcca gggcaggtga gcatgctcct gtcctgaccc ctggacccct 19380
cagcctctca cggtgtagcc tcaaccaagc cactcctttt ctccgaacct catcttggaa 19440
aaggggaaca gctctctctc ccccagccac caccgtgagg cctgtgcagg tgtgaatgca 19500
ttttgtaaac tggcgagtgc tgtcccgcaa atatcaataa ctaacacgga tcgagcactt 19560
actacatgcc aggctgtttg aatgtttatg tctttttaat ccactctact accctatgag 19620
gtgtgtgcta ttactgtcct cattttacag atgaggaaac tgagacccag attcacacaa 19680
tcacattcaa ccacagcaat ttgctggcag aggtggtagg ggtggtgggg ttacaagctg 19740
cgccagcctg ctgggaggtg cagccagggg acccctgtgt aacagctgct ctcctggtcc 19800
agcctgtgaa gtgaacctga cgctggacaa caggctcgac tcccagggcg tcctcagcac 19860
cccgtacttc cccagctact actcgcccca aacccactgc tcctggcacc tcacggtgag 19920
accccaccct gcctgcccac ctgccctctg ccgcaagcac actacaggtc cctggtgacc 19980
cgggatgaga gggggcagtg tcccgcctct gctgaagcgc ccacaggctg agccctgggt 20040
acacatcctg ccagggtgga gagggctgtg ggcgaggtct ccctctgtgg gtcacagcaa 20100
tgcctgtttg ttgagtgact gacagacttt agccccacct gggattctgt gtttccttct 20160
ctttgttgtt agggaggtgg gttcaccaac ctggccacac cccatgggcc acctgatggc 20220
ccgctcctcc ctcccaggtg ccctctctgg actacggctt ggccctctgg tttgatgcct 20280
atgcactgag gaggcagaag tatgatttgc cgtgcaccca gggccagtgg acgatccaga 20340
acaggaggta ccacttcctc tcctccctct ggcttccttt cctccctccc cctccctctc 20400
ttccctcctc aatagtgacc ccctcattgg aagcccaagt ccccaatctc agaggggcag 20460
caaggggagc gagcagaggc tggggctggt gtcaggcctg ttgcccttga ccttgtcctc 20520
gtcccagcct ccgccctggc cccggcttcc cctctggcta ccccagaggt ctcagacacg 20580
tttggtcatc agacaccttg gatgtttatt ctaattacag caaaattgtc tcatcttctt 20640
gggtgctgta acccccctctg gcaccctcaa tccttcaata aaatgtttcc agagccaaag 20700
gactcatggg cactttggtg ccttccctct aaacccaagg cgtaccatca gaggtgcctc 20760
tcccttatca cgaacccctg ctgcacagcc aggcccaatc ccattgcaca gggtaacatg 20820
gaaatcatgg gtgccctgga tcccccgaat ccccaacggg gcacttgccc tcttccctgc 20880
tcttgccctt gctccctctg gtaactaagt ttccgacaaa gaagtgagtc cttacagaga 20940
tgtgagcaag agacagtggg gttaggctaa gcgactaccg ttgccagggt cactatggca 21000
tgaggccagt aggtgcccac tgggcctggc caccaggaag ccatgggtgg tgccgacagc 21060
ttcagaggcc tgggctgggc aaggaggcag ggaaacagag acagggtgta tggacaggtt 21120
ttcatttgtc tgggaagaaa agagaactag gaaattcaag gaaggggaca tttaagacgg 21180
gagaggttcc atatctcaaa tgtgtggatc atcccagcat ccccagaggg agagaaggag 21240
gctcaggtgc aggtaatatt gtttagagtg gggagggtgg gcaaggggag agggaggccc 21300

tcccatggct ccattgttgg ggagcagagg tttggggaga gagaagagga atattgaagc 21360
agcgatggca gagccaggga gacccttcc ctgggaatcc ggggtgaaaa cggtcatcgt 21420
gtcagcgtca ggaaagagga gactctatcc ttcatcgcag gttgggcctc tgccctccct 21480
tccaacctcg gaattctggg ggcctaatgg gttcagagtc tagtatgaaa gatttgtcat 21540
ttcttgattt cacagagttt gaatatctaa gatgccagtc ttggaagatg ccaaaattgg 21600
aaggctctgg ggctctagaa ttcttggatt tctggggtgt gtgttcccaa tcaccaacac 21660
ttgtaatttg cttgttggct gatcctattc aaaaggatca tccagacaaa aggtgacgaa 21720
gaatgacaag gtttgcttga ctccttttg caatttatct gggactagga ttaaaagaaa 21780
ggagaagaaa tactcatggc atgatctagg gctatgctgt tgggggtaac atggggagtg 21840
actttgggcc tgtgctgttg ggggtgatat ggcgaagcag tgccttcagg gctttgcatt 21900
tggtggtgat atgctgatgg agtgtgacat caggcctgtg ctgctggggt gacatgctgg 21960
ttcagtgatg tcaggcctgt gctgtctgga gagcagaagg cttctgtagc atgatggggg 22020
cacctctggg aacggctgcc ctgacccctc atggagctca cttgaagcct ccttgctact 22080
cacctaggct ggggatggct ggcttcaccc ccgctcacag gaacccgcag ggtgaccctg 22140
agatggatcc atgattcaca gttctgcgaa tgatgagaac atgttttcct gcctccctcc 22200
ctaccgcaga gctgaacttt atgtctcagg gaggcccaca aaggagaagg aacagtcttg 22260
ggtctgacac tccctgtctc atcctcacc cccttggcga ctccatttgc cagaggcggg 22320
gccccagcat tcaggggttg tgggggggttc ggtggcctgg agttaggtgc taagacaggc 22380
gttcagtgca ttggcccaac aacttgtgtg gtcattggcg ccgttcctgt ttcccagaga 22440
aggaaatcaa ggctcagcag gattaggtgg cacgcagatg ggtccacaga tggggtctct 22500
cccatacccc caacagccac aaacagcagg ccaaaggatg ctccacccca tgcttcctgt 22560
gggaaggccc tcctccctcc ctgatgcagt tgggcaaggg tctgggtact ggggagacag 22620
ggacttcgtg agctaccctt gggtaatgac agagagagtg tggaacacgg atgggagagt 22680
cttttcccta atccaaagga atgatgcctt gatggtgaat ttgaggcact aggacagctt 22740
ccaacagggt ggagggatct cgccagagtc tgagcaccac tgagctatag aatgtgtggg 22800
ctgaactggt cctagcaccc aacctatggt acaggtgggg aaactgggac cagcgagggc 22860
taaggacttg gcctcttgtc cctgtctttt ctgcctttca gtggtggaga tgggcttcag 22920
ggtgtagcca agcggtggct gggtggtgag gatgaggcct gacagctccc tgtgccccca 22980
tagctccccc tctctctgtt cagtcctccc tcgccacacg ggggtggaag tgctcagcag 23040
gggctggcat cagggtttgc atggatccct agatgcaccc ccttccttgt ctgtgaaacg 23100
aggggttcag gccagcccag ggccccaatc tttgattgct tacccatcag gaagctattg 23160
tctcccatac aagttgtgtt tattaattcc tggccaaacg ccattccaag tcaggctggt 23220
gaggtggaaa gcgcttaagt gtcgaagcca gacaggccag ggctcagcac ctgtctcctc 23280
tgcttcctac ctgggcgagg acttacatct cccaacctca ggtaactcat ctgaaaaaag 23340
ggcgtgaaag agacccccac cctgggaaga ctaagtgaga caacgcgtgg agaacattgc 23400
acacgcgggc ttaggtcaag tgcaacaaac ctgcgttcat caccggctct cactctgctc 23460
tgggcaggca caagctgagg ggtttatggt gctggctctt tcagcctcaa caacccagcg 23520
aggaagcagg tgcctgtact gccttcacag accagtgaga cacccaagac acagagagat 23580
gaagtaattt gcacaaagtc acccagctct ttgagccaga gttaaggcca ggcagcctga 23640
tctggagtgc acgtgggtgc acagatgcat gtctgtgtgc gtgcgtacat ccatgcatgt 23700
ctgtgcacgt gtacgtgcat gtgtgtgtgg tccacgtgtg cgattcttcc ctctgagcct 23760
ctagcggccc atgccagctg gtgactccct cagccaaggc atccccagcc aacccactgg 23820
catctgggtg gggggatcga cagtttctgt ggctgtccca ccagttccag agcggcctgg 23880
gaagtcccag ccctttcttc tcagactttc attaagggtc cagggtcccc aggggcagac 23940
tcttgtcccc tccccgcaga ctcctcctgt gtgaatgaat gtggaaggga aggcagaggt 24000
ggcgcctgca aaccatccgc actgggccac tgtgccctct agttatgatc atgggcgata 24060
gtgatcatcc catgtagatg ctgagaaatt cttagaatga gcatttgttg gaaatctgct 24120
tgtgtgggtg gcaaagacat gagaggtcta gggaagagca gattttcaga caaggcactt 24180
tagggagggg gaggtacagc cctttggccc agaatgccca ttgatggaga gggcgggtca 24240
ggggagaggg tatcttaacc ctcaagtgcc agcgtagtga tgaggaaagg ctggcctggt 24300
gggcccccca tggactaagc atccttaggc acttcacctg actcctctga gactgtggtg 24360
cctccttcac ccctgacctg cctgctttct acctagcttc tcccggtgcc cacttgagcc 24420
cagctgaggc ctcaggccct tgagtggcct gggggtggta gagggacttg gcccgtgaga 24480
tctggccatg gctgctccat ttcgcagaag ccactctcac gggctgccac cgaagcacgg 24540
gcttcccccc ttccgggaac ctgcctcctg ccagcttcct ctcctgtgac atcacttctc 24600
ttgtgattcg ccccaccatt tccactcact cccagccagt ggggacaggc agaaccatgg 24660
gttccctagg ccagctggag ccacccccga cccggcctgg cctggctatg gggtggccct 24720
tgtgttctcc ggagcgctag tggccagcac aggcggcagc cacagacact tagtaggaac 24780
ttcagtgtgg ctgacctgag ctgggctggc cgtgcaggag agtgcaagct gcttcctcca 24840
tgagctcaca gcctgacgtc agcaagtgct tcaaagaagt catttcctat gcatgcctta 24900
aaccatgcca caagggagat acgatcaccc ctgttttaca aatgtgaaaa ctaaagcttg 24960
ctgagggtga cccaaggtca cacagcttgt tcctggggca aagccaggct gccaattcag 25020
ctctgcagcc ccaggtctag agctctggca atgccaggtg ctgctctcct cccctcttca 25080

gcacttgcct tctgtgaccc tccttccccc ttaatctgtc tgtaggtaag ggcacggggg 25140
tgtgcattca tccacccacg cacccttctt tccttcttcc ttcttgtgtt ctccccaccc 25200
ttccatccat ccatccatcc atccatgcat ctatccctcc aggcagtaca tcctgacagg 25260
gtccctgtct acctcctgga tgaggcaaga aggaaatatt ccccatatcc agagaggtga 25320
ggaagcaagg caggccacac ggtgcaaaaa tgtgccttca gacactcagt actttgtagc 25380
caagatgaac tggcaggcat cgcagcagtc aggcttctgg tgcttcttgg agagggctag 25440
aggggagcac ttgttggacg ggaggcactg gagagccaga gaatgtgcac cctcccccag 25500
agagttctgc agcagaaaca gaaaactcag atgggccaag gggccaggcc agggctagag 25560
tctatgatgg ggggtagggt agtccagtgg tgttttcggg gcttttcttt ctttctctct 25620
ttctctttct ttctttcttt ctttctttct ttctttcttt ctttcttttt ctttctttct 25680
ttctcttttt ctccttctcc ttctccttct tcctcttctt tctctttctt ctttcttctt 25740
ccttattctc cttttccctt cttctccctt cctcttctcc ttcttctcct tctcttcctt 25800
ctcctcctcc tctttcttct tcttctcctt ctcctcttcc tcctcctcct tcttcttctc 25860
ctcctccttc tcctcattct ctttctcctt tcttcctctt catcttttct tcttcttctc 25920
ctccgcctcc tccttcctct tcctcttcct cttcctcttc tccttctaaa ggagcaggaa 25980
tctggattat tatgtgaaat tagctcgcga ctcaatgaag caatttctac atggtgcata 26040
aacagattgt ctttacgctg agtgactccg cttgggccac tagatttcag ccgctgcctt 26100
gaattcctct ctggcgcttt ctaagcagac gcttgttcca gggattccac cacctctacc 26160
cgtgctccag gcctccagag tgagaaccaa acactgccca gacagacagg ttcccgggta 26220
cacggtgagg ccctggggaa aggttgctgc cagctacaga ctggttctag gactctccct 26280
ggaggttgag agaacttcct gtagcaggca caggtgtctt tgccttacag cccctgccca 26340
aggcttgggt gacactacag gtcctcaacg cagttgcttc tagggtgaaa cgttccactc 26400
ccctccaacc ccggcttggg ttccttctct gtctccccac aatctccctg tgactgtggg 26460
aagggacacc ccaaggccca tgggatgcgc ttgactcctc attccccgca ctagtccttc 26520
ccaacccctg gctcccctgt ctacttcctg aggtccttct gtgaggaaaa caatccatga 26580
taactttata gacaaacaga caccaaaacc tgcgtttcct gggttttaca agagcaagag 26640
ggccaggctt gctcaggggc gccccctggc ggtgcctcgt ccccaccgg ccctgctggg 26700
ctgggggaac catggtcggg ggtggcggct cccaacctgt tctgcctcag gacccagtca 26760
ctctccgcaa aatgactgag taccctaaag agtttttgct tatacaggtt atagatctat 26820
acttgcagca ttagaaattg aaacaaaatt ttaaaatgtt tattaattct tttaatataa 26880
ttataagccc attacacatt tgaatataaa taacattcta tgaaaattag ttgcatcctc 26940
caaaagtaaa aacatttagt gacaagagtg ctgtcatttt acatttttgt acatttcttt 27000
aacaactggc ttcacagact acaggcggga ccttcgaatc tgcctccgag ttcaatcagt 27060
cccgatgtca cacatcagtc tctggaaaac tcgcctgtca ccttatgaga gaatgagggc 27120
aaaaaaggca aatgatatct gagtgttact ataaacatga cttttggacc cccaggggtc 27180
ccctgactgt gctttgagaa ctgctggttg gtgtaagggt aagatcgtgg tcactgtggc 27240
cagatagact taggggggtg ccagagtcta ggccaggcgt gtggaggaca tggggcatgt 27300
aggggggctca gacctcagag ctcctgttgc agtgggaatt cggagccctc ccctcaagca 27360
agctaggtga gctcttctgg gtcctgaggc aagattctgg ctccaccttg gctcctgcac 27420
tcttgagcct catctgtaaa atgggatgag agcaattcct ccctccctgg gtggaggtgc 27480
tgcttgaacc tcagaatccc cgtgcaatga ggccttgtga tgccatagcc aatgaggctc 27540
agccccagcc acacacctgg agatgttaaa acagcctcaa agctcatctt cagctgttcg 27600
gtggctaagg aattgattaa cttattgaac ggttaagtgc ttaccacatt ctagaagttc 27660
tggggaagtg cctggccctt gggaatcatg gccggctccg cagggtgttg gatttgctgt 27720
gggatgtccc cactggcctt caggggcatt cctgatgctc tctggatttc catctgcttt 27780
ctctgccagg ggcatttca gctctccctg cagattttca acctgcaccc tgagtgtgtt 27840
tcccccatct gcaaagcact ctgatttgct ctgtggaggg catttctatg agctgatgaa 27900
gctgtcccca tctgttctgc aagggtgtcc cacctgggat gaaaaggaac ccccggctgc 27960
tgtggaggga gggtcccact gtcctggggg agtggctgca cccactctgt gaagtcatgc 28020
cgctgcccac ttgctctgtg gggtgaggtg caccggactc tctgcaggag gaacccctgg 28080
gcccatgccc tggagatggg agggctccta cctgttctct ggtaggagag aaagactcag 28140
cctctctgga gattccccca cctgctctgt ttgaacaacg gtatcttctt ggtggtggta 28200
tggcaggggt gcaggggcgg tgttgtccag cagggatgtg agggtgctcc cacagctggg 28260
ggtggtccca ccccgtgtgg ccatgcacag agaaggtgct gcccatcagc actaagctac 28320
tggtcatggg agaaggactg gtccttccct caagcccaca gtgtcacagg gaggcaggag 28380
ggttggtgcc taaatgggga gcactgctgc cccctcgtcc cacaccaagc tcaaggcaga 28440
tgaccgtgca catctgtgga cagtggggca gtcaagggct tttgcctcaa ctgacacatt 28500
gaagcctttt gtcagattca agatcaacag aaataatttt tcctttcttt ctttctcttt 28560
ctttctttcc ttttctcttt tctttccctc cctctctccc tttctttctt tctctttctc 28620
tttcttcttt ctttctttct tcctttcttt ctctttcttt ctttcttttt ccctccctcc 28680
cttccttcct tctttccctc cctccttcct tcctaccttc tgtctctttc tttctttttt 28740
tgacgtactt tcgttcttat tgcccaggct ggagtgcaat ggcacgatct cggctcaccg 28800
caacctctgc ttcctgggtt caagcgattc tcctgcttca gcctcccgag tagctgggat 28860

tacaagcatg tgccaccatg cctggctaat tttgtatttt tagtagcaac ggggtttctc 28920
catgttggtc agtctggtct cgaactcccg acttcaggtg atccacccac ctcagcctcc 28980
caaagtgctg ggattatagg tgtgagccac tgcgcccagc caatttttct tgttttataa 29040
gggaggaagg tgaggctcaa agaaggaccc tgacttgcta gaacctcaca gttcacaggt 29100
gactgtgact agaattgagt tttttatctg gcaggcaatg gggagccatt gaagattttt 29160
gagcagggca gtggcatagc caggctagtt tctagaagat gactctgggg gtgcactcat 29220
ctaagggaga aatcagggca gaggaggcac agcgggcgtg cagctccccc tgcccctctg 29280
gctgcctgtc cttgctctgt ctgtgcacgg gacccaggag accagccagt gcagccctga 29340
gtcgtctctg actccccccа ggctgtgtgg cttgcgcatc ctgcagccct acgccgagag 29400
gatccccgtg gtggccacgg ccgggatcac catcaacttc acctcccaga tctccctcac 29460
cgggcccggt gtgcgggtgc actatggctt gtacaaccag tcggaccgtg agtatgggca 29520
gccgggggaa ccccctgcag tgactcgctg cctcttggcc atccctggaa ccaccaaggg 29580
ggctgtgggc agctgcttat gaggctgaac aaaaggagag agagagtgtg tgtgtgtgtg 29640
tatgtgcttg cacaaattta tgcagctttg tgtgcccacg tgtgcaaggc agccacaagg 29700
gtttgcagga atacacactc atacatatcc acgtgtgtgt tgtgtattct gtgtgtgtgt 29760
ctggatatgt atgtctgctt ggactgtgta cacaggtgcc caggaccacg tctgtgggtg 29820
cctgtccatg cgcgtgtgag tgaacaggtg catgcgtgtc tttgtgcgcc ttcgcggcta 29880
cgcatggcct aatggcgccc tgcctgcctc cacggtcccc tgtggttttg cagcctgccc 29940
tggagagttc ctctgttctg tgaatggact ctgtgtccct gcctgtgatg gggtcaagga 30000
ctgccccaac ggcctggatg agagaaactg cggtgagtaa cccgcccgcg catccctcct 30060
ctccctgccc atcccttctc cttcctcacc tttcctgctc tgagctgagt ggagacccca 30120
cttctacatg cagcttccat tatgagcacc caggaagtgg ggttctctca ctgtgccggg 30180
gtggcaaaat gagacagacc agcaatgcag cctccccgag accacctcgt gggacagtgg 30240
cagggagaag tggggagcca ggtctcctga cttccagctc agggccatca cccccagccc 30300
ctgtcccagc cagccttcca ggaaggaaca gaatgggtga gggagatgtc cccctcctct 30360
gccctgtcaa aggtttaaat atgtgggaag agggaagcga gatgttcatg gtggggggat 30420
gatcctgcca cggtgctggg ggaggtacct catattcaga aactgaacat ctggcttcaa 30480
gttctggctc agccaagtga ccttggacaa gtcacctcat ctgtttccac cagtgaaatg 30540
gggtatctca cagggttgct gtgaaacttt gggtgtaaaa tagcagagaa agaggccggg 30600
cgcagtggct catgcctgta atcctagcac tttgggaggc ggagtcgagc ggatcacctg 30660
aggtcaggag ttcaagatca gcctggccaa catggtgaaa ccccgtctct actaaaaata 30720
caataattag ctgggcgtgg tagcaggagc ctgtaattaa tctcagctac tcgggagtct 30780
gaggcaggag aatcgcttgg acctgggagg ttgcagtgag atcatgccat cgcactccag 30840
ccttcgtgac aagagcgaga cataaaaata aagtagcaga gaaagagatt tgtgattggt 30900
aacgtgcaat acagcacacc ttctacaggc atcgccaagc cccggctggc tcctctggct 30960
tcctcccacc tgtcccctct ctgtgtcccc acacagtttg cagagccaca ttccagtgca 31020
aagaggacag cacatgcatc tcactgccca aggtctgtga tgggcagcct gattgtctca 31080
acggcagcga cgaagagcag tgccaggaag gtagggcagg cctagccgag tgtctggagg 31140
gacaccaaag gcagtctagg cctgctacat gcttcagcaa aagtttctag cttctcctct 31200
caacacccac caacccctct gtatttacat ctgtatgtct gtccattcat ccatccatcc 31260
atccatccat ccatccatcc atccatccat ccatcttctg gtctccaatc accgtctgtc 31320
cattgattca tacagctacc catttatcta tgcatctact gacctgtgca accatcaatc 31380
tccctatcat caaactgtca atctacccat ttattggttt ggctgactac tggtctatat 31440
ggccactgtt ccatccatcc atccatccat ccatccatcc acccacccat ctacccaccc 31500
acccatccac ccatccatca tccatccgtc catcatccat ccatccatca tccgtctatc 31560
catccatcca tccatccatc atccatccat ccacccatcg tccatccgtc catcatccat 31620
ccatccatcc atcatccatc catcatccat ctatccatcc atcatccttc cacccatccg 31680
tcatccaccc atcgatcatc catctgtcca tcatccatcc atacatcatc catctatcca 31740
tccatccatt catccatcca tcatccatgc atcatccatc catcatccat ccatccatcc 31800
atcatccgtc tatccatcca tccatcatcc atccatccat ccatcatcca tccgtccatc 31860
atccatccat ccatcatcca tctatccatc catccatccg tccatcatcc atccatccat 31920
catccatcca tcatccatcc gtccatcacc catccatcca tcatccatcc atccatcatc 31980
catccatcca tcatccatcc gtccatcatc catccatcca tcgtccatca tccatccatc 32040
catccatcat ccatccatcc atcatccatc catccatcca tcatccatcc attcatccat 32100
catccatcca ttcatccatc atccatctgt ccatcgtcta tccatccatc atccatcatc 32160
catccatcca tccatccatc catccatcat ccatccatcc atcatccatc aatccatcaa 32220
tccatcatcc atccatccat catccatcga tccatcatcc atccatccat gcacccatcc 32280
atcatccatc catccatcca tcatccatcc attcatccat catccatcca tccatcatcc 32340
atccatccat catccatcca tccatgcaac catccatcat ccatccatcc atcatccatc 32400
catccatcat ccatccatcc atccatcatc catccatcca ttcatccatc atccatccat 32460
ccatcatccg ttcatccatc atccatccat tcacccatca tccatccatc catcatccat 32520
ccatcatccg tccatccatc atctgtccat catccatcca tccatcatcc atccaaccat 32580
ccatcatcca tccatccacc atccatccat tcatccgtca gccatccatc catccatgca 32640

cccatccatc atccatccat ccatccatcc atcatccatc catcatccat ccatcatcca 32700
cccatccatc atccatccat ccatctaccc atccatccac ccatccatcc acccatccac 32760
tgatctccct agccccctgt ctgtccactg gtccttatat ccacacgttt atccaacctt 32820
ctagctgtct gtcagtctcc ctaatggacc accactccac ccattggctt gtctgctcag 32880
tcttctgtct gggtctattt atccatccat ccatctaccc atccaactga ccaactgacc 32940
aacacttgca ggctacccag cgataggcaa ggtgcagtaa ggaagtgaga ataaaacagc 33000
agagatgcag gccctgcctt ccaaggctca tctgttagta ggaggatatg atgggtgact 33060
ctcctgcctt gtaggaagat tggagggcag ggaggaggtc agacatgaaa agcttcctgg 33120
aggaggtagg tgtttggccc ttggtgagag ctaaaactta aataggcagg aggaaaggag 33180
agaggcaaag accaagtggt ggagtggaaa gttctttaca gtgaagagca gggaggaaaa 33240
tgtggacaac cgggcagggc cagagcctgg gagattgcca ggctaggtgc ggaccctggt 33300
ctaaaagtgg aggcacagtt ctgccttcaa gttccacact ggaggggggag gcatgatctt 33360
gtggtcagga tctccagtct gagaatggag acaccacttt gtgctcaata ggccagtctg 33420
agtggagggg ctgtgggggg cgggggggaca tggcctgctt ttaggagacc ctaaaggaga 33480
ctcaggaaaa gactctctag tcacctcctg gctcttctgg ctccatcgtt cctgcacccc 33540
actttggaag gtttccttgg ggctcagaga cccaccttct gtgccctgcc cccatcccct 33600
ctgtcccagg ggtgccatgt gggacattca ccttccagtg tgaggaccgg agctgcgtga 33660
agaagcccaa cccgcagtgt gatgggcggc ccgactgcag ggacggctcg gatgaggagc 33720
actgtggtga gccctgcctg gctgccgggg ccctggagct tgggagggag ggggtgccca 33780
cagcaggaag ctggagggaa atctcactgt tgtcccctgg tctctctcta tctcatcctc 33840
tgcccccttg cctgggtcct gatggtctct ccccctccat cattctcctg ttctctgtct 33900
ctccatctct ttcctttgcc cttcctctct gtctgcttct ccccttcccc tcctcctctg 33960
tccaccccac cacctgcccc catccccaga ctgtggcctc cagggcccct ccagccgcat 34020
tgttggtgga gctgtgtcct ccgagggtga gtggccatgg caggccagcc tccaggttcg 34080
gggtcgacac atctgtgggg gggccctcat cgctgaccgc tgggtgataa cagctgccca 34140
ctgcttccag gaggacaggt gagcgggagg gtgtgggggc ctaggcagta agagacaagg 34200
gcagggaagg cccggtggga ggtgcactgt gtctgagctc tttgcagata gagggaaggg 34260
tggtggaccc cccagacagg ctactgtgat gtgagttcta gtcctggctc caccaggacc 34320
ttctgggtcc ccggacacat tgttccacct ctctgccatc tacttttggt atcttgcttt 34380
aagttgggcc agtaattcat tcattcatct cattcactca ttcagcaaca cttgtgctcc 34440
tactatgtgc cagggctgtg ctagatgctg gggattcagt aaaggacaga actgcccaac 34500
ctggtcataa gctatgacac tccccgaggt gtgacacgag gtagcaggtg gggctgggga 34560
gcccccaggg gacatctcat caggcctcat ggccatcttt cccatctgct tggtgggctg 34620
aaacctcccc caatccaccc ccagacagat ctgggctcca gatcccgccc ccaggccctg 34680
cacagggatc ccctttgta tcctctctgg gacgcagggc gctctgacca cctagctctc 34740
tttaacccca tctcaggctc cccactgccc tcaggtagag ggtagagacc cgaaggctgc 34800
ccatctgcca cccaggcagc tgactgccgc agtccaattc ctccacgctc aactcccacc 34860
cgctccccac taggacccac cagcctcagg gaattcagag cagcctgggt ctgtaaagca 34920
cacaggaaaa aagaaatctg tgtcgggggc ctggcactgt gctacatttt ttagatacac 34980
ggtcttattg gattctctca agaacattcg agtagaaaat gccattccca tttgcagatg 35040
aggtggcaga ggcttagaga ggcacaccca tgtctaggga gggatgaagc tggggcgtgg 35100
aacccaggca ggccgagtgg gtgaaggctg aacgctgtac caccagctag gcgaccttca 35160
gggagggaag ggagggctgg gtgtggaggg cactgtcccg ggcggggatc tggctatctt 35220
gagggtccct ggatggggag aggcagcttc ctcccacctc acctcacccc accccacccc 35280
accccacccc accccagcat ggcctccacg gtgctgtgga ccgtgttcct gggcaaggtg 35340
tggcagaact cgcgctggcc tggagaggtg tccttcaagg tgagccgcct gctcctgcac 35400
ccgtaccacg aagaggacag ccatgactac gacgtggcgc tgctgcagct cgaccacccg 35460
gtggtgcgct cggccgccgt gcgccccgtc tgcctgcccg cgcgctccca cttcttcgag 35520
cccggcctgc actgctggat tacgggctgg ggcgccttgc gcgagggcgg tgagcagcgg 35580
ggacttgcgg cgggaggcgg agggagaccg tgcggatctg cgccgtaaca cctggcctgg 35640
agaagggcgg ggctgggggt cccggggctc caccccatag gccctctagt gctgggattc 35700
aaattgggct gaattttacg gtagaaaacc accatttaat gcggcctgta ggccccctgcc 35760
cctcccctcc tagctcttcc cttccttctg gaagggcgtt atgtgtgggg caaaggggca 35820
ggtctgggac gccactgccc acgtgcaagc tccacctgct gttccttggg ctgcaagggt 35880
ggaaggctct taattactag cactttccac atccaggctg gattttaggg gaacttgact 35940
tcatataatc cacccaacag ccctacgggc ggatgctgtg gccctatttt atggatggag 36000
aaaccaaggc tcagagacat gttgctgtaa gtcacacagc cagagaggac tggagcaaag 36060
attagaaccc agggctggct gcctccagag cccctgctct tcctgctact gctctcagaa 36120
acagggtctc tcccctttct acgttcactg accagagtcc ctggcggcca ccgcacagtt 36180
ttggggacac agacccagct ggcaaaccta cagacatgcc ctgcagcgtt agtgttggtg 36240
gcttcaaaaa tgtgtacagt gacttacaat ctggaagcag gcggggccgc agagatattt 36300
taaggatggg gaaactgagg ctcagaggaa cagtgactta cccaagggga tggcagtggt 36360
catggcaaag caaaggctgg ttcattcact attccttcac tcattcagtc actcaatgac 36420

actttctgag caccaagtac gtaccaggcg tggggttagg ggaagggtac ataaggatga 36480
agagagaaca ttctcggggg agacagacag tggtaagagc tgacatggat ggggagatgc 36540
aggaacagtg gagacacaga ggaggctcct gcccagctag ggtcagggga ggcttccagg 36600
ggagggttgt ttaagctgag gcctggaaga tgagttggca acattcagac aaaggggaaa 36660
gacattcagg tgaagacaca ggtgccaaga caggaagatg tgagaacatc cgcagcctgc 36720
cagaggggct gaggtggggg gcaggcgtgc ctgggcgagg agcaaccaga atggcagaca 36780
gggccttggg cgaggagcaa ccagaatggc agacagggcc ttgccggcca gcataaggat 36840
cttaggccag gagttctccc tcctacctgc accttagaac catacgggga gtttcaagaa 36900
aaactgcgta tcaaggctcc ccgggggact gtgatatgca gccctcgtgg agaagcgcta 36960
gggcagactg cagagttggg gcactgcaga gttctaagga aaccatgaag ggatcagatg 37020
tgggcttcgg agacatctgc aggtgctgta acagagcagc gaggagccag ccagagccca 37080
gaggtgcctc agcagacaga ggtgggggac aagaagctgg aggaagacac tcatccacac 37140
gggctttttt ctttttcttt ttttttgttt ttttgagaca gagtttcgct cttgttgccc 37200
aggctggagt gcaatggcgc gatctcggct cggatccccc tcctcccggg ttcaagcggt 37260
tctcctgcct cagcctcctg agtaactggg attacaggca tgtgccacca cacccagcta 37320
attttgtatt tttagtacag acagggtttc tccatgttgg tcaagctggt ctcaaactct 37380
tgacctcagg tgttccgtcc gcctcagcct cccaaagtgc tgggattaca ggcatgagcc 37440
accgtgcccg gccctccaca tgggctttgg tcgggggctg tcaccatgaa ccccacagag 37500
aaagagctag aataaagtga cagggaggca gaggggcagg tgcgacccta gcaggggtaa 37560
gggtgggcag agcaggagag aagtaggctc ctgagatgca aagggaataa tgttagggag 37620
aatagagaac aggggctcca ggctcctgag atctcacttc tgcccttgac cacggacagg 37680
ccccatcagc aacgctctgc agaaagtgga tgtgcagttg atcccacagg acctgtgcag 37740
cgaggtctat cgctaccagg tgacgccacg catgctgtgt gccggctacc gcaagggcaa 37800
gaaggatgcc tgtcaggtga gtcccccggg catgggaggg agagaggagg gagaaaggat 37860
gctgcccaca tcaccagggt ctggcccttt gctcacatca gcctgctgaa gcctcccatc 37920
ctcccagcaa ggtggtgatg gccaccccta ctttacagaa gaggagactg gggcttagaa 37980
aggttgagga gcttgcccaa ggttgcagag ccacagatca gaagagatgc tgtgatgggc 38040
aggtgttagg ctcaaaccca gttctgctcc ttgcccacca caaggcacta ggcccagggt 38100
cccacagtga ggtggatgca tggaagaaga aaggggtgtc agccacagaa gggaggcgga 38160
ggcagagtgg gggcgtgggg acacagccac agttccagga ggtcccaggc tggctggagg 38220
ccggggaggg ctggcttggg ctctctccat ttagcaggcg aggggaaagc agagctttaa 38280
gactgaacgt gactctggca cccagtcaat tcccaacagt caggacttaa tccctatggc 38340
tcttcacctg gaaaaggggg tgcccttacc ctgcttcagt cctttctcct ttcccccttt 38400
cagggtgact caggtggtcc gctggtgtgc aaggcactca gtggccgctg gttcctggcg 38460
gggctggtca gctggggcct gggctgtggc cggcctaact acttcggcgt ctacacccgc 38520
atcacaggtg tgatcagctg gatccagcaa gtggtgacct gaggaactgc ccccctgcaa 38580
agcagggccc acctcctgga ctcagagagc ccagggcaac tgccaagcag ggggacaagt 38640
attctggcgg ggggtggggg agagagcagg ccctgtggtg gcaggaggtg gcatcttgtc 38700
tcgtccctga tgtctgctcc agtgatggca ggaggatgga gaagtgccag cagctggggg 38760
tcaagacgtc ccctgaggac ccaggcccac acccagccct tctgcctccc aattctctct 38820
cctccgtccc cttcctccac tgctgcctaa tgcaaggcag tggctcagca gcaagaatgc 38880
tggttctaca tcccgaggag tgtctgaggt gcgccccact ctgtacagag gctgtttggg 38940
cagccttgcc tccagagagc agattccagc ttcggaagcc cctggtctaa cttgggatct 39000
gggaatggaa ggtgctccca tcggagggga ccctcagagc cctggagact gccaggtggg 39060
cctgctgcca ctgtaagcca aaaggtgggg aagtcctgac tccagggtcc ttgccccacc 39120
cctgcctgcc acctgggccc tcacagccca gaccctcact gggaggtgag ctcagctgcc 39180
ctttggaata aagctgcctg atccaagccc cgctgctgga gtttgaatgg gacccaggca 39240
ccagcctcat gcccttgact ggagcagccc ctgcttcctg ctcagcctgt ttgacaagtg 39300
tccagaaggc caaggtgggc tcagtggcag tgggcgtggc cactgagggc tggggcctgc 39360
agggcagctg cccaggtccc agaagaaatg ccaggaaggc aatcatttgg ggaccctcag 39420
gtcagaggga tgtgaggagc aatcgtctcc ttttggaacc ttaggaggaa actgaggctc 39480
agagaggcgg ttaagacatc ctcatagtgg cactgggggt taggagtgga ggtggcatag 39540
actcctgtct cccagctccc tgtctgccaa ggccccgtcc agtgcgacac tcccttcctt 39600
tgcattcttt gagccactga ataaagcctt gggctccaac catgtgccag cactatgctg 39660
gggccacagg ggtgaaggac ctggctcctg accccaggag cagtggggat gatccagtgg 39720
gaaggggccg gaggggagcg tggactgggc aagtcaaggc aagctgcctg gaggctgtga 39780
gacttgagct ggggttcaga ggtggtccag gtgggaatat ccgggaagga tattccaggc 39840
agggaagagc acgtgcaaag gcacagtccc ggaagaatga ggcacgctag gacccagcaa 39900
gccgagtgag tgttagaaca gagctcgaga ggatgactca agaattcaga ggggcgaact 39960
gaggcgggat agcagagcct ggggttgagc caaggatttg atcttgaaag ctctggggag 40020
ccacggtggg ctctatagca taggagtgac atgagaggat tcacattttg gaaccagcct 40080
tggcaccagt gtgcagggag cggcaggcag ggaggctggt taggaggcca ccgcaggatt 40140
ccaggatgga gaggatgggc cgggactgag cagcgccatg ggatggactg gaggatgatt 40200

ttagacccct ggggggcagtt gtgatggagg caggggggctc gctggaggtg agggtggacg 40260
gtcaagtgtg gacaactctt tctagacgcc taactgggag cggaagggag agagggagct 40320
tcagaggggc cccagactga agaggggttt ttccaacatg ggcgctgctg ccaggtctgt 40380
gggtgaatga ggcagaaggg gaaccaggga cggggagcac ccacctgggt cctgccagga 40440
cgagccggag cagctgggtg ggcagggagc gtctccagag caggtgggca gaacacatgc 40500
agaatacctt gggtgatctg gaatcaccct gggccctacc tcagtcttca tcggaatcct 40560
ggagggcggg ggacgtgtca tctgttctcc taacaagcct cctggtgact cttttgcaag 40620
gatagttgga ccctaaaaat gagtccagct ttggagtgga gtgtcctcag gggaagtggc 40680
gaggccctcc aggcttgagc tggcaagagg gtgcccccgc cccagcctgt ggaaggcctg 40740
cgccttaggg gctcactgcc cggcaggatt tcctcgagca gcggggagga ctgaggagtt 40800
gaaggaactg gccagggtgg gtggagggtc tggggtctgg gctgggtcca gcagggtcag 40860
agaagggaga gggcggggtg tttatatttc ctaggatttt gggcagaggg gtggcagcaa 40920
tagggaggga tggcggtggc ccaggtgtca gagtagaagt ggaggggggcg cgctgagagg 40980
tttaggatgt ggcagaggca gcccagggct ctccctagag ttctgttttc tggctcccgg 41040
ccaggtaggg caggtgctct ggtatccggc cccagggcaa aggatatagc cagttcccca 41100
agccctccct gcaacacaca caggaaaatg acaacagggc agcgtccctg ggcttttggg 41160
acaaagccgc gttcctttgg accagactac cacaccttta gtttagcccc gtccccaaaa 41220
gtggcccaga gaaagagggc aacagccagg c 41251

<210> 4
<211> 2691
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 4

ggacaaacag aggctcctga ggcctgtgtg caggcccggc acctatctgc cactcccaaa 60
ggatgcccgt ggccgaggcc ccccaggtgg ctggcgggca gggggacgga ggtgatggcg 120
aggaagcgga gccagagggg atgttcaagg cctgtgagga ctccaagaga aaagcccggg 180
gctacctccg cctggtgccc ctgtttgtgc tgctggccct gctcgtgctg gcttcggcgg 240
gggtgctact ctggtatttc ctagggtaca aggcggaggt gatggtcagc caggtgtact 300
caggcagtct gcgtgtactc aatcgccact tctcccagga tcttacccgc cgggaatcta 360
gtgccttccg cagtgaaacc gccaaagccc agaagatgct caaggagctc atcaccagca 420
cccgcctggg aacttactac aactccagct ccgtctattc ctttggggag ggacccctca 480
cctgcttctt ctggttcatt ctccaaatcc ccgagcaccg ccggctgatg ctgagccccg 540
aggtggtgca ggcactgctg gtggaggagc tgctgtccac agtcaacagc tcggctgccg 600
tcccctacag ggccgagtac gaagtggacc ccgagggcct agtgatcctg gaagccagtg 660
tgaaagacat agctgcattg aattccacgc tgggttgtta ccgctacagc tacgtgggcc 720
agggccaggt cctccggctg aaggggcctg accacctggc ctccagctgc ctgtggcacc 780
tgcagggccc caaggacctc atgctcaaac tccggctgga gtggacgctg gcagagtgcc 840
gggaccgact ggccatgtat gacgtggccg ggcccctgga gaagaggctc atcacctcgg 900
tgtacggctg cagccgccag gagcccgtgg tggaggttct ggcgtcgggg gccatcatgg 960
cggtcgtctg gaagaagggc ctgcacagct actacgaccc cttcgtgctc tccgtgcagc 1020
cggtggtctt ccaggcctgt gaagtgaacc tgacgctgga caacaggctc gactcccagg 1080
gcgtcctcag caccccgtac ttccccagct actactcgcc ccaaacccac tgctcctggc 1140
acctcacggt gccctctctg gactacggct tggccctctg gtttgatgcc tatgcactga 1200
ggaggcagaa gtatgatttg ccgtgcaccc agggccagtg gacgatccag aacaggaggc 1260
tgtgtggctt gcgcatcctg cagccctacg ccgagaggat ccccgtggtg gccacggccg 1320
ggatcaccat caacttcacc tcccagatct ccctcaccgg gcccggtgtg cgggtgcact 1380
atggcttgta caaccagtcg gacccctgcc ctggagagtt cctctgttct gtgaatggac 1440
tctgtgtccc tgcctgtgat ggggtcaagg actgccccaa cggcctggat gagagaaact 1500
gcgtttgcag agccacattc cagtgcaaag aggacagcac atgcatctca ctgcccaagg 1560
tctgtgatgg gcagcctgat tgtctcaacg gcagcgacga agagcagtgc caggaagggg 1620
tgccatgtgg gacattcacc ttccagtgtg aggaccggag ctgcgtgaag aagcccaacc 1680
cgcagtgtga tgggcggccc gactgcaggg acggctcgga tgaggagcac tgtgactgtg 1740
gcctccaggg cccctccagc cgcattgttg gtggagctgt gtcctccgag ggtgagtggc 1800
catggcaggc cagcctccag gttcggggtc gacacatctg tgggggggcc ctcatcgctg 1860
accgctgggt gataacagct gcccactgct tccaggagga cagcatggcc tccacggtgc 1920
tgtggaccgt gttcctgggc aaggtgtggc agaactcgcg ctggcctgga gaggtgtcct 1980
tcaaggtgag ccgcctgctc ctgcacccgt accacgaaga ggacagccat gactacgacg 2040
tggcgctgct gcagctcgac cacccggtgg tgcgctcggc cgccgtgcgc cccgtctgcc 2100
tgcccgcgcg ctcccacttc ttcgagcccg gcctgcactg ctggattacg ggctggggcg 2160
ccttgcgcga gggcgcccta cgggcggatg ctgtggccct attttatgga tggagaaacc 2220
aaggctcaga gacatgttgc tgccccatca gcaacgctct gcagaaagtg gatgtgcagt 2280

tgatcccaca ggacctgtgc agcgaggtct atcgctacca ggtgacgcca cgcatgctgt 2340
gtgccggcta ccgcaagggc aagaaggatg cctgtcaggg tgactcaggt ggtccgctgg 2400
tgtgcaaggc actcagtggc cgctggttcc tggcggggct ggtcagctgg ggcctgggct 2460
gtggccggcc taactacttc ggcgtctaca cccgcatcac aggtgtgatc agctggatcc 2520
agcaagtggt gacctgagga actgcccccc tgcaaagcag ggcccacctc ctggactcag 2580
agagcccagg gcaactgcca agcaggggga caagtattct ggcggggggt gggggagaga 2640
gcaggccctg tggtggcagg aggtggcatc ttgtctcgtc cctgatgtct g 2691

<210> 5
<211> 1732
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 5

gttcttgagc cagacccagt ccagctctgg tgcctgccct ctggtgcgag ctgacctgag 60
atgcacttcc ctcctctgtg agctgtctcg gcacccactt gcagtcactg ccgcctgatg 120
ttgttactct tccactccaa aaggatgccc gtggccgagg ccccccaggt ggctggcggg 180
caggggggacg gaggtgatgg cgaggaagcg gagccagagg ggatgttcaa ggcctgtgag 240
gactccaaga gaaaagcccg gggctacctc cgcctggtgc ccctgtttgt gctgctggcc 300
ctgctcgtgc tggcttcggc gggggtgcta ctctggtatt tcctagggta caaggcggag 360
gtgatggtca gccaggtgta ctcaggcagt ctgcgtgtac tcaatcgcca cttctcccag 420
gatcttaccc gccgggaatc tagtgccttc cgcagtgaaa ccgccaaagc ccagaagatg 480
ctcaaggagc tcatcaccag cacccgcctg ggaacttact acaactccag ctccgtctat 540
tcctttgggg agggacccct cacctgcttc ttctggttca ttctccaaat ccccgagcac 600
cgccggctga tgctgagccc cgaggtggtg caggcactgc tggtggagga gctgctgtcc 660
acagtcaaca gctcggctgc cgtcccctac agggccgagt acgaagtgga ccccgagggc 720
ctagtgatcc tggaagccag tgtgaaagac atagctgcat tgaattccac gctgggttgt 780
taccgctaca gctacgtggg ccagggccag gtcctccggc tgaaggggcc tgaccacctg 840
gcctccagct gcctgtggca cctgcagggc cccaaggacc tcatgctcaa actccggctg 900
gagtggacgc tggcagagtg ccgggaccga ctggccatgt atgacgtggc cgggcccctg 960
gagaagaggc tcatcacctc ggtgtacggc tgcagccgcc aggagcccgt ggtggaggtt 1020
ctggcgtcgg gggccatcat ggcggtcgtc tggaagaagg gcctgcacag ctactacgac 1080
cccttcgtgc tctccgtgca gccggtggtc ttccaggcct gtgaagtgaa cctgacgctg 1140
gacaacaggc tcgactccca gggcgtcctc agcaccccgt acttccccag ctactactcg 1200
ccccaaaccc actgctcctg gcacctcacg gtgccctctc tggactacgg cttggccctc 1260
tggtttgatg cctatgcact gaggaggcag aagtatgatt tgccgtgcac ccagggccag 1320
tggacgatcc agaacaggag gtaccacttc ctctcctccc tctggcttcc tttcctccct 1380
ccccctccct ctcttccctc ctcaacagtg acccctcat tggaagccca agtccccaat 1440
ctcagagggg cagcaagggg agcgagcaga ggctggggct ggtgtcaggc ctgctgccct 1500
tgaccttgtc ctcgtcccaa cctccgccct ggccccggct tcccctctgg ctaccccaga 1560
ggtctcagac acgtttggtc atcagacacc ttggatgttt attctaatta cagcaaaatt 1620
gtctcatctt cttgggtgct gtaacccccc ctggcaccct caatccttca ataaaatgtt 1680
tccagagcca aaggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1732

<210> 6
<211> 3143
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 6

gagccaccta ccctgctccg aggccaggcc tgcagggcct catcggccag agggtgatca 60
gtgagcagaa ggatgcccgt ggccgaggcc ccccaggtgg ctggcgggca gggggacgga 120
ggtgatggcg aggaagcgga gccagagggg atgttcaagg cctgtgagga ctccaagaga 180
aaagcccggg gctacctccg cctggtgccc ctgtttgtgc tgctggccct gctcgtgctg 240
gcttcggcgg gggtgctact ctggtatttc ctagggtaca aggcggaggt gatggtcagc 300
caggtgtact caggcagtct gcgtgtactc aatcgccact tctcccagga tcttacccgc 360
cgggaatcta gtgccttccg cagtgaaacc gccaaagccc agaagatgct caaggagctc 420
atcaccagca cccgcctggg aacttactac aactccagct ccgtctattc ctttggggag 480
ggacccctca cctgcttctt ctggttcatt ctccaaatcc ccgagcaccg ccggctgatg 540
ctgagccccg aggtggtgca ggcactgctg gtggaggagc tgctgtccac agtcaacagc 600
tcggctgccg tcccctacag ggccgagtac gaagtggacc ccgagggcct agtgatcctg 660
gaagccagtg tgaaagacat agctgcattg aattccacgc tgggttgtta ccgctacagc 720
tacgtgggcc agggccaggt cctccggctg aaggggcctg accacctggc ctccagctgc 780

ctgtggcacc tgcagggccc caaggacctc atgctcaaac tccggctgga gtggacgctg 840
gcagagtgcc gggaccgact ggccatgtat gacgtggccg ggcccctgga gaagaggctc 900
atcacctcgg tgtacggctg cagccgccag gagcccgtgg tggaggttct ggcgtcgggg 960
gccatcatgg cggtcgtctg gaagaagggc ctgcacagct actacgaccc cttcgtgctc 1020
tccgtgcagc cggtggtctt ccaggcctgt gaagtgaacc tgacgctgga caacaggctc 1080
gactcccagg gcgtcctcag caccccgtac ttccccagct actactcgcc ccaaacccac 1140
tgctcctggc acctcacggt gccctctctg gactacggct tggccctctg gtttgatgcc 1200
tatgcactga ggaggcagaa gtatgatttg ccgtgcaccc agggccagtg gacgatccag 1260
aacaggaggc tgtgtggctt gcgcatcctg cagccctacg ccgagaggat ccccgtggtg 1320
gccacggccg ggatcaccat caacttcacc tcccagatct ccctcaccgg gcccggtgtg 1380
cgggtgcact atggcttgta caaccagtcg gacccctgcc ctggagagtt cctctgttct 1440
gtgaatggac tctgtgtccc tgcctgtgat ggggtcaagg actgccccaa cggcctggat 1500
gagagaaact gcgtttgcag agccacattc cagtgcaaag aggacagcac atgcatctca 1560
ctgcccaagg tctgtgatgg gcagcctgat tgtctcaacg gcagcgatga agagcagtgc 1620
caggaagggg tgccatgtgg gacattcacc ttccagtgtg aggaccggag ctgcgtgaag 1680
aagcccaacc cgcagtgtga tgggcggccc gactgcaggg acggctcgga tgaggagcac 1740
tgtgactgtg gcctccaggg cccctccagc cgcattgttg gtggagctgt gtcctccgag 1800
ggtgagtggc catggcaggc cagcctccag gttcggggtc gacacatctg tgggggggcc 1860
ctcatcgctg accgctgggt gataacagct gcccactgct tccaggagga cagcatggcc 1920
tccacggtgc tgtggaccgt gttcctgggc aaggtgtggc agaactcgcg ctggcctgga 1980
gaggtgtcct tcaaggtgag ccgcctgctc ctgcacccgt accacgaaga ggacagccat 2040
gactacgacg tggcgctgct gcagctcgac cacccggtgg tgcgctcggc cgccgtgcgc 2100
cccgtctgcc tgcccgcgcg ctcccacttc ttcgagcccg gcctgcactg ctggattacg 2160
ggctggggcg ccttgcgcga gggcggcccc atcagcaacg ctctgcagaa agtggatgtg 2220
cagttgatcc cacaggacct gtgcagcgag gcctatcgct accaggtgac gccacgcatg 2280
ctgtgtgccg gctaccgcaa gggcaagaag gatgcctgtc agggtgactc aggtggtccg 2340
ctggtgtgca aggcactcag tggccgctgg ttcctggcgg ggctggtcag ctggggcctg 2400
ggctgtggcc ggcctaacta cttcggcgtc tacacccgca tcacaggtgt gatcagctgg 2460
atccagcaag tggtgacctg aggaactgcc cccctgcaaa gcagggccca cctcctggac 2520
tcagagagcc cagggcaact gccaagcagg gggacaagta ttctggcggg gggtggggga 2580
gagagcaggc cctgtggtgg caggaggtgg catcttgtct cgtccctgat gtctgctcca 2640
gtgatggcag gaggatggag aagtgccagc agctgggggt caagacgtcc cctgaggacc 2700
caggcccaca cccagccctt ctgcctccca attctctctc ctccgtcccc ttcctccact 2760
gctgcctaat gcaaggcagt ggctcagcag caagaatgct ggttctacat cccgaggagt 2820
gtctgaggtg cgccccactc tgtacagagg ctgtttgggc agccttgcct ccagagagca 2880
gattccagct tcggaagccc ctggtctaac ttgggatctg ggaatggaag gtgctcccat 2940
cggaggggac cctcagagcc ctggagactg ccaggtgggc ctgctgccac tgtaagccaa 3000
aaggtgggga agtcctgact ccagggtcct tgccccaccc ctgcctgcca cctgggccct 3060
cacagcccag accctcactg ggaggtgagc tcagctgccc tttggaataa agctgcctga 3120
tcaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 3143

<210> 7
<211> 528
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> 168, 433
<223> n = A,T,C o G

<400> 7

aaaaaggcag ggaagtcctg cttccgtgcc ccaccggtgc tcagcagagg ctcccttgca 60
aatgcgaggc tgtttccaac tttggtctgt ttccctggca ggatgcccgt ggccgaggcc 120
ccccaggtgg ctggcgggca gggggacgga ggtgatggcg aggaagcngg agccggaggg 180
gatgttcaag gcctgtgagg actccaagag aaaagcccgg ggctacctcc gcctggtgcc 240
cctgtttgtg ctgctggccc tgctcgtgct ggcttcggcg ggggtgctac tctggtattt 300
cctagggtac aaggcggagg tgatggtcag ccaggtgtac tcaggcagtc tgcgtgtact 360
caatcgccac ttctcccagg atcttacccg ccgggaatct agtgccttcc gcagtgaaac 420
cgccaaagcc canaagatgc tcaaggagct catcaccagc acccgcctgg gaacttacta 480
caactccagc tccgtctatt cctttgggga gggacccctc acctgctt 528

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 8
aggccttccg ggtccacctc 20

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 9
tttctttcct acagagaccc 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 10
agccttgata gaggcacctt 20

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 11
gcttagagta cagcccactt 20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 12
tcaccaggcc ttccgggtcc 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 13
aggcatccta accaccagct 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 14
ccttccctga aggttcctcc 20

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

<220>
<223> Cebador

<400> 15
attccacgct gggctgttat 20

<210> 16
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 16
ctggtcaggc cccttcaa 18

<210> 17
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 17
tgaacccagg ccaggtcctc cc 22

<210> 18
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 18
tgcagaagag aaggaagaga gaca 24

<210> 19
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 19
cacactggga attgttacag catt 24

<210> 20
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 20
caacttcccc atctgcatct tctgctgt 28

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido monocatenario modificado que consiste en 12-30 nucleósidos enlazados, en donde el oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que es al menos 95% complementaria a un ácido nucleico TMPRSS6, y en donde el compuesto reduce la expresión de TMPRSS6, para uso en el tratamiento de la talasemia en un sujeto.

2. El compuesto para uso de la reivindicación 1, en donde el uso del compuesto reduce la acumulación de hierro, aumenta los niveles de expresión de hepcidina y/o disminuye el porcentaje de saturación de transferrina en el sujeto.

3. El compuesto para uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el uso comprende terapia de flebotomía.

4. El compuesto para uso de la reivindicación 3, en donde el oligonucleótido modificado:

(i) se administra antes de la terapia de flebotomía;
(i) se administra durante la terapia de flebotomía; o
(i) se administra después de la terapia de flebotomía.

5. El compuesto para el uso de cualquier reivindicación precedente, en donde el oligonucleótido modificado es complementario a un 3' UTR, un 5' UTR, un exón, un intrón, una unión exón/intrón, una región de codificación, una región de iniciación de la traducción, o una región de terminación de traducción.

6. El compuesto para uso de cualquier reivindicación precedente, en donde el oligonucleótido modificado:

(i) tiene una secuencia de nucleobase que es al menos 95%, al menos 99 %, o 100% complementario a un ácido nucleico TMPRSS6; y/o
(ii) comprende al menos un enlace internucleosídico modificado, opcionalmente en donde el enlace internucleósido modificado es un enlace internucleósido de fosforotioato; y/o
(iii) comprende un azúcar modificado, opcionalmente en donde el azúcar modificado es un azúcar bicíclico; y/o
(iv) comprende una nucleobase modificada, opcionalmente en donde la nucleobase modificada es una 5-metilcitosina; y/o
(v) consiste en 15 a 30, 18 a 21, 20 a 30, 20 a 29, 20 a 28, 20 a 27, 20 a 26, 20 a 25, 20 a 24, 20 a 23, 20 a 22, 20 a 21 o 20 nucleobases unidas.

7. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el oligonucleótido modificado comprende:

un segmento de separación que consiste en desoxinucleósidos unidos;
un segmento de ala 5' que consiste en nucleósidos unidos;
un segmento de ala 3' que consiste en nucleósidos unidos;

en donde el segmento de separación se coloca entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3' y en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado, opcionalmente en donde el oligonucleótido modificado comprende al menos un enlace internucleósido de fosforotioato.

8. El compuesto para uso de la reivindicación 7, en donde el oligonucleótido modificado comprende:

un segmento de separación que consiste en diez desoxinucleósidos unidos;
un segmento de ala 5' que consta de cinco nucleósidos unidos; y
un segmento de ala 3' que consta de cinco nucleósidos unidos.

9. El compuesto para uso de la reivindicaciónN_7o la reivindicación 8, en donde cada nucleósido de cada segmento de ala es un nucleósido modificado en 2' o un nucleósido modificado con azúcar bicíclico.

10. El compuesto para uso de la reivindicación 9, en donde cada nucleósido de cada segmento de ala es un nucleósido 2'-MOE.

11. El compuesto para uso de cualquier reivindicación precedente, en donde el compuesto antisentido está conjugado.

12. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el compuesto se administra conjuntamente con uno o más segundos agentes.

13. El compuesto para uso de la reivindicación 12, en donde el segundo agente:

(a) es un quelante de hierro, opcionalmente FBS0701 (FerroKin), Exjade, Desferal o Deferiprone; o

(b) es un agonista de hepcidina; o
(c) es un segundo compuesto antisentido.

14. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido nucleico TMPRSS6 tiene la secuencia de nucleobase de cualquiera de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.