



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 369 328**

(51) Int. Cl.:  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**A61K 31/712** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **09007461 .8**

(96) Fecha de presentación: **19.09.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2096170**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.09.2009**

(54) Título: **MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE GLUCAGÓN.**

(30) Prioridad:  
**19.09.2005 US 718684 P**

(73) Titular/es:  
**Isis Pharmaceuticals, Inc.  
2855 Gazelle Court  
Carlsbad, CA 92010, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.11.2011**

(72) Inventor/es:  
**Monia, Brett P.;  
Freier, Susan M. y  
Bhanot, Sanjay**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.11.2011**

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

**ES 2 369 328 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Modulación de la expresión del receptor de glucagón

**Listado de secuencias**

Un soporte informático del listado de secuencias, en disquete, que contiene el archivo con el nombre BIOL0066WOSEQ.txt, que tiene 29184 bytes (medido en MS-DOS) y que fue creado el 19 de septiembre de 2006.

**Campo de la invención**

En el presente documento se dan a conocer compuestos, composiciones y procedimientos para modular la expresión del receptor de glucagón en una célula, un tejido o animal.

**Antecedentes de la invención**

10 El mantenimiento de la glucemia normal es un evento metabólico cuidadosamente regulado. El glucagón, el péptido de 29 aminoácidos responsable de mantener los niveles de glucosa en sangre, aumenta la liberación de glucosa del hígado mediante la activación de la glucogenolisis y la gluconeogénesis hepática, y también estimula la lipólisis en el tejido adiposo. En el estado de alimentación, cuando se consume glucosa exógena que da lugar a altos niveles de glucosa en sangre, la insulina invierte el aumento de glucogenolisis y gluconeogénesis mediado por el glucagón. En 15 los pacientes con diabetes, la insulina no está disponible o no es totalmente eficaz. Mientras que el tratamiento de la diabetes se ha centrado tradicionalmente en el aumento de los niveles de insulina, el antagonismo de la función de glucagón ha sido considerado como una terapia alternativa. Como el glucagón ejerce sus efectos fisiológicos por medio de la señalización a través del receptor de glucagón (también conocido como GCGR o GR), se ha propuesto al receptor de glucagón como una posible diana terapéutica para la diabetes (Madsen y col., Curr. Pharm. Des., 20 1999, 5, 683-691).

El receptor de glucagón pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G, que tiene siete dominios transmembranarios. También es miembro de la subfamilia más pequeña de receptores homólogos que se unen a péptidos que son estructuralmente similares al glucagón. El gen que codifica el receptor de glucagón humano fue clonado en 1994 y el análisis de la secuencia genómica reveló múltiples intrones y una similitud del 82% con el gen del receptor de glucagón de rata (Lok y col., Gene, 1994, 140, 203-209; MacNeil y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1994, 198, 328-334). La clonación del gen del receptor de glucagón de rata también dio lugar a la descripción de múltiples variantes alternativas de corte y empalme (Maget y col., FEBS Lett., 1994, 351, 271-275). En la patente de EE.UU. 5.776.725 se da a conocer una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica un receptor de glucagón humano o de rata (Kindsvogel y col., 1998). El gen del receptor de glucagón humano se localiza en el cromosoma 17q25 (Menzel y col., Genomics, 1994, 20, 321-328). Una mutación sin sentido que cambia la glicina por serina en el codón 40 del gen del receptor de glucagón da lugar a una afinidad tres veces menor por el glucagón (Fujisawa y col., Diabetología. 1995, 38, 983-985) y esta mutación ha sido vinculada a varios estados patológicos, incluyendo la diabetes mellitus no dependiente de la insulina (Fujisawa y col., Diabetología. 1995, 38, 983-985), la hipertensión (Chambers and Morris, Nat. Genet., 1996, 12, 122) y la adiposidad central (Siani y col., Obes. Res., 2001, 9, 722-726). La alteración dirigida del gen del receptor de glucagón en ratones ha demostrado que, a pesar de la ausencia total de receptores de glucagón y los niveles elevados de glucagón plasmáticos, los ratones mantienen niveles prácticamente normales de glucemia y lipidemia (Parker y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002, 290, 839-843).

**Resumen de la invención**

40 La invención proporciona un oligonucleótido antisentido de 13 a 26 bases nucleicas de longitud dirigido a la molécula de ácido nucleico que codifica el GCGR humano, en la que el oligonucleótido comprende una primera región, una segunda región y una tercera región, en la que dicha primera región comprende al menos 11 desoxinucleótidos, en la que dichas segunda y tercera regiones comprenden de 1 a 4 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, en la que dicha segunda y tercera región flanquean la primera región en los extremos 5' y 3' de dicha primera región, en la que dicho oligonucleótido tiene al menos un 85% de complementariedad de secuencia con una región diana dentro de la molécula de ácido nucleico que codifica el GCGR humano, y en la que el oligonucleótido hibrida específicamente con el GCGR humano y reduce su expresión.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido de la invención y opcionalmente un vehículo, diluyente, potenciador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 La invención también proporciona la composición farmacéutica de la invención, para su uso en la reducción de la expresión del GCGR en tejidos o células.

La invención también proporciona el uso de una composición farmacéutica de la invención en la fabricación de un medicamento para reducir la expresión del GCGR en tejidos o células.

La invención también proporciona la composición farmacéutica de la invención, para su uso en:

- (i) la disminución de los niveles de glucosa en sangre en un animal;
- (ii) el aumento de los niveles de GLP-1 en un animal;
- (iii) la mejora de la sensibilidad a la insulina en un animal;
- (iv) la disminución de los triglicéridos en sangre de un animal;
- 5 (v) la disminución de los niveles de colesterol en sangre en un animal;
- (vi) la prevención o el retardo de la aparición de niveles elevados de glucosa en sangre en un animal; o
- (vii) la protección de la función de las células beta en un animal.

La invención también proporciona el uso de la composición farmacéutica de la invención en la fabricación de un medicamento para:

- 10 (i) disminuir los niveles de glucosa en sangre en un animal;
- (ii) aumentar los niveles de GLP-1 en un animal;
- (iii) mejorar la sensibilidad a la insulina en un animal;
- (iv) disminuir los triglicéridos en sangre en un animal;
- (v) disminuir los niveles de colesterol en sangre en un animal;
- 15 (vi) prevenir o retardar la aparición de niveles elevados de glucosa en sangre en un animal; o
- (vii) proteger la función de las células beta en un animal.

La invención también proporciona la composición farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento de un animal que tiene una enfermedad o afección asociada con la actividad del glucagón a través del GCGR.

- 20 La invención también proporciona el uso de la composición farmacéutica de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar a un animal que tiene una enfermedad o afección asociada con la actividad del glucagón a través del GCGR.

#### **Resumen de la divulgación**

25 La presente divulgación está dirigida a compuestos oligoméricos dirigidos a, y que pueden hibridar con, una molécula de ácido nucleico que codifica el GCGR que modulan la expresión del GCGR y poseen mejor farmacocinética en comparación con los oligonucleótidos dirigidos al GCGR que comprenden una región de abertura (gap) de 10 desoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con cinco 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. En el presente documento se dan a conocer oligonucleótidos denominados "abertura-meros" (gapmers), que comprenden una región de desoxinucleótidos o "abertura" flanqueada en cada uno de sus extremos 5' y 3' con "alas" que comprenden de uno a cuatro 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. Las regiones de desoxinucleótidos de los oligonucleótidos de la divulgación comprenden más de diez desoxinucleótidos, por consiguiente los abertura-meros de la presente invención tienen "abertura ampliada" en comparación con los compuestos químicos que comprenden una región de abertura de diez desoxinucleótidos, tales como los que se dan como ejemplo en la Publicación US 2005-0014713. Se ha encontrado que las concentraciones renales de los oligonucleótidos de abertura ampliada dirigidos al GCGR están disminuidas en comparación con las de los oligonucleótidos que tienen la misma secuencia pero que comprenden una región de diez desoxinucleótidos flanqueando ambos extremos, 5' y 3', con cinco 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, manteniendo al mismo tiempo la potencia buena a excelente de los oligonucleótidos en el hígado. Por consiguiente, las formas de realización que se describen en el presente documento incluyen oligonucleótidos de abertura ampliada dirigidos al GCGR en las que las concentraciones renales de dichos oligonucleótidos están disminuidas en comparación con un oligonucleótido que tiene la misma secuencia pero que comprende una región de diez desoxinucleótidos flanqueando ambos extremos, 5' y 3', con cinco 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. Otra forma de realización de la divulgación incluye oligonucleótidos de abertura ampliada dirigidos al GCGR en la que las concentraciones renales de dichos oligonucleótidos son comparables o están disminuidas en comparación con las de un oligonucleótido que tiene la misma secuencia pero que comprende una región de diez desoxinucleótidos flanqueando ambos extremos, 5' y 3', con cinco 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, manteniendo o mejorando al mismo tiempo la potencia en los tejidos diana, tales como el hígado.

30

35

40

45

50 En algunas formas de realización, en comparación con los oligonucleótidos que tienen la misma secuencia pero que comprenden una región de diez desoxinucleótidos flanqueado ambos extremos, 5' y 3', con cinco 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, los oligonucleótidos con abertura ampliada tienen una potencia comparable o mejor sin que se presente una mayor acumulación de oligonucleótidos en el hígado. Por consiguiente, las formas de realización de la divulgación incluyen oligonucleótidos de abertura ampliada dirigidos al GCGR en las que la potencia es comparable

o mejor que la de un oligonucleótido que tiene la misma secuencia pero que comprende una región de diez desoxinucleótidos flanqueado ambos extremos, 5' y 3', con cinco 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos sin que se presente mayor acumulación de oligonucleótidos en los tejidos diana.

- 5 Además se describen procedimientos para modular la expresión de GCGR en células, tejidos o animales, que comprenden poner dichas células, tejidos o animales en contacto con uno o más de los compuestos o composiciones de la divulgación. Por ejemplo, en una forma de realización, los compuestos o composiciones de la divulgación se puede utilizar para reducir la expresión de GCGR en células, tejidos o animales. La divulgación incluye una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido de la invención y, opcionalmente, un vehículo, diluyente, excipiente o potenciador farmacéuticamente aceptable.
- 10 En una forma de realización, la divulgación describe procedimientos para reducir la glucosa en sangre utilizando los compuestos oligoméricos definidos en el presente documento. En otra forma de realización, la divulgación describe procedimientos para aumentar los niveles de GLP-1 utilizando los compuestos oligoméricos definidos en el presente documento.
- 15 En otras formas de realización, la divulgación está dirigida a procedimientos para mejorar o disminuir la gravedad de una afección en un animal, que comprenden poner a dicho animal en contacto con una cantidad eficaz de un compuesto oligomérico o una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En otras formas de realización, la divulgación está dirigida a procedimientos para mejorar o disminuir la gravedad de una afección en un animal, que comprenden poner a dicho animal en contacto con una cantidad eficaz de un compuesto oligomérico o una composición farmacéutica descrita en el presente documento de modo que se reduzca la expresión del GCGR y la medición de uno o más indicadores de dicha afección indique una disminución de la gravedad de dicha afección.
- 20 En algunas formas de realización, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección metabólica. En algunas formas de realización, las afecciones incluyen, pero no se limitan a, la diabetes, la obesidad, la resistencia a la insulina y la deficiencia de insulina. En algunas formas de realización, la diabetes es la diabetes tipo 2. En otra forma de realización, la afección es el síndrome metabólico. En una forma de realización, la obesidad es inducida por la dieta. También se dan a conocer procedimientos para prevenir o retardar la aparición de niveles elevados de glucosa en sangre en un animal, que comprenden administrar a dicho animal un compuesto o una composición farmacéutica. También se da a conocer un procedimiento para proteger la función de las células beta.
- 25

La presente solicitud está relacionada también con la solicitud de patente de EE.UU. Nº 11/231.243 y la solicitud PCT Nº PCT/US2005/033837.

30 **Descripción detallada:**

Visión general

En el presente documento se dan a conocer compuestos oligoméricos, incluyendo oligonucleótidos antisentido y otros compuestos antisentido para su uso en la modulación de la expresión de moléculas de ácido nucleico que codifican el GCGR. Esto se lleva a cabo proporcionando compuestos oligoméricos que hibridan con una o más moléculas del ácido nucleico diana que codifica el GCGR.

35 De conformidad con la presente invención se presentan composiciones y procedimientos para modular la expresión del GCGR (también conocido como receptor de glucagón o GR). En la Tabla 1 se presentan los números de acceso de GenBank® de las secuencias que se pueden utilizar para diseñar compuestos oligoméricos dirigidos al GCGR. Los compuestos oligoméricos de la invención incluyen compuestos oligoméricos que hibridan con una o más moléculas de ácido nucleico diana humano que se muestran en la Tabla 1, así como compuestos oligoméricos que hibridan con otras moléculas de ácido nucleico que codifican el GCGR humano.

40 Los compuestos oligoméricos pueden estar dirigidos a cualquier región, segmento o sitio de las moléculas de ácido nucleico que codifican el GCGR. Las regiones, los segmentos y los sitios diana adecuados incluyen, pero no se limitan a, el 5'UTR, el codón de inicio, el codón de parada, la región codificadora, el 3'UTR, la región de remate 5', intrones, exones, uniones de intrones y exones, uniones de exones e intrones y uniones entre exones.

45 **Tabla 1**

<b>Dianas genéticas</b>		
<b>Especie</b>	<b>Número de acceso de GENBANK® o descripción</b>	<b>ID. SEC. Nº</b>
Humano	NM 000160.1	1
Rata	M96674.1	3
Humano	AJ45489.1	5
Humano	El complemento de AI261290.1	6
Humano	Nucleótidos 57000 hasta 68000 de NT 079568.1	7

Las ubicaciones en el ácido nucleico diana en las que hibridan los compuestos oligoméricos activos se denominan a continuación en el presente documento "segmentos diana validados". Como se usa en el presente documento, la expresión "segmento diana validado" se define como una porción de al menos 8 bases nucleicas de una región diana a la que está dirigido un compuesto oligomérico activo. Aunque sin desear estar ligados por la teoría, en la actualidad se cree que estos segmentos diana representan porciones del ácido nucleico diana que son accesibles para la hibridación.

La presente invención incluye compuestos oligoméricos que son compuestos químicos. Un ejemplo de un compuesto químico es un abertura-mero que tiene una región de 2'-desoxinucleótidos o "abertura" flanqueado por regiones de no desoxinucleótidos o "alas". Aunque sin desear estar ligados por la teoría, la abertura de los abertura-meros presenta un sustrato reconocible por la RNasa H cuando se une a la diana de ARN, mientras que las alas no son un sustrato óptimo, pero pueden conferir otras propiedades tales como la contribución a la estabilidad del dúplex o efectos farmacocinéticos ventajosos. Cada ala puede ser uno o más monómeros de no desoxi oligonucleótidos. En una forma de realización, el abertura-mero comprende una región de diecisésis 2'-desoxinucleótidos flanqueada en cada uno de los extremos, 5' y 3', por alas de dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. A este se lo denomina abertura-mero 2-16-2. Por consiguiente, el "motivo" de este compuesto oligomérico químico o abertura-mero es 2-16-2. En otra forma de realización, todos los enlaces internucleósido son enlaces fosforotioato. En otra forma de realización las citosinas del abertura-mero son 5-metilcitosinas.

Las formas de realización de la presente invención incluyen compuestos oligoméricos que comprenden secuencias de 13 a 26 nucleótidos de longitud y que comprenden una región de desoxinucleótidos de más de 10 bases nucleicas de longitud flanqueada en cada uno de los extremos, 5' y 3', con al menos un 2'-O-(2-metoxietil) nucleótido. Los oligonucleótidos de "abertura ampliada" de preferencia comprenden 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 desoxinucleótidos en la porción de la abertura del oligonucleótido. También resultan de preferencia los oligonucleótidos antisentido de 20 bases nucleicas de longitud. Las regiones que flanquean los extremos 5' y 3' de preferencia comprenden 1, 2, 3 o 4 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. Los oligonucleótidos de abertura ampliada de preferencia tienen motivos que incluyen 1-18-1, 1-17-2, 2-17-1, 2-16-2, 3-14-3 y 4-12-4.

En algunas formas de realización, los compuestos oligoméricos reducen la expresión del GCGR, en las que la expresión del GCGR se reduce en al menos el 10%, en al menos el 20%, en al menos el 30%, en al menos el 40%, en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, en al menos el 90% o en el 100%.

Los oligonucleótidos de la presente invención incluyen de preferencia aquellos en los que las concentraciones renales de dichos oligonucleótidos están reducidas en comparación con un oligonucleótido que tiene la misma secuencia pero que comprende una región de diez desoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos, 5' y 3', con cinco 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. Los oligonucleótidos de la presente invención incluyen aquellos en los que las concentraciones renales de dichos oligonucleótidos son comparables o son inferiores en comparación con las de un oligonucleótido que tiene la misma secuencia pero que comprende una región de diez desoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos, 5' y 3', con cinco 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. Los oligonucleótidos de la presente invención incluyen aquellos en los que la potencia con respecto a la reducción objetivo en el hígado o a un efecto terapéutico es comparable o mejor que la de un oligonucleótido que tiene la misma secuencia pero que comprende una región de diez desoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos, 5' y 3', con cinco 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos sin que se presente mayor acumulación de oligonucleótidos en los tejidos.

Los oligonucleótidos de la invención hibridan específicamente con GCGR y reducen la expresión del GCGR humano. En algunas formas de realización, la región de "abertura" comprende 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 bases nucleicas. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido tienen una longitud de 20 bases nucleicas.

Los compuestos oligoméricos que se dan a conocer en el presente documento pueden comprender desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 80 bases nucleicas (es decir, desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 80 nucleósidos unidos), de preferencia entre aproximadamente 13 y aproximadamente 26 bases nucleicas. Un experto en la técnica apreciará que los compuestos oligoméricos de preferencia contemplados incluyen compuestos que tienen una longitud de 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 bases nucleicas.

Los compuestos de la invención incluyen secuencias de oligonucleótidos que comprenden al menos las 8 bases nucleicas consecutivas desde el extremo 5' terminal de uno de los compuestos antisentido ilustrativos (siendo el resto de bases nucleicas un tramo consecutivo del mismo oligonucleótido que comienza inmediatamente secuencia arriba del extremo 5' terminal del compuesto antisentido, que puede hibridar específicamente con el ácido nucleico diana, y continua hasta que el oligonucleótido comprende desde aproximadamente 13 hasta aproximadamente 26 bases nucleicas). Otros compuestos están representados por secuencias de oligonucleótidos que comprenden al menos las 8 bases nucleicas consecutivas desde el extremo 3' terminal de uno de los compuestos antisentido ilustrativos (siendo el resto de bases nucleicas un tramo consecutivo del mismo oligonucleótido que comienza inmediatamente secuencia abajo del extremo 3' terminal del compuesto antisentido, que puede hibridar específicamente con el ácido nucleico diana, y continua hasta que el oligonucleótido comprende desde aproximadamente 13 hasta aproximadamente 26 bases nucleicas). Se entiende también que los compuestos

pueden estar representados por secuencias de oligonucleótidos que comprenden al menos 8 bases nucleicas consecutivas desde una parte interna de la secuencia de un compuesto ilustrativo, y pueden extenderse en una o en ambas direcciones hasta que el oligonucleótido contiene desde aproximadamente 13 hasta aproximadamente 26 bases nucleicas.

- 5 La presente invención proporciona oligonucleótidos antisentido que comprenden la secuencia de bases nucleicas de la ID. SEC. Nº 2. En formas de realización de preferencia, los oligonucleótidos de la invención comprenden al menos una porción de 8 bases nucleicas de la secuencia de bases nucleicas de la ID. SEC. Nº 2.

En una forma de realización de preferencia, la presente invención proporciona oligonucleótidos antisentido de 20 bases nucleicas de longitud dirigidos a una molécula de ácido nucleico que codifica el GCGR y que comprenden al 10 menos una porción de 8 base nucleicas de la ID. SEC. Nº 2, en la que el oligonucleótido comprende una región de desoxinucleótidos de 12, 13, 15, 16, 17 o 18 bases nucleicas de longitud, que está flanqueada en sus extremos 5' y 3' con 1 a 4 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos y en la que el oligonucleótido hibrida específicamente con el GCGR humano y reduce su expresión.

15 En una forma de realización, las regiones flanqueadoras son simétricas (tienen el mismo número de nucleótidos en la región flanqueadora 5' que en la región flanqueadora 3'). En otra forma de realización, las regiones flanqueadoras no son simétricas (la región flanqueadora 5' tiene un número diferente de nucleótidos en comparación con la región flanqueadora 3').

20 En otras formas de realización, la presente invención incluye oligonucleótidos antisentido que tienen la secuencia de bases nucleicas de la ID. SEC. Nº 2, en la que el oligonucleótido antisentido se caracteriza por tener una región de 12 desoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con cuatro 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, una región de 16 desoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, una región de 17 desoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con uno o dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, o una región de 18 desoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con un 2'-O-(2-metoxietil) nucleótido.

25 Los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden contener al menos un enlace internucleósido modificado. Los enlaces internucleósido modificados incluyen los enlaces fosforotioato. En una forma de realización, todos los enlaces internucleósido en un oligonucleótido antisentido son enlaces fosforotioato. Los oligonucleótidos antisentido de la invención también pueden contener al menos una base nucleica modificada. En una forma de realización, al menos una citosina es una 5-metilcitosina. En otra forma de realización, todas las citocinas son 5-metilcitosinas.

30 Una forma de realización de la presente invención es un oligonucleótido antisentido, con una longitud de 20 bases nucleicas, que tiene la secuencia de la ID. SEC. Nº 2, caracterizado por tener una región de 16 desoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos en el que cada enlace es un enlace fosforotioato y cada citosina es una 5-metilcitosina.

35 En una forma de realización particular, los oligonucleótidos antisentido tienen la secuencia de bases nucleicas de la ID. SEC. Nº 2, en la que el oligonucleótido tiene una región de 12 desoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con cuatro 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. En otra forma de realización, los oligonucleótidos antisentido hibridan específicamente con el GCGR y reducen su expresión. En otra forma de realización, al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En otra forma de realización, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

40 En formas de realización particulares, el oligonucleótido antisentido tiene la secuencia de bases nucleicas de la ID. SEC. Nº 2, en la que el oligonucleótido antisentido tiene una región de 14 desoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con tres 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. En otra forma de realización, el oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con el GCGR y reduce su expresión. En otra forma de realización, al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En otra forma de realización, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

45 En una forma de realización particular, el oligonucleótido antisentido tiene la secuencia de bases nucleicas de la ID. SEC. Nº 2, en la que el oligonucleótido antisentido tiene una región de 16 desoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. En otra forma de realización, el oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con el GCGR y reduce su expresión. En otra forma de realización, al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En otra forma de realización, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

50 En una forma de realización particular, el oligonucleótido antisentido tiene la secuencia de bases nucleicas de la ID. SEC. Nº 2, en la que el oligonucleótido antisentido tiene una región de 17 desoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con uno o dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. En otra forma de realización, el oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con el GCGR y reduce su expresión. En otra forma de realización, al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En otra forma de realización, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

En una forma de realización particular, el oligonucleótido antisentido tiene la secuencia de bases nucleicas de la ID. SEC. N° 2, en la que el oligonucleótido antisentido tiene una región de 18 desoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con un 2'-O-(2-metoxietil) nucleótido. En otra forma de realización, el oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con el GCGR y reduce su expresión. En otra forma de realización, al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En otra forma de realización, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

También se contemplan en el presente documento una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido de la invención y, opcionalmente, un vehículo, diluyente, excipiente o potenciador farmacéuticamente aceptable. Los compuestos de la invención también se pueden utilizar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con los efectos del glucagón mediados por el GCGR.

Las formas de realización de la presente divulgación incluyen procedimientos para reducir la expresión del GCGR en tejidos o células, tales procedimientos comprenden poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido o una composición farmacéutica de la invención, procedimientos para reducir los niveles de glucosa en sangre, los niveles de triglicéridos en sangre, o los niveles de colesterol en sangre en un animal que comprenden administrar a dicho animal un oligonucleótido antisentido o una composición farmacéutica de la invención. Los niveles en sangre pueden ser los niveles plasmáticos o los niveles séricos. También se contemplan procedimientos para mejorar la sensibilidad a la insulina, procedimientos para aumentar los niveles de GLP-1 y procedimientos para inhibir la producción de glucosa hepática en un animal, que comprenden administrar a dicho animal un oligonucleótido antisentido o una composición farmacéutica de la invención. Una mejora en la sensibilidad a la insulina puede estar indicada por una reducción en los niveles de insulina circulante.

Otras formas de realización de la presente divulgación incluyen procedimientos de tratamiento de un animal que tiene una enfermedad o afección asociada con la actividad del glucagón a través del GCGR, que comprenden administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un oligonucleótido antisentido o una composición farmacéutica de la invención. La enfermedad o afección puede ser una enfermedad o una afección metabólica. En algunas formas de realización, la enfermedad o afección metabólica es la diabetes, la hiperglucemia, la hiperlipidemia, el síndrome metabólico X, la obesidad, la hiperglucagonemia primaria, la deficiencia de insulina o la resistencia a la insulina. En algunas formas de realización, la diabetes es la diabetes tipo 2. En algunas formas de realización, la obesidad está inducida por la dieta. En algunas formas de realización, la hiperlipidemia está asociada con niveles elevados de lípidos en la sangre. Los lípidos incluyen el colesterol y los triglicéridos. En una forma de realización, la afección es la esteatosis hepática. En algunas formas de realización, la esteatosis es la esteatohepatitis o la esteatohepatitis no alcohólica.

También se dan a conocer procedimientos para prevenir o retardar la aparición de niveles elevados de glucosa en la sangre de un animal, así como también procedimientos de protección de la función de las células beta en un animal utilizando los compuestos oligoméricos definidos en el presente documento.

Los compuestos de la invención se pueden utilizar para modular la expresión del GCGR en un animal que lo necesite, tal como un ser humano. En una forma de realización, los procedimientos comprenden la etapa de administrar a dicho animal una cantidad eficaz de un compuesto antisentido que reduce la expresión del ARN del GCGR. En una forma de realización, los compuestos antisentido de la presente invención reducen de manera eficaz los niveles o la función del ARN del GCGR. Puesto que la reducción de los niveles de ARNm del GCGR también puede dar lugar a la alteración de los productos proteicos de expresión del GCGR, tales alteraciones resultantes también se pueden medir. Los compuestos antisentido de la presente invención que reducen de manera eficaz los niveles o la función del ARN del GCGR o los productos proteicos de expresión se consideran compuestos antisentido activos. En una forma de realización, los compuestos antisentido de la invención reducen la expresión del GCGR causando una reducción del ARN de al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99% o del 100%, según la medición por medio de un ensayo de ejemplo del presente documento.

Contando con los compuestos antisentido que se ilustran en el presente documento, una persona con experiencia en la técnica podrá, sin demasiada experimentación, identificar otros compuestos antisentido.

## **50 Mecanismos antisentido**

“Mecanismos antisentido” son todos los que implican la hibridación de un compuesto con un ácido nucleico diana, en los que el resultado o el efecto de la hibridación es bien la degradación de la diana o la ocupación de la diana con el concomitante estancamiento de la maquinaria celular que implica, por ejemplo, la transcripción o el empalme.

### **Dianas**

Según se utiliza en el presente documento, la expresión “ácido nucleico diana” y “molécula de ácido nucleico que codifica el GCGR” se han utilizado por conveniencia incluyendo el ADN que codifica el GCGR, el ARN (incluyendo pre-ARNm y el ARNm o partes del mismo) transcripto a partir de tal ADN y también el ADNc derivado de tal ARN.

**Regiones, segmentos y sitios**

El proceso de selección de la diana por lo general también incluye la determinación de al menos una región, un segmento o un sitio diana en el ácido nucleico diana para que se produzca la interacción antisentido de tal manera que tenga lugar el efecto deseado, por ejemplo, la modulación de la expresión. Se define como "región" a una parte del ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identificable. Dentro de las regiones de los ácidos nucleicos diana se encuentran los segmentos. Se definen como "segmentos" a regiones más pequeñas o sub-porciones de las regiones dentro de un ácido nucleico diana. Tal como se utiliza en la presente invención, se definen como "sitios" a las posiciones únicas de bases nucleicas dentro de un ácido nucleico diana.

Una vez que una o más regiones, segmentos o sitios diana han sido identificados, se diseñan los compuestos oligoméricos que son lo suficientemente complementarios con la diana, es decir, hibridan suficientemente bien y con suficiente especificidad, para que se produzca el efecto deseado.

**Variantes**

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

Tras la escisión de una o más regiones exónicas o intrónicas, o partes de las mismas durante el corte y empalme, las variantes pre-ARNm producen "variantes de ARNm" más pequeñas. Por consiguiente, las variantes de ARNm son variantes pre-ARNm procesadas y cada variante pre-ARNm única siempre producirá una variante de ARNm única como resultado del corte y empalme. También se conoce a estas variantes de ARNm como "variantes alternativas de corte y empalme". Si no se produce ningún corte y empalme de la variante pre-ARNm, entonces la variante pre-ARNm es idéntica a la variante de ARNm.

También se sabe en la técnica que pueden producirse variantes mediante el uso de señales alternativas para iniciar o detener la transcripción y que los pre-ARNm y ARNm puede poseer más de un codón de inicio o codón de parada. Las variantes que se originan a partir de un pre-ARNm o ARNm que utilizan codones alternativos de inicio se conocen como "variantes alternativas de inicio" de ese pre-ARNm o ARNm. Los transcriptos que utilizan un codón alternativo de parada se conocen como "variantes alternativas de parada" de ese pre-ARNm o ARNm. Un tipo específico de variante alternativa de parada es la "variante poliA" en la que los múltiples transcriptos producido son el resultado de la selección alternativa de una de las "señales de parada poliA" por la maquinaria de transcripción, lo que produce transcriptos que terminan en sitios poliA únicos. Por consiguiente, los tipos de variantes descritos en el presente documento también son ácidos nucleicos diana adecuados.

**Modulación de la expresión diana**

"Modulación" se refiere a una perturbación de la función, por ejemplo, ya sea un aumento (estimulación o inducción) o una disminución (inhibición o reducción) de la expresión. Como otro ejemplo, la modulación de la expresión puede incluir la perturbación de la selección del sitio de corte y empalme del procesamiento pre-ARNm. "Expresión" incluye todas las funciones por medio de las cuales la información codificada de un gen se convierte en estructuras presentes y operativas en una célula. Estas estructuras incluyen los productos de la transcripción y la traducción. "Modulación de la expresión" se refiere a la perturbación de tales funciones. "Moduladores" son aquellos compuestos que modulan la expresión del GCGR y que comprenden al menos una porción de 8 bases nucleicas que es complementaria a un segmento diana validado.

La modulación de la expresión de un ácido nucleico diana puede lograrse a través de la alteración de cualquier cantidad de funciones del ácido nucleico (ADN o ARN). Las funciones del ADN a modular pueden incluir la replicación y la transcripción. La replicación y la transcripción, por ejemplo, pueden ser de una plantilla celular endógena, un vector, una construcción de plásmido o de otra manera. Las funciones del ARN a modular pueden incluir funciones de desplazamiento, que incluyen, pero no se limitan a, el desplazamiento del ARN a un sitio de traducción de proteínas, el desplazamiento del ARN a sitios dentro de la célula que se encuentran alejados del sitio de síntesis del ARN, y la traducción de proteínas a partir del ARN. Las funciones de procesamiento del ARN que puede ser moduladas incluyen, pero no se limitan a, el corte y empalme del ARN para producir una o más especies de ARN, el remate del ARN, la maduración 3' del ARN y la actividad catalítica o la formación de complejos que implican el ARN que puede tener la participación o pueden verse facilitada por el ARN. La modulación de la expresión puede dar como resultado el aumento del nivel de una o más especies de ácido nucleico o la disminución del nivel de una o más especies de ácido nucleico, ya sea temporal o en el nivel neto de estado estacionario. Uno de los resultados de tal interferencia con la función del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión del GCGR. Por lo tanto, en una forma de realización, la modulación de la expresión puede significar el aumento o la disminución de los niveles de ARN o de proteína diana. En otra forma de realización, la modulación de la expresión puede significar un aumento o una disminución de uno o más productos de corte y empalme del ARN, o un cambio en la relación de dos o más productos de corte y empalme.

### Hibridación y complementariedad

“Hibridación” se refiere al emparejamiento de hebras complementarias de compuestos oligoméricos. Aunque no se limita a un mecanismo especial, el mecanismo más común de emparejamiento implica puentes de hidrógeno, que pueden ser puentes de hidrógeno de tipo Watson y Crick, de tipo Hoogsteen o de tipo Hoogsteen inverso, entre las bases de nucleósidos o nucleótidos complementarios (bases nucleicas) de las hebras de los compuestos oligoméricos. Por ejemplo, la adenina y la timina son bases nucleicas complementarias que se emparejan a través de la formación de enlaces de hidrógeno. La hibridación puede tener lugar en distintas circunstancias. Un compuesto oligomérico puede hibridar específicamente cuando existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto oligomérico con secuencias del ácido nucleico que no son diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de los ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en las condiciones en las que se realizan los ensayos en el caso de los ensayos *in vitro*.

“condiciones rigurosas de hibridación” o “condiciones rigurosas” se refiere a las condiciones bajo las que un compuesto oligomérico hibridará con su secuencia diana, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias, y las “condiciones rigurosas” bajo las que los compuestos oligoméricos hibridan con una secuencia diana son determinadas por la naturaleza y composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos en los que están siendo investigados.

“Complementariedad”, según se utiliza en el presente documento, se refiere a la capacidad de emparejamiento preciso entre dos bases nucleicas en una o dos hebras del compuesto oligomérico. Por ejemplo, si una base nucleica en una posición determinada de un compuesto antisentido es capaz de unirse por medio de puentes de hidrógeno con una base nucleica en una posición determinada de un ácido nucleico diana, entonces se considera que la posición de los puentes de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana es una posición complementaria. El compuesto oligomérico y el otro ADN o ARN son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias en cada molécula están ocupadas por bases nucleicas que pueden formar puentes de hidrógeno entre sí. Por lo tanto, “que puede hibridar específicamente” y “complementario” son términos que se utilizan para indicar un grado suficiente de emparejamiento preciso o complementariedad sobre un número suficiente de bases nucleicas tal que se produce la unión estable y específica entre el compuesto oligomérico y un ácido nucleico diana.

En la técnica se entiende que la secuencia de un compuesto oligomérico no necesita ser 100% complementaria a la de su ácido nucleico diana para que pueda hibridar específicamente. Por otra parte, un oligonucleótido puede hibridar sobre uno o más segmentos de tal manera que los segmentos intervinientes o adyacentes no estén involucrados en el acontecimiento de la hibridación (por ejemplo, una estructura de bucle, un emparejamiento erróneo o una estructura de horquilla). Los compuestos oligoméricos de la presente invención comprenden al menos el 70%, o al menos el 75%, o al menos el 80%, o al menos el 85%, o al menos el 90%, o al menos el 92%, o al menos el 95%, o al menos el 97%, o al menos el 98%, o al menos el 99% de complementariedad de secuencia con una región diana dentro de la secuencia del ácido nucleico diana a la que están dirigidos. Por ejemplo, un compuesto oligomérico en el que 18 de 20 bases nucleicas del compuesto antisentido son complementarias a una región diana, y por lo tanto, hibridarán específicamente, representan el 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, las bases nucleicas no complementarias restantes podrán ser agrupadas o mezcladas con bases nucleicas complementarias y no es necesario que estén contiguas entre sí o con bases nucleicas complementarias. Por lo tanto, un compuesto oligomérico que tiene una longitud de 18 bases nucleicas y que tiene 4 (cuatro) bases nucleicas no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendrá el 77,8% de complementariedad en general con el ácido nucleico diana. La complementariedad por ciento de un compuesto oligomérico con una región de un ácido nucleico diana se puede determinar de manera habitual utilizando los programas BLAST (las herramientas básicas de búsqueda de alineación local) y los programas PowerBLAST, conocidos en la técnica (Altschul y col., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410, Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656). El porcentaje de homología, la identidad o complementariedad de secuencia, se pueden determinar, por ejemplo, por medio del programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI), utilizando la configuración predeterminada, que usa el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489).

### Compuestos oligoméricos

El término “compuesto oligomérico” se refiere a una estructura polimérica capaz de hibridar con una región de una molécula de ácido nucleico. Este término incluye oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos y combinaciones químicas de los mismos. Los compuestos oligoméricos se preparan de manera habitual de forma lineal, pero se pueden unir o preparar de otro modo para que tengan estructura circular. Por otra parte, en la técnica se conocen estructuras ramificadas. Un “compuesto antisentido” o “compuesto oligomérico antisentido” se refiere a un compuesto oligomérico que es al menos parcialmente complementario a la región de una molécula de ácido nucleico con la que hibrida y que modula (aumenta o disminuye) su expresión. Por consiguiente, aunque se puede decir que todos los compuestos antisentido son compuestos oligoméricos, no todos los compuestos oligoméricos son compuestos antisentido. Un “oligonucleótido antisentido” es un compuesto antisentido que es un oligómero a base de ácido nucleico. Un oligonucleótido

antisentido se puede modificar químicamente. Ejemplos no limitantes de compuestos oligoméricos incluyen cebadores, sondas, compuestos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia guía externos (EGS), cortadores empalmadores alternos y ARN pequeños de interferencia (siRNA). Como tales, estos compuestos pueden ser introducidos en la forma de hebra única, de doble hebra, circular, ramificada o en horquillas

5 y pueden contener elementos estructurales, tales como protuberancias o bucles internos o terminales. Los compuestos oligoméricos de doble hebra pueden ser dos hebras hibridadas para formar compuestos de doble hebra o una sola hebra con autocomplementariedad suficiente para permitir la hibridación y la formación de un compuesto total o parcialmente de doble hebra.

10 Compuestos oligoméricos "químéricos" o "quimeras", en el contexto de la presente invención, son compuestos oligoméricos de una o de doble hebra, tales como oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, comprendiendo cada una al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleótido.

15 Se define un "abertura-mero" como un compuesto oligomérico, en general un oligonucleótido, que tiene una región 2'-desoxiogonucleótido flanqueada por segmentos no desoxiogonucleótido. La región central se conoce como la "abertura". Los segmentos que la flanquean se conocen como "alas". Si una de las alas no tiene monómeros desoxiogonucleótidos, se describe un "hemímero".

### **EHGNA**

20 La expresión "enfermedad hepática grasa no alcohólica" (EHGNA) abarca un espectro de enfermedades que van desde la simple acumulación de triglicéridos en los hepatocitos (esteatosis hepática) hasta la esteatosis hepática con inflamación (esteatohepatitis), la fibrosis y la cirrosis. La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) se produce a partir de la progresión de la EHGNA más allá del depósito de triglicéridos. Es necesaria una segunda afectación capaz de inducir la necrosis, inflamación y fibrosis para el desarrollo de la EHNA. Los candidatos para la segunda afectación se pueden agrupar en dos amplias categorías: los factores que causan un aumento del estrés oxidativo y los factores que favorecen la expresión de citocinas proinflamatorias. Se ha sugerido que el aumento de triglicéridos en el hígado da lugar a un aumento del estrés oxidativo en los hepatocitos de los animales y los seres humanos, lo que indica una posible relación de causa y efecto entre la acumulación hepática de triglicéridos, el estrés oxidativo y la progresión de la esteatosis hepática a la EHNA (Browning and Horton, J. Clin. Invest., 2004, 114, 147-152). La hipertrigliceridemia y los niveles elevados de ácidos grasos en sangre pueden causar la acumulación de triglicéridos en los tejidos periféricos (Shimamura y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, 322, 1080-1085). Una forma de realización de la presente divulgación es un procedimiento para reducir los lípidos en el hígado de un animal mediante la administración de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de un compuesto oligomérico de la invención. Otra forma de realización de la presente invención es un procedimiento para tratar la esteatosis hepática en un animal mediante la administración de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de un compuesto oligomérico de la invención. En algunas formas de realización, la esteatosis es la esteatohepatitis. En algunas formas de realización, la esteatosis es la EHNA.

### **Modificaciones químicas**

#### Bases nucleicas modificadas y alternativas

40 Los compuestos oligoméricos de la invención también incluyen variantes en las que está presente una base diferente en una o más de las posiciones de los nucleótidos en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenosina, se pueden producir variantes que contienen timidina, guanosina y citidina en esta posición. Esto se puede hacer en cualquiera de las posiciones del compuesto oligomérico. Estos compuestos se prueban a continuación utilizando los procedimientos descritos en el presente documento para determinar su capacidad para reducir la expresión del ARNm del GCGR.

45 Los compuestos oligoméricos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de bases nucleicas (a menudo denominadas en la técnica bases heterocíclicas o simplemente "bases"). Según se utiliza en el presente documento, las bases nucleicas "sin modificar" o "naturales" incluyen las bases púricas adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Una "sustitución" es el reemplazo de una base sin modificar o natural con otra base sin modificar o natural. Bases nucleicas "modificadas" se refiere a otras bases nucleicas sintéticas y naturales, tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquilo de la adenina y la guanina, 2-propil y otros derivados alquilo de la adenina y la guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2 tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil (-C≡C-CH<sub>3</sub>) 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-hidroxi y otras adeninas y guaninas sustituidas en posición 8, 5-halo en especial 5-bromo, 5-trifluorometil y otros uracilos y citocinas sustituidos en posición 5, 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. Otras bases nucleicas modificadas incluyen las pirimidinas tricíclicas tales como la fenoxazina citidina (1H-pirimido(5,4-b)(1,4)benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina citidina(1H-pirimido(5,4-b)(1,4)benzotiazin-2(3H)-ona), abrazaderas de G tales como fenoxazina citidina sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido(5,4-b)(1,4)benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina(2H-pirimido(4,5-b)indol-2-ona), piridoindol citidina(H-

- pirido(3', 2':4,5)pirrolo(2,3-d)pirimidin-2-ona). Las bases nucleicas modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base púrica o pirimidínica se sustituye con otros heterociclos, por ejemplo, 7-deazaadenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopirimidina y 2-piridona. Otras bases nucleicas incluyen las que se dan a conocer en la Patente de EE.UU. Nº 3.687.808, las que se dan a conocer en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, las que se dan a conocer por Englisch y col., Angewandte Chemie, Edición Internacional, 1991, 30, 613, y las que se dan a conocer por Sanghvi, Y. S., capítulo 15, Antisense Research and Applicationa, páginas 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993 . Algunas de estas bases nucleicas son conocidas por los expertos en la técnica como adecuadas para aumentar la afinidad de unión de los compuestos de la invención. Éstas incluyen pirimidinas sustituidas en posición 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas con N-2, N-6 y S-6, incluidos 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C y son actualmente sustituciones de bases adecuadas, aún más especialmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo. En la técnica se entiende que la modificación de la base no implica modificaciones químicas que produzcan sustituciones en una secuencia del ácido nucleico.
- 5 Patentes de los Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de algunas de las bases nucleicas modificadas mencionadas anteriormente incluyen, pero no se limitan a, las patente de EE.UU. 3.687.808 indicada anteriormente, así como EE.UU.: 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121; 5.596.091; 5.614.617; 5.645.985; 5.830.653; 5.763.588; 6.005.096; 5.681.941 y 5.750.692.
- 10 20 Los compuestos oligoméricos de la presente invención también pueden incluir compuestos heterocíclicos policíclicos en lugar de uno o más de los restos de bases heterocíclicos de origen natural. Previamente se han informado una serie de compuestos heterocíclicos tricíclicos. Estos compuestos se utilizan habitualmente en aplicaciones antisentido para aumentar las propiedades de unión de la hebra modificada a una hebra diana. Las modificaciones más estudiadas están dirigidas a las guanosinas, por consiguiente se han denominado abrazaderas de G o análogos 25 de citidina. Análogos de citosina representativos de generan tres puentes de hidrógeno con una guanosina en una segunda hebra incluyen 1,3-diazafenoxazin-2-ona (Kurchavov y col., Nucleosides and nucleotides, 1997, 16, 1837-1846), 1,3-diazafenotiazin-2-ona, (Lin, K.-Y.; Jones, R. J.; Matteucci, M. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 3873-3874) y 6,7,8,9-tetrafluoro-1,3-diazafenoxazin-2-ona (Wang, J.; Lin, K.-Y., Matteucci, M. Tetrahedron Lett. 1998, 39, 8385-8388). Se mostró que estas modificaciones de bases incorporadas en los oligonucleótidos hibridan con la guanina complementaria y también se mostró que la última híbrida con la adenina aumenta la estabilidad térmica helicoidal 30 por las interacciones de apilamiento ampliadas (véase también Publicaciones de EE.UU. antes de la concesión 20030207804 y 20030175906).
- 35 Se han observado otras propiedades de estabilización de la hélice cuando un sustituto análogo de la citosina tiene un resto aminoetoxi unido al rígido andamiaje de 1,3-diazafenoxazin-2-ona (Lin, K.-Y.; Matteucci, M. J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 8531-8532). Los estudios de unión demostraron que una sola incorporación podía aumentar la afinidad de unión de un oligonucleótido modelo a su ADN o ARN diana complementario con un  $\Delta T_m$  de hasta 18 °C en relación con la 5-metil citosina (dC5<sup>me</sup>), lo que es una gran mejora de afinidad para una sola modificación. Por otro lado, el aumento de la estabilidad helicoidal no afecta a la especificidad de los oligonucleótidos.
- 40 Otros compuestos heterocíclicos tricíclicos y los procedimientos para utilizarlos que son susceptibles de uso en la presente invención se dan a conocer en las Patentes de Estados Unidos 6.028.183 y 6.007.992.
- 45 La mayor afinidad de unión de los derivados de fenoxazina junto con su especificidad de secuencia no comprometida los convierte en análogos de bases nucleicas valiosos para el desarrollo de fármacos más potentes basados en la técnica antisentido. De hecho, se han obtenido datos prometedores a partir de experimentos in vitro que demuestran que heptanucleótidos que contienen sustituciones de fenoxazina son capaces de activar la RNasa H, mejoran la captación celular y presentan una mayor actividad antisentido (Lin, K. Y.; Matteucci, M. J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 8531-8532). La mejora de la actividad fue aún más pronunciada en el caso de las abrazaderas de G, ya que se mostró que una única sustitución mejora significativamente la potencia in vitro de un oligonucleótido 20-mero 2'-desoxifosforotioato (Flanagan, W. M.; Wolf, J. J.; Olson, P.; Grant, D.; Lin, K.-Y.; Wagner, R. W.; Matteucci, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96, 3513-3518).
- 50 55 Otros compuestos heterocíclicos policíclicos modificados útiles como bases heterocíclicas se dan a conocer en, pero no están limitados a, la patente de EE.UU. 3.687.808 mencionada anteriormente, así como en las patentes de EE.UU.: 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.434.257; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121; 5.596.091; 5.614.617; 5.645.985; 5.646.269; 5.750.692; 5.830.653; 5.763.588; 6.005.096; y 5.681.941 y la Publicación de EE.UU. antes de la concesión 20030158403.

#### Combinaciones

Las composiciones de la invención pueden contener dos o más compuestos oligoméricos. En otra forma de realización relacionada, las composiciones de la presente invención pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos

antisentido adicionales dirigidos a una segunda diana de ácido nucleico. Como alternativa, las composiciones de la presente invención pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones de la misma diana de ácido nucleico. Se pueden usar dos o más compuestos combinados juntos o de forma secuencial.

#### **Terapia combinada**

- 5 Los compuestos de la invención se pueden utilizar en terapias de combinación, en las que se logra un efecto aditivo mediante la administración de uno o más compuestos de la invención y uno o más de otros compuestos terapéuticos y/o profilácticos adecuados para tratar una afección. El o los compuestos terapéuticos/profilácticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los agentes reductores del nivel de glucosa, los agentes anti-obesidad y los agentes reductores del nivel de lípidos. Los agentes reductores del nivel de glucosa incluyen, pero no se limitan a, las 10 hormonas, los miméticos de hormonas o los miméticos de la incretina (por ejemplo, la insulina, incluyendo la insulina inhalada, el GLP-1 o análogos de GLP-1 como liraglutida o exenatida), los inhibidores de DPP(IV), una sulfonilurea (por ejemplo, acetohexamida, clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, glimepirida, glipizida, gliburida o una gliclazida), una biguanida (metformina), un meglitinida (por ejemplo, nateglinida o repaglinida), una tiazolidindiona u otros agonistas de PPAR-gamma (por ejemplo, pioglitazona o rosiglitazona) un inhibidor de la alfa-glucosidasa (por ejemplo, acarbose o miglitol), o un compuesto antisentido no dirigido al GCGR. También se incluyen los agonistas duales de PPAR (por ejemplo, muraglitazar, que está siendo desarrollado por Bristol-Myers Squibb; o tesaglitazar, que está siendo desarrollado por Astra-Zeneca). También se incluyen otros tratamientos para la diabetes en desarrollo (por ejemplo, LAF237, que está siendo desarrollado por Novartis; MK-0431, que está siendo desarrollado por Merck; o rimonabant, que está siendo desarrollado por Sanofi-Aventis). Los agentes anti-obesidad incluyen, pero 15 no se limitan a, los supresores del apetito (por ejemplo, fentermina o Meridia™), los inhibidores de la absorción de grasas como el orlistat (por ejemplo Xenical™), y formas modificadas del factor neurotrófico ciliar, que inhiben las señales de hambre que estimular el apetito. Los agentes reductores del nivel de lípidos incluyen, pero no se limitan a, las resinas secuestrantes de sales biliares (por ejemplo, colestiramina, colesterol y el clorhidrato de colesvelam), los inhibidores de la HMGCoA-reductasa (por ejemplo, lovastatina, pravastatina, atorvastatina, simvastatina y fluvastatina), el ácido nicotínico, los derivados del ácido fíbrico (por ejemplo, clofibrato, gemfibrozil, fenofibrato, bezafibrato y ciprofibrato), el probucol, la neomicina, la dextrotiroxina, los ésteres de estanol vegetal, los inhibidores de la absorción de colesterol (por ejemplo, ezetimiba), los inhibidores de la CETP (por ejemplo, torcetrapib y JTT-705) inhibidores de MTP (por ejemplo, implitapida), los inhibidores de los transportadores de ácidos biliares (transportadores apicales de ácidos biliares dependientes de sodio), los reguladores de CYP7a hepática, los 20 inhibidores de la ACAT (por ejemplo, avasimiba), las terapias de reemplazo de estrógeno (por ejemplo, tamoxigen), HDL sintética (por ejemplo, ETC-216), anti-inflamatorios (por ejemplo, glucocorticoides), o un compuesto antisentido no dirigido al GCGR. Se puede combinar uno o más de estos fármacos con uno o más de los inhibidores antisentido del GCGR para lograr un efecto terapéutico aditivo.

#### **Síntesis de oligómeros**

- 35 La oligomerización de nucleósidos modificados y no modificados puede realizarse de manera habitual de acuerdo a los procedimientos de la literatura para el ADN (Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Ed. Agrawal (1993), Humana Press) y/o ARN (Scaringe, Methods (2001), 23, 206-217. Gait y col., Applications of Chemically synthesized RNA in RNA: Protein Interactions, Ed. Smith (1998), 1-36. Gallo y col., Tetrahedron (2001), 57, 5707-5713) y la Publicación US Nº 2005-0014713, que se incorpora en el presente documento por referencia.
- 40 Los compuestos oligoméricos de la presente invención pueden prepararse convenientemente y de manera habitual a través de la conocida técnica de síntesis en fase sólida. Los equipos para tal síntesis son comercializados por varios proveedores, incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Además o como alternativa, se puede utilizar cualquier otro medio conocido en la técnica para tal síntesis. Es muy conocido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y los derivados alquilados.

#### **Purificación y análisis de oligómeros**

Los procedimientos de purificación y análisis de oligonucleótidos son conocidos por los expertos en la técnica. Los procedimientos de análisis incluyen la electroforesis capilar (EC) y la espectroscopia de masas con electrovaporización. Tales procedimientos de síntesis y análisis se pueden realizar en placas de múltiples pocillos.

#### **Divulgación no limitante**

- 50 Aunque ciertos compuestos y composiciones de la presente invención se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas formas de realización, los ejemplos del presente documento sólo sirven para ilustrar los compuestos de la invención y no pretenden limitar la misma.

#### **Ejemplo 1**

##### **Ensayo de modulación de la expresión**

- 55 La modulación de la expresión del GCGR se puede ensayar en una variedad de formas conocidas en la técnica. Los niveles de ARNm del GCGR se pueden cuantificar mediante, por ejemplo, análisis de transferencia Northern,

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva o PCR en tiempo real. El análisis de ARN se puede realizar en el ARN celular total o por medio de procedimientos de polí(A) + ARNm conocidos en la técnica. Los procedimientos de aislamiento de ARN se enseñan, por ejemplo, en Ausubel, F. M. y col., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 1, páginas 4.1.1-4.2.9 y 4.5.1-4.5.3, John Wiley & Sons, Inc., 1993.

- 5 El análisis de transferencia Northern es habitual en la técnica y se enseña en, por ejemplo, Ausubel, F. M. y col., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 1, páginas 4.2.1-4.7.9, John Wiley & Sons, Inc., 1996. La PCR cuantitativa en tiempo real puede llevarse a cabo de manera conveniente utilizando las el sistema de detección de secuencias ABI PRISM™ 7700 disponible en el mercado, de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y utilizado según las instrucciones del fabricante.
- 10 Los niveles de proteínas codificadas por GCGR pueden cuantificarse de una diversidad de maneras bien conocidas en la técnica, tales como la inmunoprecipitación, el análisis de transferencia Western (inmunotransferencia), ELISA o la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Los anticuerpos dirigidos a una proteína codificada por GCGR pueden ser identificados y obtenidos a partir de una diversidad de fuentes, tales como el catálogo de anticuerpos de MSRS (Aerie Corporation, Birmingham, MI), o se pueden preparar a través de los procedimientos convencionales de generación de anticuerpos. Los procedimientos para la preparación de antisuero policonal se enseñan en, por ejemplo, Ausubel, F. M. y col., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, páginas 11.12.1-11.12.9, John Wiley & Sons, Inc., 1997. La preparación de anticuerpos monoclonales se enseña en, por ejemplo, Ausubel, F. M. y col., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, páginas 11.4.1-11.11.5, John Wiley & Sons, Inc., 1997.
- 15 20 Los procedimientos de inmunoprecipitación son convencionales en la técnica y se pueden encontrar en, por ejemplo, Ausubel, F. M. y col., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, páginas 10.16.1-10.16.11, John Wiley & Sons, Inc., 1998. El análisis de transferencia Western (inmunotransferencia) es convencional en la técnica y se puede encontrar en, por ejemplo, Ausubel, F. M. y col., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, páginas 10.8.1-10.8.21, John Wiley & Sons , Inc., 1997. Los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) son convencionales en la técnica y se pueden encontrar en, por ejemplo, Ausubel, F. M. y col., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, páginas 11.2.1-11.2.22, John Wiley & Sons, Inc., 1991.
- 25

El efecto de los compuestos oligoméricos de la presente invención sobre la expresión del ácido nucleico diana se puede probar en cualquiera de una diversidad de tipos de células, con la condición de que el ácido nucleico diana esté presente en niveles mensurables. El efecto de los compuestos oligoméricos de la presente invención sobre la expresión de ácido nucleico diana puede ser determinado de manera habitual utilizando, por ejemplo, PCR o análisis de transferencia Northern. Las líneas celulares se obtienen tanto de tejidos normales como de tipos de células y de células asociadas a diversos trastornos (por ejemplo, enfermedades hiperproliferativas). Las líneas celulares procedentes de múltiples tejidos y especies se pueden obtener de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA), del Japanese Cancer Research Resources Bank (Tokio, Japón) o del Centre for Applied Microbiology and Research (Wiltshire, Reino Unido) .

Las células primarias, o las células que se aíslan de un animal y no se someten a cultivo continuo, se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica o se pueden obtener de diversos proveedores comerciales. Además, las células primarias incluyen las obtenidas de sujetos humanos donantes en un entorno clínico (es decir, donantes de sangre, pacientes quirúrgicos).

#### 40 Tipos de células

Se probó el efecto de los compuestos oligoméricos sobre la expresión del ácido nucleico diana en las células HepG2.

La línea celular de hepatoblastoma humano HepG2 se obtuvo de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células HepG2 fueron cultivadas de forma habitual en medio MEM de Eagle suplementado con suero de ternera fetal al 10%, aminoácidos no esenciales 1 mM y piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Las células se hicieron pasar del modo habitual por tratamiento de tripsinización y dilución al alcanzar aproximadamente el 90% de confluencia. Se prepararon placas de cultivo multipocillo para el cultivo de las células recubriendo con una dilución 1:100 de colágeno tipo 1 de cola de rata (BD Biosciences, Bedford, MA) en disolución salina tamponada de fosfato. Se incubaron las placas que contenían colágeno a 37 °C durante aproximadamente 1 hora, tras lo que se eliminó el colágeno y se lavaron los pocillos dos veces con disolución salina tamponada de fosfato. Se sembraron las células en placas de 96 pocillos (Falcon-Primaria # 353872, BD Biosciences, Bedford, MA) a una densidad de aproximadamente 8.000 células/pocillo para su uso en experimentos de transfección con compuestos oligoméricos.

#### 55 Tratamiento con compuestos oligoméricos

Cuando las células alcanzaron la confluencia apropiada, se las trató con el oligonucleótido utilizando un procedimiento de transfección como se describe. Otros reactivos de transfección adecuados conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, LIPOFECTAMINE™, OLIGOFECTAMINE™ y FUGENE™. Otros procedimientos de transfección adecuados conocidos en la técnica incluyen la electroporación, pero no se limitan a la misma.

**LIPOFECTIN™**

Cuando las células alcanzaron un 65-75% de confluencia, se las trató con el oligonucleótido. El oligonucleótido se mezcló con LIPOFECTIN™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) en medio con suero reducido Opti-MEM™-1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) hasta alcanzar la concentración deseada de oligonucleótido y una concentración de LIPOFECTIN™ de 2,5 o 3 µg/ml por oligonucleótido 100 nM. Esta mezcla de transfección se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 0,5 horas. Para las células cultivadas en placas de 96 pozos, se lavaron los pocillos una vez con OPTI-MEM™-1 100 µl y a continuación se trataron con 130 µl de la mezcla de transfección. Las células cultivadas en placas de 24 pocillos o placas convencionales de cultivo tisular se trataron de manera similar, utilizando volúmenes adecuados de medio y oligonucleótido. Las células se trataron y se obtuvieron los datos por duplicado o triplicado. Después de aproximadamente 4 a 7 horas de tratamiento a 37 °C, se sustituyó el medio que contenía la mezcla de transfección con medio de cultivo fresco. Las células se recogieron 16 a 24 horas después del tratamiento con oligonucleótidos.

**CYTOFECTIN™**

Cuando las células alcanzaron un 65-75% de confluencia, se las trató con el oligonucleótido. El oligonucleótido se mezcló con CYTOFECTIN™ (Gene Therapy Systems, San Diego, CA) en medio con suero reducido OPTI-MEM™-1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) hasta alcanzar la concentración deseada de oligonucleótido y una concentración de CYTOFECTIN™ de 2 o 4 µg/ml por oligonucleótido 100 nM. Esta mezcla de transfección se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 0,5 horas. Para las células cultivadas en placas de 96 pocillos, se lavaron los pocillos una vez con OPTI-MEM™-1 100 µl y a continuación se trataron con 130 µl de la mezcla de transfección. Las células cultivadas en placas de 24 pocillos o placas convencionales de cultivo tisular se trataron de manera similar, utilizando volúmenes adecuados de medio y oligonucleótido. Las células se trataron y se obtuvieron los datos por duplicado o triplicado. Después de aproximadamente 4 a 7 horas de tratamiento a 37 °C, se sustituyó el medio que contenía la mezcla de transfección con medio de cultivo fresco. Las células se recogieron 16 a 24 horas después del tratamiento con oligonucleótidos.

**25 Oligonucleótidos de control**

Para determinar la concentración óptima del compuesto oligomérico para una línea celular particular se utilizaron oligonucleótidos de control. Además, cuando se probaron los compuestos oligoméricos de la invención en experimentos de selección de compuestos oligoméricos o en ensayos fenotípicos, los oligonucleótidos de control se probaron en paralelo con los compuestos de la invención. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos de control se utilizaron oligonucleótidos de control negativo, es decir, como un medio para medir la ausencia de un efecto sobre la expresión genética o el fenotipo. En formas de realización alternativas, los oligonucleótidos de control se utilizaron como oligonucleótidos de control positivo, es decir, como oligonucleótidos que se sabe que afectan la expresión genética o el fenotipo. Los oligonucleótidos de control se muestran en la Tabla 2. "Nombre de la diana", indica el gen al que va dirigido el oligonucleótido. "Especies de la diana" indica las especies en las que el oligonucleótido es perfectamente complementario al ARNm diana. "Motivo" es indicativo de las regiones químicamente distintas que comprenden el oligonucleótido. Ciertos compuestos en la Tabla 2 son oligonucleótidos químicos, compuestos por una región central "abertura" que consiste en 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada a ambos lados (5' y 3') por las "alas". Las alas se componen de 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, también conocidos como 2'-MOE nucleótidos. El "motivo" de cada oligonucleótido abertura-mero se ilustra en la Tabla 2 e indica el número de nucleótidos en cada región de abertura y de ala, por ejemplo, "5-10-5" indica un abertura-mero que tiene una región de abertura de 10 nucleótidos, flanqueada por alas de 5 nucleótidos. ISIS 29848 es una mezcla de compuestos oligoméricos al azar; y su secuencia se muestra en la Tabla 2, donde N puede ser A, T, C o G. Los enlaces internucleósido (estructura central) son fosforotioato a lo largo de los oligonucleótidos en la Tabla 2. Las citosinas no modificadas están indicadas con una "C" en la secuencia de nucleótidos; todas las demás citosinas son 5-metilcitosinas.

**Tabla 2**

<b>Oligonucleótidos de control para pruebas de línea celular, ensayos de selección y fenotípicos de compuestos oligoméricos</b>					
<b>Nº ISIS</b>	<b>Nombre de la diana</b>	<b>Especies de la diana</b>	<b>Secuencia (5' hasta 3')</b>	<b>Motivo</b>	<b>ID. SEC. Nº</b>
113131	CD86	Humano	CGTGTGTCGTGCTAGTCCC	5-10-5	8
289865	caja forkhead O1A (rabdomiosarcoma)	Humano	GGCAACGTGAACAGGTCCA	5-10-5	9
25237	integrina beta 3	Humano	GCCCATTGCTGGACATG	4-10-4	10
196103	integrina beta 3	Humano	AGCCCATTGCTGGACATGC	5-10-5	11

(continuación)

Nº ISIS	Nombre de la diana	Especies de la diana	Secuencia (5' hasta 3')	Motivo	ID. SEC. Nº
148715	Jagged 2	Humano; ratón; rata	TTGTCCCAGTCCCAGGCCT	5-10-5	12
18076	Cinasa-1 N terminal Jun	Humano	CTTTC <sup>U</sup> CGTTGGA <sup>U</sup> C <sup>U</sup> CCCTGG	5-9-6	13
18078	Cinasa-2 N terminal Jun	Humano	GTGCG <sup>U</sup> CG <sup>U</sup> CGAG <sup>U</sup> C <sup>U</sup> C <sup>U</sup> CGAAATC	5-9-6	14
183881	análogo a cinesina 1	Humano	ATCCAAGTGCTACTGTAGTA	5-10-5	15
29848	Ninguna	ninguna	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	5-10-5	16
226844	Homólogo de notch 1 (Drosophila)	Humano; ratón	GCCCTCCATGCTGGCACAGG	5-10-5	17
105990	Receptor gamma activado del proliferador de peroxisomas	Humano	AGCAAAAGATCAATCCGTTA	5-10-5	18
336806	Raf cinasa C	Humano	TACAGAAGGCTGGCCTTG	5-10-5	19
15770	Raf cinasa C	Ratón; virus del sarcoma murino; rata	ATGCATT <sup>U</sup> CTG <sup>U</sup> C <sup>U</sup> C <sup>U</sup> C <sup>U</sup> CAAGGA	5-10-5	20

- 5 La concentración de oligonucleótidos utilizados varió de línea celular a la línea celular. Para determinar la concentración óptima de oligonucleótidos para una línea celular particular, las células se trataron con un oligonucleótido de control positivo en un intervalo de concentraciones. Los controles positivos se muestran en la Tabla 2. Por ejemplo, para las células humanas y de primates no humanos, el oligonucleótido de control positivo puede seleccionarse de ISIS 336806 o ISIS 18078. Para las células de ratón o de rata, el oligonucleótido de control positivo puede ser, por ejemplo, ISIS 15770. La concentración del oligonucleótido de control positivo que da como resultado una reducción del 80% del ARNm diana, por ejemplo, Raf cinasa C de rata para ISIS 15770, se utilizó a continuación como la concentración de selección para oligonucleótidos nuevos en experimentos posteriores para esa línea celular. De no alcanzarse el 80% de reducción, se utilizó la menor concentración de oligonucleótido de control positivo que da como resultado una reducción del 60% del ARNm diana como la concentración de selección de oligonucleótidos en experimentos posteriores para esa línea celular. De no alcanzarse el 60% de reducción, se consideró que la línea celular en particular no era apta para experimentos de transfección de oligonucleótidos. Las concentraciones de oligonucleótidos antisentido utilizadas en el presente documento fueron de 50 nM a 300 nM, cuando el oligonucleótido antisentido se transfeció usando un reactivo de liposomas y de 1 µM a 40 µM cuando el oligonucleótido antisentido se transfeció por electroporación.
- 10
- 15

## Ejemplo 2

### Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de ARNm del GCGR

- 20 La cuantificación de los niveles de ARNm del GCGR se llevó a cabo por medio de PCR cuantitativa en tiempo real utilizando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM™ 7600, 7700 o 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante.
- 25 Las cantidades gen diana obtenidas por RT, PCR en tiempo real se normalizaron utilizando el nivel de expresión de GAPDH, un gen cuya expresión es constante, o mediante la cuantificación del ARN total utilizando RiboGreen™ (Molecular Probes, Eugene Inc. O). El ARN total se cuantificó utilizando el reactivo cuantificación de ARN de RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). Se colocaron con pipeta 170 µl de reactivo de trabajo RiboGreen™ (reactivo RiboGreen™ diluido 1:350 en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) en una placa de 96 pocillos que contenía 30 µl de ARN celular purificado. Se leyó la placa en un CytoFluor 4000 (PE Applied Biosystems) con longitud de onda de excitación a 485 nm y emisión a 530 nm.
- 30 La expresión de GAPDH se cuantificó por RT, PCR en tiempo real, bien de forma simultánea con la cuantificación de la diana o por separado. Para la medición simultánea con la medición de niveles de la diana, se evaluó la capacidad de conjuntos de sonda y cebador específicos para el gen diana a medir para actuar como "múltiplex" con una

reacción de amplificación de GAPDH previa al análisis de PCR cuantitativa. Multiplexación se refiere a la detección de ADN de especies múltiples, en este caso la diana y el control de GAPDH endógeno, en un solo tubo, lo que requiere que el conjunto de sonda y cebador para GAPDH no interfiera con la amplificación de la diana.

Las sondas y los cebadores para su uso en PCR en tiempo real fueron diseñados para hibridar con secuencias específicas de la diana. Los procedimientos de diseño de sondas y cebadores son conocidos en la técnica. El diseño de cebadores y sondas para su uso en PCR en tiempo real se puede realizar utilizando un software disponible en el mercado, por ejemplo Primer Express®, PE Applied Biosystems, Foster City, CA. Los cebadores y las sondas y las secuencias del ácido nucleico diana a las que hibridan se presentan en la Tabla 4. Las sondas de PCR específicas de la diana tienen FAM unido covalentemente al extremo 5' y TAMRA o MGB unido covalentemente al extremo 3', en la que FAM es el colorante fluorescente y TAMRA o MGB es el colorante inactivador.

Tras el aislamiento, se sometió el ARN a la reacción secuencial con transcriptasa inversa (RT) y a la PCR en tiempo real, las que se realizan en el mismo pocillo. Los reactivos de RT y PCR se obtuvieron de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA). La RT, PCR en tiempo real se llevó a cabo en el mismo mediante la adición de cóctel de PCR 20 µl (2,5 x tampón de PCR menos MgCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> 6,6 mM, dATP, dCTP, dGTP y dTTP de 375 µM cada uno, cebador directo y cebador inverso 375 nM de cada uno, 125 nM de la sonda, inhibidor de RNasa 4 unidades, Taq PLATINUM® 1,25 unidades, transcriptasa inversa MuLV 5 unidades y colorante ROX 2,5x) a las placas de 96 pocillos que contenían disolución de ARN total 30 µl (20-200 ng). La reacción de RT se llevó a cabo mediante la incubación durante 30 minutos a 48 °C. Tras una incubación de 10 minutos a 95 °C para activar la Taq PLATINUM®, se realizaron 40 ciclos de un protocolo de PCR de dos etapas: 95 °C durante 15 segundos (desnaturalización), seguidos por 60 °C durante 1,5 minutos (hibridación / extensión).

Se puede evaluar el efecto de los compuestos de la invención en niveles de ARNm humano diana por PCR cuantitativa en tiempo real como se describe en el presente documento, utilizando un conjunto de sonda y cebador diseñado para hibridar con el GCGR humano. Por ejemplo:

Cebador directo: TGC GGTTCCCCGTCTTC (incorporado en el presente documento como ID. SEC. Nº 21)

Cebador inverso: CTTGTAGTCTGTGGTGATCTG (incorporado en el presente documento ID. SEC. Nº 22)

Y la sonda de PCR:

FAM-CATCTCGTCCGCATCG-MGB (incorporada en el presente documento como ID. SEC. Nº 23), en la que FAM es el colorante fluorescente y MGB es un colorante inactivador no fluorescente.

Se puede evaluar el efecto de los compuestos de la invención sobre los niveles de ARNm diana de rata por PCR cuantitativa en tiempo real como se describe en otros ejemplos en el presente documento, utilizando un conjunto de sonda y cebador diseñado para hibridar con el GCGR de rata. Por ejemplo:

Cebador directo: CAGTGCCACCACAAACCTAACGC (incorporado en el presente documento como ID. SEC. Nº 24)

Cebador inverso: AGTACTTGTGAAAGTTCTGTTGCA (incorporado en el presente documento como ID. SEC. Nº 25)

Y la sonda de PCR:

FAM-TGCTGCCACCTACTGAGCTG-TAMRA (incorporada en el presente documento como ID. SEC. Nº 26), en la que FAM es el colorante fluorescente y TAMRA es un colorante inactivador.

Se puede evaluar el efecto de los compuestos de la invención sobre los niveles de ARNm diana de mono por PCR cuantitativa en tiempo real como se describe en otros ejemplos en el presente documento, utilizando un conjunto de sonda y cebador diseñado para hibridar con el GCGR de mono. Por ejemplo:

Cebador directo: ACTGCACCCGCAACGC (incorporado en el presente documento como ID. SEC. Nº 27)

Cebador inverso: CACGGAGCTGGCCTTCAG (incorporado en el presente documento como ID. SEC. Nº 28)

Y la sonda de PCR:

FAM-ATCCACGCGAACCTGTTGTGCCTT-TAMRA (incorporada en el presente documento como ID. SEC. Nº 29), en la que FAM es el colorante fluorescente y TAMRA es el colorante inactivador.

Otro ejemplo un conjunto de sonda y cebador diseñado para hibridar con el GCGR de mono es el siguiente:

Cebador directo: GAACCTTCGACAAGTATTCCCTGCT (incorporado en el presente documento como ID. SEC. Nº 30)

Cebador inverso: GGGCAGGAGATGTTGGCC (incorporado en el presente documento como ID. SEC. Nº 31)

Y la sonda de PCR:

FAM-CCAGACACCCCCGCCAATAACA-TAMRA (incorporada en el presente documento como ID. SEC. N° 32), en la que FAM es el colorante fluorescente y TAMRA es el colorante inactivador.

**Ejemplo 3: Diseño de oligonucleótidos antisentido de “abertura ampliada” dirigidos al GCGR humano**

- Se diseñó una serie de compuestos oligoméricos dirigidos al GCGR humano (número de acceso de GenBank: NM\_000160.1, incorporado en el presente documento como ID. SEC. N° 1), con diferentes tamaños de la abertura de desoxinucleótidos y alas de 2'-MOE. Todos los oligonucleótidos tienen una longitud de 20 bases nucleicas y la misma secuencia de bases nucleicas (GCACTTGTGGTGCCAAGGC, incorporada en el presente documento como ID. SEC. N° 2), y por consiguiente tienen como diana el mismo segmento de la ID. SEC. N° 1 (bases nucleicas 532 a 551). Los compuestos se muestran en la Tabla 3. El texto sin formato indica un desoxinucleótido, y los nucleótidos se indican con negrita, el texto subrayado indica los 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. Los enlaces Internucleósido son todos fosforotioato, y todas las citosinas son 5-metilcitosinas. En la Tabla 3 está indicado el “motivo” de cada compuesto, que indica regiones químicamente distintas que comprende el oligonucleótido.

**Tabla 3**

<b>Compuestos antisentido dirigidos al GCGR humano</b>			
<b>Número ISIS</b>	<b>Química</b>	<b>ID. SEC. N°</b>	<b>Motivo</b>
310457	GCACTTGTGGTGCCAAGGC	2	abertura-mero 5-10-5
325448	GCACTTGTGGTGCCAAGGC	2	abertura-mero 2-16-2
325568	GCACTTGTGGTGCCAAGGC	2	abertura-mero 3-14-3

- Se probó la capacidad del abertura-mero 5-10-5, ISIS 310457, para reducir los niveles de ARNm diana in vitro. Se trataron células HepG2 con ISIS 310457 utilizando los procedimientos que se describen en el presente documento. Se analizó el efecto de ISIS 310457 sobre los niveles de ARNm del receptor de glucagón humano por PCR cuantitativa en tiempo real y se encontró que reduce la expresión del GCGR en aproximadamente el 96%.

**Ejemplo 4: Diseño de oligonucleótidos antisentido de “abertura ampliada” dirigidos al GCGR rata**

- Se diseñó una serie de compuestos oligoméricos dirigidos al GCGR de rata (número de acceso de GenBank: M96674.1, incorporado en el presente documento como ID. SEC. N° 3) con diferentes tamaños de la abertura de desoxinucleótidos y alas de 2'-MOE. Todos los oligonucleótidos probados tienen la misma secuencia de bases nucleicas (GCACTTGTGGTACCAAGGT, incorporada en el presente documento como ID. SEC. N° 4) y por consiguiente tienen como diana el mismo segmento de la ID. SEC. N° 3 (bases nucleicas 402 a 421). El segmento al que están dirigidos los oligonucleótidos de rata corresponde al segmento del GCGR humano al que está dirigido ISIS 310457 (ID. SEC. N° 2). Los compuestos se muestran en la Tabla 4. El texto sin formato indica un desoxinucleótido, y los nucleótidos se indican con negrita, el texto subrayado indica los 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. Los enlaces Internucleósido son todos fosforotioato, y todas las citosinas son 5-metilcitosinas. En la Tabla 4 está indicado el “motivo” de cada compuesto, que indica regiones químicamente distintas que comprende el oligonucleótido.

**Tabla 4**

<b>Compuestos antisentido dirigidos al GCGR de rata</b>			
<b>Número ISIS</b>	<b>Química</b>	<b>ID. SEC. N°</b>	<b>Motivo</b>
356171	GCACTTGTGGTACCAAGGT	4	abertura-mero 5-10-5
357368	GCACTTGTGGTACCAAGGT	4	Desoxi uniforme
357369	GCACTTGTGGTACCAAGGT	4	abertura-mero 1-18-1
357370	GCACTTGTGGTACCAAGGT	4	abertura-mero 1-17-2
357371	GCACTTGTGGTACCAAGGT	4	abertura-mero 2-16-2
357372	GCACTTGTGGTACCAAGGT	4	abertura-mero 3-14-3
357373	GCACTTGTGGTACCAAGGT	4	abertura-mero 4-12-4

**Ejemplo 5: Efectos de los oligonucleótidos antisentido dirigidos al GCGR - Estudio in vivo en ratas**

- De conformidad con la presente divulgación, se probaron los oligonucleótidos diseñados para tener como diana el GCGR de rata in vivo. Se inyectaron ratas Sprague Dawley, de ocho semanas de edad, con 50, 25, 12,5 o 6,25 mg/kg de ISIS 356171, ISIS 357368, ISIS 357369, ISIS 357370, ISIS 357371, ISIS 357372 o ISIS 357373 dos veces por semana durante 3 semanas para un total de 6 dosis. Como control se utilizaron animales a los que se les inyectó disolución salina. Todos los oligonucleótidos probados tienen la misma secuencia de bases nucleicas (GCACTTGTGGTACCAAGGT, incorporada en el presente documento como ID. SEC. N° 4), y la química y el motivo de cada compuesto se han descrito anteriormente.

5

Después del período de tratamiento, las ratas fueron sacrificadas y se evaluaron los niveles de ácido nucleico diana en el hígado. El aislamiento del ARN y la cuantificación del nivel de expresión del ARNm diana se llevaron a cabo como se describió por medio de otros ejemplos en el presente documento, utilizando RIBOGREEN™. El ARN de cada grupo de tratamiento se ensayó junto con el ARN del grupo tratado con ISIS 356171. Los resultados se presentan en las Tablas 5a, 5b, 5c, 5d, 5e y 5f como porcentaje de los niveles de los animales de control tratados con disolución salina.

**Tabla 5a**

Reducción de los niveles de la diana en hígado de ratas tratadas con oligonucleótidos antisentido 2-16-2 dirigidos al GCGR					
Tratamiento	Motivo	Control %			
		Dosis de oligonucleótido (mg/kg)			
		50	25	12,5	6,25
<b>ISIS 356171</b>	5-10-5	7	20	26	36
<b>ISIS 357371</b>	2-16-2	11	22	35	39

**Tabla 5b**

Reducción de los niveles de la diana en hígado de ratas tratadas con oligonucleótidos antisentido 3-14-3 dirigidos al GCGR					
Tratamiento	Motivo	Control %			
		Dosis de oligonucleótido (mg/kg)			
		50	25	12,5	6,25
<b>ISIS 356171</b>	5-10-5	10	24	28	50
<b>ISIS 357372</b>	3-14-3	12	23	37	56

10

**Tabla 5c**

Reducción de los niveles de la diana en hígado de ratas tratadas con oligonucleótidos antisentido 4-12-4 dirigidos al GCGR					
Tratamiento	Motivo	Control %			
		Dosis de oligonucleótido (mg/kg)			
		50	25	12,5	6,25
<b>ISIS 356171</b>	5-10-5	10	25	36	47
<b>ISIS 357373</b>	2-16-2	13	22	48	47

**Tabla 5d**

Reducción de los niveles de la diana en hígado de ratas tratadas con oligonucleótidos antisentido 1-17-2 dirigidos al GCGR					
Tratamiento	Motivo	Control %			
		Dosis de oligonucleótido (mg/kg)			
		50	25	12,5	6,25
<b>ISIS 356171</b>	5-10-5	8	24	32	43
<b>ISIS 357370</b>	1-17-2	20	41	62	68

15

**Tabla 5e**

Reducción de los niveles de la diana en hígado de ratas tratadas con oligonucleótidos antisentido 1-18-1 dirigidos al GCGR					
Tratamiento	Motivo	Control %			
		Dosis de oligonucleótido (mg/kg)			
		50	25	12,5	6,25
<b>ISIS 356171</b>	5-10-5	9	27	34	46
<b>ISIS 357369</b>	1-18-1	33	35	58	70

**Tabla 5f**

Reducción de los niveles de la diana en hígado de ratas tratadas con oligonucleótidos desoxi uniformes dirigidos al GCGR					
Tratamiento	Motivo	Control %			
		Dosis de oligonucleótido (mg/kg)			
		50	25	12,5	6,25
<b>ISIS 356171</b>	5-10-5	8	23	30	45
<b>ISIS 357368</b>	Desoxi uniforme	31	43	77	73

Como se muestra en las Tablas 5a, 5b, 5c, 5d y 5e, los oligonucleótidos antisentido de abertura ampliada fueron eficaces para reducir los niveles de GCGR in vivo de una manera dependiente de la dosis. Por lo tanto, una forma de realización de la presente divulgación es un procedimiento para reducir la expresión de los niveles de GCGR en un animal que comprende la administración de un oligonucleótido antisentido dirigido al GCGR. En una forma de realización, los oligonucleótidos antisentido comprenden una abertura de diecisés desoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos, 5' y 3', con dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos.

Además, se determinó la concentración de oligonucleótidos en el riñón y el hígado. Los procedimientos para determinar la concentración de oligonucleótidos en los tejidos son conocidos en la técnica (Geary y col., Anal. Biochem., 1999, 274, 241-248). En la Tabla 6 se muestra la concentración total de oligonucleótido y la concentración de oligonucleótido de longitud total (en µg/g) en el riñón o el hígado de los animales tratados con 25 mg/kg del oligonucleótido indicado. El oligonucleótido total es la suma de todos los metabolitos de oligonucleótidos detectados en el tejido.

15

**Tabla 6**

Concentración de oligonucleótido en el riñón y en el hígado					
Tratamiento	Motivo	Oligo total en el riñón	Longitud total en el riñón	Oligo total en el hígado	Longitud total en el hígado
<b>ISIS 356171</b>	abertura-mero 5-10-5	1814	1510	621	571
<b>ISIS 356368</b>	Desoxi uniforme	801	183	282	62
<b>ISIS 356369</b>	1-18-1	1237	475	309	171
<b>ISIS 356370</b>	1-17-2	1127	590	370	271
<b>ISIS 356371</b>	2-16-2	871	515	345	253
<b>ISIS 356372</b>	3-14-3	1149	774	497	417
<b>ISIS 356373</b>	4-12-4	902	687	377	326

Como se muestra en la Tabla 6, las concentraciones de los oligonucleótidos de abertura ampliada en el riñón se redujeron en general con respecto a las encontradas para ISIS 356171 en estos tejidos. Tomados con los datos de reducción de la diana que se muestran en la Tabla 5, en los que la potencia se mantuvo con ISIS 356371, ISIS 356372 e ISIS 356373 con respecto a ISIS 356171, estos datos sugieren que los oligos de abertura ampliada, en particular ISIS 356371, ISIS 356372 e ISIS 356373 son, en esencia, más eficaces que el ISIS 356171 para reducir los niveles de la diana en el hígado.

**Ejemplo 6: Efectos fisiológicos de los oligonucleótidos antisentido dirigidos al GCGR - Estudio in vivo en ratas**

Para evaluar los efectos fisiológicos de la disminución del GCGR con los compuestos antisentido de la invención, se controlaron los niveles de glucosa en el plasma durante todo el estudio para cada grupo de tratamiento descrito en el ejemplo anterior. Los niveles de glucosa se midieron utilizando procedimientos clínicos habituales (por ejemplo, el analizador de glucosa YSI, YSI Scientific, Yellow Springs, OH) antes del inicio del tratamiento ("Extracción de sangre previa") y durante cada semana del período de tratamiento. Los resultados se presentan en la Tabla 7 en mg/dl para cada grupo de tratamiento.

**Tabla 7**

Efecto de la inhibición antisentido del GCGR en los niveles de glucosa en el plasma						
Tratamiento	Motivo	Dosis	Extracción de sangre previa	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Solución salina	n/d	n/d	144	139	126	136
<b>ISIS 356171</b>	5-10-5	50 mg/kg	125	131	115	110

(continuación)

Tratamiento	Motivo	Dosis	Extracción de sangre previa	Semana 1	Semana 2	Semana 3
ISIS 356171		25 mg/kg	133	134	126	127
ISIS 356171		12,5 mg/kg	143	139	128	133
ISIS 356171		6,25 mg/kg	137	134	127	133
ISIS 357368	Desoxi uniforme	50 mg/kg	139	135	123	128
ISIS 357368		25 mg/kg	146	135	127	145
ISIS 357368		12,5 mg/kg	136	133	125	132
ISIS 357368		6,25 mg/kg	137	135	124	131
ISIS 357369	1-18-1	50 mg/kg	137	134	120	127
ISIS 357369		25 mg/kg	147	136	126	125
ISIS 357369		12,5 mg/kg	144	136	130	130
ISIS 357369		6,25 mg/kg	138	131	130	133
ISIS 357370	1-17-2	50 mg/kg	145	132	130	120
ISIS 357370		25 mg/kg	151	133	131	132
ISIS 357370		12,5 mg/kg	140	139	132	132
ISIS 357370		6,25 mg/kg	139	131	131	130
ISIS 357371	2-16-2	50 mg/kg	155	134	130	126
ISIS 357371		25 mg/kg	142	133	125	122
ISIS 357371		12,5 mg/kg	142	142	135	132
ISIS 357371		6,25 mg/kg	146	138	133	132
ISIS 357372	3-14-3	30 mg/kg	155	134	132	127
ISIS 357372		25 mg/kg	172	138	138	125
ISIS 357372		12,5 mg/kg	151	140	135	130
ISIS 357372		6,25 mg/kg	140	142	130	133
ISIS 357373	4-12-4	50 mg/kg	153	134	121	116
ISIS 357373		25 mg/kg	143	135	129	118
ISIS 357373		12,5 mg/kg	146	141	129	135
ISIS 357373		6,25 mg/kg	141	137	137	140

Como se muestra en la Tabla 7, los animales tratados con los compuestos antisentido dirigidos al GCGR mostraron una tendencia hacia la disminución de la glucosa en el transcurso del estudio. Por lo tanto, otra forma de realización de la presente divulgación es un procedimiento para reducir los niveles de glucosa en un animal que comprende administrar a dicho animal un oligonucleótido antisentido que reduce la expresión de los niveles de GCGR. En formas de realización de preferencia, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido de abertura ampliada. En una forma de realización, el oligonucleótido antisentido comprende una abertura de diecisésis desoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos, 5' y 3', con dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido comprende una abertura de catorce desoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos, 5' y 3', con tres 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos o una abertura de doce desoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos, 5' y 3', con cuatro 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos.

Para examinar los efectos de la disminución del GCGR en otros elementos en la vía del glucagón, también se evaluaron en los animales tratados con los compuestos antisentido los niveles de glucagón y los niveles de péptido-1 análogo al glucagón (GLP-1) al final del período de tratamiento. Los niveles plasmáticos de glucagón y de GLP-1 activo se determinaron utilizando kits, instrumentos o servicios comerciales (por ejemplo, por radioinmunoensayo, ELISA y/o el inmunoensayo Luminex y/o Linco Research Inc. Bioanalytical Services, St. Louis, MO). Los niveles promedio de glucagón (en ng/ml) y los niveles de GLP-1 (pM) para cada grupo de tratamiento se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Efectos de la inhibición antisentido del GCGR en los niveles de glucagón y GLP-1				
Tratamiento	Motivo	Dosis	Glucagón (ng/ml)	GLP-1 (pM)
Solución salina	n/d	n/d	19	6
ISIS 356171	5-10-5	50 mg/kg	1003	29
ISIS 356171		25 mg/kg	59	7
ISIS 356171		12,5 mg/kg	38	14

(continuación)

Tratamiento	Motivo	Dosis	Glucagón (ng/ml)	GLP-1 (pM)
ISIS 356171		6,25 mg/kg	27	16
ISIS 357368	Desoxi uniforme	50 mg/kg	27	17
ISIS 357368		25 mg/kg	25	13
ISIS 357368		12,5 mg/kg	15	16
ISIS 357368		6,25 mg/kg	19	8
ISIS 357369		50 mg/kg	73	20
ISIS 357369	1-18-1	25 mg/kg	29	10
ISIS 357369		12,5 mg/kg	83	13
ISIS 357369		6,25 mg/kg	22	7
ISIS 357370		50 mg/kg	64	14
ISIS 357370	1-17-2	25 mg/kg	37	20
ISIS 357370		12,5 mg/kg	31	26
ISIS 357370		6,25 mg/kg	23	28
ISIS 357371		50 mg/kg	468	7
ISIS 357371	2-16-2	25 mg/kg	90	17
ISIS 357371		12,5 mg/kg	27	7
ISIS 357371		6,25 mg/kg	29	21
ISIS 357372		50 mg/kg	350	26
ISIS 357372	3-14-3	25 mg/kg	61	18
ISIS 357372		12,5 mg/kg	31	25
ISIS 357372		6,25 mg/kg	26	14
ISIS 357373		50 mg/kg	342	22
ISIS 357373	4-12-4	25 mg/kg	102	21
ISIS 357373		12,5 mg/kg	61	7
ISIS 357373		6,25 mg/kg	37	10

Como se muestra en la Tabla 8, la reducción antisentido del GCGR provoca un incremento en los niveles de glucagón circulante, así como en los niveles de GLP-1 circulante. A pesar de que se notó una tendencia hacia la disminución de los niveles de glucosa en el plasma, como en la Tabla 7, no se observó hipoglucemia. Por lo tanto, otra forma de realización de la presente divulgación es un procedimiento para aumentar los niveles de GLP-1 en un animal mediante la administración de un oligonucleótido antisentido dirigido al GCGR. En una forma de realización, el oligonucleótido antisentido comprende una abertura de diecisésis desoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos, 5' y 3', con dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido comprende una abertura de catorce desoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos, 5' y 3', con tres 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos o una abertura de doce desoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos, 5' y 3', con cuatro 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. En formas de realización de preferencia, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido de abertura ampliada. En formas de realización de preferencia, el oligonucleótido antisentido comprende ISIS 357371, ISIS 357372 o ISIS 357373.

15 **Ejemplo 7: Efectos de los oligonucleótidos antisentido dirigidos al GCGR - Estudio *in vivo* en monos cynomolgus**

Para evaluar las alteraciones en la distribución tisular, la potencia o el índice terapéutico causadas por la modificación del motivo de los oligonucleótidos antisentido en un primate, se utilizaron monos cynomolgus a los que se inyectó ISIS 310457 (motivo 5-10-5) o ISIS 325568 (motivo 2-16-2) en dosis de 3, 10 o 20 mg/kg por semana. Estos compuestos antisentido presentan el 100% de complementariedad con la secuencia diana del GCGR de mono. Los animales a los que se inyectó solución salina sola sirvieron como control. La duración del estudio fue de 7 semanas, y los animales recibieron tres administraciones durante la primera semana, seguidas por una administración por semana durante 6 semanas. Cada grupo de tratamiento estaba compuesto de 5 animales. Un grupo fue tratado con 20 mg/kg de ISIS 310457 y un grupo fue tratado con 20 mg/kg de ISIS 325568, se recuperaron durante tres semanas después de finalizar la administración antes de su sacrificio ("recuperación tras 20 mg/kg"). Otros grupos de tratamiento fueron sacrificados al final del estudio. Se recogió tejido hepático para evaluar la reducción de la diana.

El aislamiento del ARN y la cuantificación del nivel de expresión del ARNm diana se realizaron como se describió por medio de otros ejemplos en el presente documento utilizando RIBOGREEN™. Los resultados se presentan en la Tabla 9 como un porcentaje de los niveles de los animales de control tratados con disolución salina.

Tabla 9

<b>Reducción de los niveles de la diana en el hígado de monos tratados con oligonucleótidos antisentido dirigidos al GCGR</b>					
<b>Tratamiento</b>	<b>Motivo</b>	<b>Control %</b>			
		<b>Dosis de oligonucleótido</b>			
		<b>Recuperación tras 20 mg/kg</b>	<b>20 mg/kg</b>	<b>10 mg/kg</b>	<b>3 mg/kg</b>
ISIS 310457	5-10-5	27	34	43	71
ISIS 325568	2-16-2	43	45	54	49

Como se muestra en la Tabla 9, el tratamiento con ISIS 310457 y 325568 causó disminución en los niveles de GCGR en todas las dosis probadas, y la reducción de los niveles de la diana se siguió observando incluso en los grupos de recuperación tras la administración de 20 mg/kg. ISIS 325568 causó una mayor reducción que ISIS 310457 con la dosis de 3 mg/kg. Por lo tanto, una forma de realización de la presente divulgación es un procedimiento para reducir los niveles de expresión de GCGR en un animal que comprende la administración de un oligonucleótido antisentido dirigido al GCGR. En formas de realización de preferencia, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido de abertura ampliada. En una forma de realización, el oligonucleótido antisentido comprende una abertura de diecisés desoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos, 5' y 3', con dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. En algunas formas de realización, el oligonucleótido comprende una abertura de catorce desoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos, 5' y 3', con tres 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos o una abertura de doce desoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos, 5' y 3', con cuatro 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. En una forma de realización, el oligonucleótido antisentido comprende ISIS 325568.

Además, se determinó la concentración de oligonucleótidos en el riñón y en el hígado. Procedimientos para determinar la concentración de oligonucleótidos en los tejidos son conocidos en la técnica (Geary y col., Anal. Biochem, 1999, 274, 241-248). En la Tabla 10 se muestra la concentración total y la concentración de oligonucleótido de longitud total (en µg/g) en el riñón o en el hígado de los animales tratados con el oligonucleótido indicado.

20

Tabla 10

<b>Concentración de oligonucleótido en el hígado y en el riñón</b>						
<b>Tratamiento</b>	<b>Motivo</b>	<b>Dosis</b>	<b>Oligo total</b>	<b>Longitud total en el riñón</b>	<b>Oligo total en el hígado</b>	<b>Longitud total en el hígado</b>
ISIS 310457	5-10-5	3 mg/kg	471	423	449	330
		10 mg/kg	1011	911	710	606
		20 mg/kg	1582	1422	981	867
		recuperación tras 20 mg/kg	449	347	648	498
ISIS 325568	2-16-2	3 mg/kg	356	298	309	228
		10 mg/kg	830	685	477	339
		20 mg/kg	1390	1101	739	544
		Recuperación tras 20 mg/kg	264	161	344	205

Como se muestra en la Tabla 10, la concentración renal del oligonucleótido de motivo 5-10-5 ISIS 310457 es mayor que la medida para el oligonucleótido de motivo 2-16-2 ISIS 325568 en todas las concentraciones probadas. Tomados con los datos de reducción de la diana de la Tabla 9 para el oligonucleótido de motivo 2-16-2, estos datos sugieren que el oligonucleótido de abertura ampliada es más potente que el oligonucleótido de motivo 5-10-5 correspondiente, proporcionando una disminución más potente de los niveles de ARNm diana en el hígado sin que se presente una mayor acumulación de oligonucleótido.

#### **Ejemplo 8: Efectos fisiológicos de los oligonucleótidos antisentido dirigidos al GCGR - Estudio in vivo en monos cynomolgus**

Para examinar los efectos de la disminución del GCGR en otros elementos en la vía del glucagón, también se evaluó en los animales tratados con los compuestos antisentido, como se describe en el Ejemplo 7, los niveles de glucagón y los niveles de péptido-1 análogo al glucagón (GLP-1) durante cada semana de tratamiento. Los grupos de recuperación se probaron durante otras tres semanas después de finalizar la administración. Los monos fueron

anestesiados antes de la extracción de sangre para evitar la presencia de artefactos debidos al estrés. Los niveles plasmáticos de glucagón y GLP-1 activo se determinaron utilizando kits, instrumentos o servicios comerciales (por ejemplo, por radioinmunoensayo, ELISA y/o el inmunoensayo Luminex y/o Linco Research Inc. Bioanalytical Services, St. Louis, MO). Los niveles promedio de glucagón (en ng/ml) y los niveles de GLP-1 (pM) para cada grupo de tratamiento se muestran en la Tabla 11.

5

**Tabla 11**

<b>Efectos de la inhibición antisentido del GCGR en los niveles de glucagón y GLP-1 en monos cynomolgus</b>										
<b>Grupo de tratamiento</b>	<b>Día del tratamiento</b>									
	<b>1 (estado inicial)</b>	<b>8</b>	<b>15</b>	<b>22</b>	<b>29</b>	<b>36</b>	<b>43</b>	<b>50</b>	<b>57</b>	<b>64</b>
	<b>GLP-1</b>									
Solución salina	9	11	13	8	11	7	16	n/d	n/d	n/d
310457, 3 mg/kg	7	11	13	5	9	8	10	n/d	n/d	n/d
310457, 10 mg/kg	8	7	13	5	7	8	6	n/d	n/d	n/d
310457, 20 mg/kg	9	10	15	8	13	11	13	n/d	n/d	n/d
310457, recuperación tras 20 mg/kg	9	10	16	10	13	13	11	12	12	9
325568, 3 mg/kg	5	9	8	5	7	16	7	n/d	n/d	n/d
325568, 10 mg/kg	6	13	7	6	8	11	9	n/d	n/d	n/d
325568, 20 mg/kg	6	11	7	9	8	10	7	n/d	n/d	n/d
325568, recuperación tras 20 mg/kg	7	11	7	7	9	9	7	11	9	11
<b>Glucagón</b>										
Solución salina	202	242	250	220	213	221	210	n/d	n/d	n/d
310457, 3 mg/kg	189	204	188	181	137	177	230	n/d	n/d	n/d
310437, 10 mg/kg	183	368	350	386	381	594	689	n/d	n/d	n/d
310457, 20 mg/kg	190	285	386	488	621	842	754	n/d	n/d	n/d
310457, recuperación tras 20 mg/kg	189	422	507	519	991	1023	996	1715	1786	1488
325568, 3 mg/kg	253	198	230	261	294	329	330	n/d	n/d	n/d
325568, 10 mg/kg	203	297	315	360	376	490	426	n/d	n/d	n/d
325568, 20 mg/kg	160	213	251	379	508	423	403	n/d	n/d	n/d
325568, recuperación tras 20 mg/kg	222	373	370	434	537	500	526	1513	792	970

Otra forma de realización de la presente divulgación es un procedimiento para aumentar los niveles de GLP-1 en un animal mediante la administración de un oligonucleótido antisentido dirigido al GCGR. En formas de realización de preferencia, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido de abertura ampliada. En una forma de realización, el oligonucleótido antisentido comprende una abertura de 16 desoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos, 5' y 3', con dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido comprende una abertura de 14 desoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos, 5' y 3', con tres 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos o una abertura de 12 desoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos, 5' y 3', con cuatro 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. En formas de realización de preferencia, el oligonucleótido antisentido es ISIS 325568. En otra forma de realización, el oligonucleótido antisentido comprende el ISIS 325568.

10

**LISTADO DE SECUENCIAS**

&lt;110&gt; Isis Pharmaceutical, Inc.

Monia, Brett P.

20

Freier, Susan M.

Bhanot, Sanjay

&lt;120&gt; MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE GLUCAGÓN

&lt;130&gt; BIOL0066WO

<150> 60/718.684  
<151> 19-09-2005  
<160> 32  
<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

5 <210> 1  
<211> 2034  
<212> ADN  
<213> H. sapiens  
<400> 1

10 ggatctggca ggcgcgcgaa gacgagcggt caccggcgcc cgaccggagc gcgcggcagag 60  
gacggcgggg agccaagccg acccccggc agcgcgcgcg gggccctgag gtc当地 120  
gcagcttcag gggaggacac cccactggcc aggacgcccc aggtctgtct gctctgccac 180  
tcagctgccc tcggaggagc gtacacacac accaggactg cattgccccca gtgtgcagcc 240  
cctgccagat gtgggaggca gctagctgcc cagaggcatg ccccccgtcc agccacagcg 300  
accctgtct ctgttgcgtc tgctgctggc ctgcccggca caggtccccct ccgctcagg 360  
gatggacttc ctgtttgaga agtggaaagct ctacgggtac cagtgtcacc acaacctgag 420  
cctgctgccc cctcccacgg agctgggtgtg caacagaacc ttcgacaagt attcctgctg 480  
15 gccggacacc cccgccaata ccacggccaa catctccgtc ccctggtaacc tgccttggca 540  
ccacaaaatgt caacaccgct tcgttcaa gagatgcggg cccgacggc agtgggtgcg 600  
tggaccccg gggcagcctt ggcgtgatgc ctcccagtgc cagatggatg gcgaggagat 660  
tgaggtccag aaggagggtgg ccaagatgtt cagcagcttc caggtgtatgt acacagtggg 720  
ctacagcttgc tccctgggg ccctgtcct cgccttggcc atcctgggg gcctcagcaa 780  
gctgactgc acccgcaatg ccattccacgc gaatctgtt ggcgccttc tgctgaaagc 840  
cagctccgtg ctggtcattt atgggctgtc caggaccgc tacagccaga aaattggcga 900  
cgacctcagt gtcagcacct ggctcagtgtt tggagcgggtg gctggctgcc gtgtggccgc 960  
ggtgttcatg caatatggca tcgtggccaa ctactgtgg ctgctgggtt agggcctgta 1020  
20 cctgcacaac ctgctggggc tggccaccctt ccccgagagg agcttcttca gcctctacct 1080  
gggcatacgcc tgggtgccc ccatgtgtt cgtcgcccc tggcagtgg tcaagtgtct 1140  
gttcgagaac gtccagtgtt ggaccagaa tgacaacatg ggcttctggt ggatctgcg 1200  
gttccccgtc ttccctggcca tcctgtatcaa ctcttcatc ttctggccca tcgttcaagct 1260  
gctcggtggcc aagctgcggg cacggcagat gcaccacaca gactacaagt tccggctggc 1320  
caagtccacg ctgaccctca tccctctgtt gggcgtccac gaagtgggtct ttgccttcgt 1380  
gacggacgag cacggccagg gcaccctgcg ctccgcctaa ctcttcttc acctcttcct 1440  
cagctccatc caggccgtc tgggtggctgtt ctctactgc ttccctcaaca aggaggtgca 1500  
25 gtcggagctg cggcggcggtt ggcaccgtc ggcgcctggc aaagtgttat gggaggagcg 1560  
gaacaccagc aaccacaggg cctcatcttc gcccggccac ggccctccca gcaaggagct 1620  
gcagtttggg aggggtgggtt gcagccagga ttcatctgcg gagacccct tggctgggtgg 1680  
cctccctaga ttggctgaga gcccctctgtt aaccctgttggt ggacccctggc tagggctgg 1740  
ctctggcacc cagaggcgctc gctggacaac ccagaactgg acgcccagct gaggctgggg 1800  
gcgggggagc caacagcagc ccccacctac ccccccacccc caggtgtggct gtctgcgaga 1860  
ttgggcctcc tctccctgca cctgccttgtt ccctgggtca gaggtgagca gagggagtcca 1920  
ggcggggagt gggggctgtt ccgtgaactg cgtgccatgt tcccccacgtt tgtcggcacc 1980  
30 tcccatgtgc atggaaatgt cctccaacaa taaagagctc aagtgggtcac cgtg 2034

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

35 <220>  
<223> Compuesto oligomérico

<400> 2

gcactttgtg tgcccaaggc 20

<210> 3

<211> 1875

5 <212> ADN

<213> R. norvegicus

<400> 3

	gaattcgcgg ccgcgcggg gccccagatc ccagtgcgcg aggagcccag tcctagaccc	60
	agcaaccta gaaggagggtc acacacccccc aaggaccagg gcacccaacc tctgcagat	120
	gtgggggggt ggctacccag aggcattgtc ctcacccagc tccactgtcc ctacctgctg	180
	ctgctgtgg ttgtgtgtc atgtctgcc aaggcacccct ctgcccaggat aatggactt	240
10	ttgttgttggaa agtggaaagt ctatagtgac cagtgcacc acaacctaag cctgctgccc	300
	ccacctactg agctggctcg caacagaact ttgcacaagt actcctgtcg gcctgacacc	360
	cctcccaaca ccactgccaa catttcgtc ccctggtacc taccttgta ccacaaaatgt	420
	cagcaccggcc tagtggtaa gaggtgtggg cctgatgggc agtgggttcg agggccacgg	480
	gggcagtcat ggccgcacgc ctcccaatgt cagatggatg atgacgagat cgaggtccag	540
	aagggggttag ccaagatgtt tagcagctac caggtgtatgt aactgtggg ctacagtctg	600
	tccctggggg ccttgctcct ggccgtggc atcctgtcg gcctcaggaa gctgcactgc	660
	acccggaaact acatccacgg gaacctgttc gcgtccttc tgctcaaggc tggctctgt	720
15	ctggtcattt attggctgtt caagacacgc tatagccaga agattggaga tgacccatgt	780
	gtgagcgtct ggctcagtta tggggcggtg gctggctgca gagtgccac agtgatcatg	840
	cagtacggca tcatacccaa ctactgtgg ttgctgggtt aggggtgtta cctgtacagc	900
	ctgctgagca tcaccaccc ttccggagaag agcttcttct ccctctatct gtgcacccggc	960
	tggggatctc ccctgtgtt tgtcatcccc tgggtgggtt tcaagtgtct gtttgagaat	1020
	gtccagtgtt ggaccagcaa tgacaatatgt ggattctgtt ggatcctgc tatccctgt	1080
	ctcctggcca tactgatcaa ttttttcattt tttgtccgca tcattcatct tctttgtggcc	1140
	aagctgcgtt cccatcagat gcactatgtt gattacaagt tccggcttagc cagggtccacg	1200
20	ctgaccctca ttccctgtt gggagtccac gaagtggtct ttgcctttgt gactgatgag	1260
	catgcccagg gcaccctgcg ctccaccaag ctctttttt acctgttctt cagctccctt	1320
	cagggctgc ttgtggctgt ttcctactgt ttccctcaaca aggaggtgca ggcagagcta	1380
	ctgcggcggtt ggaggcgatg gcaagaaggc aaagctttc aggagggaaag gatggccacg	1440
	agccatggca gccacatggc cccagcaggg acttgtcatg gtatccctg tgagaaactt	1500
	cagtttatgtt gtgcaggcag cagcaatgtt actggctgtt agccctctgc gaagacactca	1560
	ttggccagta gtctcccaag gctggctgac agcccccacct gaatctccac tggactccag	1620
	ccaaagggtt gttcagaaagg gcctcacaag acaaccacca aacagatgcc tggccaaaggc	1680
25	tgaagaggca aagcagcaag acagcagctt gtactatcca cactccctta acctgtccctg	1740
	gccgggtaca ggccacattt atggagtagg ggctggatat gatggagtag ccattgtatg	1800
	aactatgggt ttcccatgtt gtgttgccat ttccatgtca cacagatatg accttcagta	1860
	aagagctccc ttgtt 1875	

&lt;213&gt; H. sapiens

&lt;400&gt; 5

	cctctagagt caacatgaca ggcataaat ggctcctgtt tctctggca agttggggc 60
	agagccaggc ttggccacgc tgggtctaa ggggctgtca ttttgcacag ggagtcctg 120
	5 gctgggttgt cctccccca gggtagcac gcgtcccccc caccggact tcgaggcgcc 180
	caggcaggga acagctcatt ggccagtgcc ctccctcctt gtccccgcct gcatctccac 240
	catccaccct gtcctcagctg ccccttgcct ctctccctgt cccctgcccc gagccccagg 300
	tctccctgc acccctgagc ctgcccaccc agcagtgc ctcgtccagg gcccctctgg 360
	gttgggggtg cacacagcgg ggagaggcgg ctccctgtgc tccctcaccca gcccggctca 420
	gtggccggag ccgcccaggc cagttggcagt agatgggct gttgtatca gatcaggaa 480
	gataaggccc cttgcgtgac cccagagctg gggacccaa aactgcctt cttcccyac 540
	ccgcctgccc ctgtctctgc cagggagagg cccctactct gtgggtctt cgccccagca 600
	ccaagcctgc atggctgctc acctggctca ggaactgggg atcagcgaca cacgggtcct 660
	gcctccatc ggccccatca tgagccagg gtccaaaggc tgaggttgg agctcttag 720
10	cagtctgtga cgcagggtgcc tgcctcgtc attcagctgt cacactgtt gggcatctc 780
	aggccccgtt agcggggcag ccctgggtgg agctggccc acgcgggctc acccagccgc 840
	tacctggagg aggctaaaat ccaggtgtc ccgtggcagg cagcagtcac ggcctgccc 900
	gaaaccctct gtcctcagct cagcctcgc ccatctcctt gcccctctcc ctggcttccc 960
	cctggcactg cttccagct ggctggccct ccatctgccc accatccat ccacacctct 1020
	tattccatgggggtgccc caaagaagag cccgtaaacag cccgggggct catagccagc 1080
	caactcgccgg accccgcaca tgacgtgga cccacaggaa gaccctccct gttctccca 1140
	cagaatttagt ttgggtcaga aactgggctc ttttagcaacg aaaggccat ttgttagct 1200
15	gttgcaccc cgaactccca gtcagatgc tggctgtggc atggggacca ggggctgtga 1260
	ctcccacaggc cctggcaggc accacggggg atgtcctccc caccctgtgc ccccaccccta 1320
	ggccagctcc tcctccaagt cgaccccgc agtgcataacc tcaaaggact gtgcagccag 1380
	cctgtggcgt cccatggat ccagaagcc caaccgagcc ttgcacggca cccacgaggc 1440
	accttaggcac cccgggtctg ggcaggggc acacatgtga cacagacccc tgagtgtggg 1500
	ccccacacac ttggcctggc acagtcacaa gccagccag ccactttgtc cgctgtggca 1560
	ctggggccaa gtgatggaaat gtccaggcat cgccaccctc acgttggca cattggctca 1620
	ggtcagcctg gcaagccagc tttcccaaggg gctaagaata ggtgaggagg atggtaggaa 1680
20	agcacgcggg ggggctgtca actgagggag gaggtcacca tctggggagg ctggtcgccc 1740
	caagagcatt gggtcacctg caggaagggt gtcacca gcaatgagac gaggggctct 1800
	gcgaccctca gagtcggccag ccagccagcc ctgggtggca agagtactc tcctgggtt 1860
	ctcctccctc ctatcgccct cttttttttt tttttttttt tttagacggta gtctcgctct 1920
	gcacagctga ctgcaatgtt gatctcgctc actgcaaggt ctgccccggg ttacgcccatt 1980
	tctcaactgccc acaagctccc gagtagctgg actacagacg cccgcccacca cgcctggcta 2040
	atttttgtt ttttttagttt gagacgggggt ttcaactgtgt agcggatggt ctcgatctcc 2100
	agacccctgt tgatccaccc ccctcggccct cccaaatgtt gggaaacacagg cgtgagcgcc 2160
25	gcccggccccc cccagctccc tctttatccc taggaccctg aggctcagag gggcagcttc 2220
	aggggaggac accccactgg ccagacgccc caggctctgc tgcctgtccca ctcagctgccc 2280
	ctcgaggagg cgtacacaca caccaggact gcattggccc agctgtgcag cccctgcccag 2340
	atgtggaggc cagctagctg cccagaggca tgccccccc 2378

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 735

&lt;212&gt; ADN

30 &lt;213&gt; H. sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; característica miscelánea

&lt;222&gt; 42, 346

&lt;223&gt; n = A, T, C o G

<400> 6

```

cagccacacgc gaccctgct gctgttgctg ttgctgctgg cntgcagggt cccctccgct 60
caggtatgg acttcctgtt tgagaagtgg aagctctacg gtgaccagtg tcaccacaac 120
ctgagcctgc tgccccctcc cacgggttag ccccccaccc agagcctttc agcctgtgcc 180
tggcctcagc acttccttag ttctcttcat gggaaagggttc ctgggtgctt atgcagcctt 240
tgaggacccc gccaaggggc cctgtcattt ctcaggcccc caccaccgtg ggcagagctg 300
5      gtgtcaaca gaaccttcga caagtattcc tgctggccgg acaccnccgc caataccacg 360
gccaacatct cctgccccctg gtacctgcct tggcaccaca aagtgcacaaca ccgcttcgtg 420
ttcaagagat gcccccccgta cggtcagtgg gtgcgtggac cccggggggca gccttggcgt 480
gatgcctccc agtgcagat ggtggcgag gagatttgggg tccaggtcag tggggcggcag 540
gcaggcgcgg tggggctgaa tggaaacggg catggggggcc cctgcctggc cctcacaggc 600
caactgttaact cgcagaaggaa ggtggccaaatgtacagca gttccaggt gatgtacaca 660
gtgggctaca gcctgtccct gggggcgctg ctccctgcct tggccatcct gggggccctc 720
agtaggatt ccgcc                                         735

```

10 <210> 7

<211> 11001

<212> ADN

<213> H. sapiens

<220>

15 <221> característica miscelánea

<222> 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339

<223> n = A, T, C o G

20 <220>

<221> característica miscelánea

<222> 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386

25 <223> n = A, T, C o G

<220>

<221> característica miscelánea

<222> 387, 388, 389, 390, 391, 392, 476, 480, 487, 535, 546, 553, 574, 596, 615, 635, 639, 780, 786, 1568, 1645, 2097, 2555, 2559, 2564, 2653, 2752, 2788, 2797, 2880, 2883, 2886, 2923, 3135, 3178, 3209, 3468, 3750, 3859, 3915, 4023, 4226

<223> n = A, T, C o G

<220>

<221> característica miscelánea

<222> 4235, 4242, 4352, 4387, 4390, 4418, 4619, 4717, 4883, 5060, 5106, 5148, 5587, 6235, 6417, 6828, 6866, 6880, 6917, 6934, 6976, 6987, 6989, 6992, 6993, 6994, 6997, 6998, 6999, 7000, 7001, 7002, 7003, 7004, 7005, 7006, 7007, 7008, 7010

<223> n = A, T, C o G

<220>

<221> característica miscelánea

# ES 2 369 328 T3

<222> 7011, 7012, 7014, 7015, 7016, 7017, 7018, 7019, 7020, 7021, 7029, 7047, 7053, 7056, 7058, 7070, 7089, 7092, 7099, 7105, 7110, 7111, 7141, 7234, 7235, 7236, 7238, 7239, 7241, 7242, 7243, 7245, 7246, 7247, 7249, 7250, 7251, 7252, 7253

<223> n = A, T, C o G

5 <220>

<221> característica miscelánea

<222> 7254, 7255, 7256, 7257, 7258, 7259, 7260, 7262, 7290, 7311, 7320, 7462, 7467, 7477, 7479, 7482, 7485, 7487, 7504, 7937, 8081, 8106, 8233, 8353, 8578, 8628, 8646, 8670, 8673, 8675, 9059, 9397, 9443, 9448, 9773, 9913, 9923, 9925, 9927

10 <223> n = A, T, C o G

15

20

25

30

35

&lt;400&gt; 7

cgcttagactt atcgtgccct ccccctcgga gacgcctcat gagagctctc tgctagactt 60  
 accctgcctt cacaagtgg agtatgaagc gcaaaaccag tagaatgtaa ccaaggagct 120  
 ggccttcctg gaggctgcca ggcagcaagc tttacagccc ctgggggagc gcgatggta 180  
 cttctaacca ggcagaagcc ctgcgcgacc tcacctgtt tttcttggc ctctgcgtt 240  
 ggactaggaa ttgcaggact tcctctctac tggcctgctc tggaaaggctg gttnnnnnnnn 300  
 5 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 360  
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nngaattcag cgcgccgagt ctgcgtatgg 420  
 ccgggttacg aggcgctccc tgcgcagggt gggcaggacc gaagctcgcc gggagnctgn 480  
 cgcganggg cggcggggaa ccctcggtc ccgtccccac ccccgccggg cccgcncgg 540  
 gcccgcctc cgncgcccgc ctcgcctgc gtcnccgcg gaaagttgc accgancccg 600  
 atctggcagc gccgngaaga cgagcggtca cccgngccng acccgagcgc gcccagagga 660  
 cggcggggag ccaagccgac ccccgagcag cccgcgcgg tgagcacctg ggccgcggcc 720  
 10 ccgaggggac gttggggagt cgaccgggt gggacagaga cccgcggggc ggcgcggcgn 780  
 ggccgngggc gcggggagcg gggagccgc cggcggtct cccgggtccg ggctggtgcg 840  
 ctcctcagtc cgcgtcagaca ccccccgttcc caacccggc tccgacacca cccggtcctg 900  
 caccgtcggg cagggtccagg ggtctcagcc cctcccccgt tctctggtcc tggggggcgc 960  
 ggctggggc ggggggtgtcg ctggccgcct ggcgcctgc ggcggccaca ctgcagcggc 1020  
 cacactcccc actcaggggcc cccggccccg cccgcctggg gagcgcacaaa agcggccgg 1080  
 acgcgtcccc gaggcgcggg gtctcaccag cgctgtctcc ccccggtggg ctcctgcccc 1140  
 gaggactgac cggtgtgcacc ggcgcggccc agatgggtt gagggtgtc tgcggccccc 1200  
 ctggccgcctc ctcttccgcg gccacactg gcaacttga ccccgccaaag cgggtcaactg 1260  
 15 ccctgcccgg ctccggcccc cccggcgccc caccacccgg cccactcgcc caccgggctt 1320  
 atgctccgac tctgaaccga ctgaccccg cccctcgcc gcccgcattcc tccaaggacc 1380  
 ggccagggt gctctctgcc cttggattt gggacatcag gttgggggg tctgggtgca 1440  
 cccacgcctg ccccgcccccc acgggggtgag ggcgcaggga tagggcttt tcaacagcct 1500  
 gtggcccttg atcccccccc ggtgccctga cttccacta cttctctgg tttcacaaaa 1560  
 acatccnng ctcggatcccc ggagtcctc aaagcgtctg agaggcccct tgcggacgcc 1620  
 ctgggagccc cgcgtccttc ctgnaccag tggccgtcc accatcctg gggcccccagc 1680  
 tccaggtctg cgggtcccccc agccgccccc agtggaaatc gttggagccct gacgcagcc 1740  
 ggagcgcucca agagtcacgt gttctgccc ggggggttggc ggggggttggc 1800  
 20 gcccgtcaaa gcggccgggg cagtgagct cagggtggccc taagccctgg tggggctgg 1860  
 tgtggccgg caggcagctg tgggagggag gaaagggttgc gcatgcgggt ggggtctaga 1920  
 gaaggcgggc agggcacctc gggagcccccc ccattggca cctcgggaac ccccccacatt 1980  
 gggcacctcg gaaaccctcc cattgggcac ctggggaaacc cccacattt ggcacctcg 2040  
 gaaccccccgc attgggcacc tcgggaaccc tcccatggg cacctggga accccntat 2100  
 tgggcacctc gggaaaccccccc acattggca ctcgggaac ccccccattt gggcaccttg 2160  
 ggaacccctc ccctaatttc cagtcactc caaggcctga gaaggagctt ggtcacctgg 2220  
 actgtgaagg tggagggtgg ggtccctgtt ggtcggtccc acctaccagc tgggtcgccg 2280  
 25 gaagggttaat acggagact gtggcccccgg ggagcccgaa gtggcagctc cacagctggg 2340  
 agtttctgtc cactccttca gtcaacaaac attgatcctg ggctgaccgg ggcccccgggg 2400  
 tgtcaagtgtc tcctctcggtt ggagagggtt gggtgagatc aacagaggag cttcccttct 2460  
 tcccttcagg ctgggtgtcac ttcaactgtat gggcagggtt cccacttgg gaagttaaat 2520  
 cgtcgcccccc gtcggcggac cacagcagcc tcagnccctnc ttcnccggcc aggctctctc 2580  
 atgggtgtc agctggaaat tgggtcccccc cccgcctccac ccacccctgt tgggggtgagg 2640  
 agctggagtc tcnccctaccc atatgggacc caccacccgc agggaaacggg ggacgctcac 2700  
 acttctgcac tcctgcctc actatcagag acccagtgga gaattgcctc cncacctcac 2760  
 ctcttgcatt cagaggccctt gaccctnag ggatccnaga ctgggggtgc cctatggga 2820  
 30 gcccacccgtt ggcctgtgaa tgctgagctt gtcggggaaat cccctcaggat ccccaagccn 2880  
 acnttnccaa cttctgttg aggctgagg gacacagagc ccncactcctt ggtccctgac 2940

	tgtttcaaag aaaggcctgg gggactggc agccaaacccc tcocctcggt cgctgggtc 3000
	tccagactgg ctgcccggct ggaagggtgg gcccctggcac gcgaggacat catgtgtgga 3060
	ggcactggct tgggggggtgc tcccagtggc tcttagagtca acatgacagg catcgaatgg 3120
5	ctcccttgc tctgnccagag ttggggcaga gccaggctt gccacgctgg gctctaangg 3180
	gctgtcatt tgcccagggc gctcctggnc tgggtggtcc tccccccagg gtgagcacgc 3240
	gtccccccca cccccacttc gaggcgccca ggcagggaac agtcatttg ccagtgtcct 3300
	tcctccttgt cccccggctg catctccacc atccaccctg ctccagctgc cccttgcctcc 3360
	tctcccgctc ccctgcccag agccccaggt ctcccctgca cccctgagcc tgcccaccta 3420
	gcagtgcccc tcgtccaggc cccctctggg ttgggggtgc acacagtnng ggagaggcgg 3480
	ctcctgtgc tcctcaccctc gcccggctca gtggccggag ccgcccaggc cagtgccagt 3540
10	agatggggct gtttgcatac gatcaggaa gataaggccc cttgcgtgac cccagagctg 3600
	gggacgccaa aactgcccct cctcccccac ccgcctggc ctgtctccgc cagggagagg 3660
	cccttactct gtgggtccctt cgcggcagca ccaaggctgc atggctgctc acctggctca 3720
	ggaactgggg atcagcgaca cacgggtccn tgccctccat cggccctac atgagccag 3780
	ggtccaaggg ctgcgggttgg gagctctta gcagtcgtg acgcagggtc ctgtccctgt 3840
15	cattcagctg tcacactgnc ttggggcatc tcaggccccg ttagcggggc agccctgggt 3900
	ggagctggcc ccacngcggg ctcaccccagc cgctacccctgg aggaggctaa aatccaggct 3960
	gtcccgtggc agccagcagt ccagcctgc ccggaaaccc tctgcgtccag ctgcagccct 4020
	cgncccatct cttgcctccct ctccccggct tccccctggc actgccttcc agctggctgg 4080
	ccctccatct gcccagccat ccatccacac ctcttattcc atttgagggt gccccaaaga 4140
	agagcccgta acagccccggg ggctcatagc cagccactcg cgggacccccg cacatgcacg 4200
	tggaccaca gaaagacccct ccctgncttc tcccnnacaga anttcagttt gtcagaaaac 4260
	tgggctctgt agcaacacaaa gggccgatttg tcttagctgtt gccaccccgaa actcccagct 4320
20	cagatgtgg ctgtggcatg gggaccaggc gnctgtgact cccacagccc tggcaggcac 4380
	cacgggnngn atgtccctccc caccctgtgc cccacccnct agggcagetc ctectccaag 4440
	tcgacgccc cagtgtctaac ctcaaaaggac tgcagccca gcctgtggcg tcccatggg 4500
	tccaggaagc ccaaccggagc cttgcacggc acccacggcggg cacctaggca ccccggtgct 4560
	gggcaggggg cacacatgtg acacagaccc ctgagttgtgg gcccacaca cttggctng 4620
	gcacagctgc aagccagccc agccacttttgc ctcgctgtgg cactggggc aagtgtatgg 4680
	aggtccaggc accgcccaccc tcacgcgttgc cacatnngc tcaggtcagc ctggcaagcc 4740
	agctttccca ggggctaaga ataggtgagg aggtgttgc ggaagcagcc gggggctgtc 4800
25	aactgaggga ggaggtcacc atctggggag gctggtcccc caccctaaagag cattgggtca 4860
	ccctgcagga aggtggctgc canccagcaa tgagacgagg ggctctgcga ccctcagagc 4920
	tgccagccag ccagccctgg gtggcaagag tgactccctc tgggtctcc tccctcttat 4980
	cgcctcttt ttttttttt ttttttttga gacggagact ctgcgtgtca cccaggctgg 5040
	actgcaatgg ctgtatctcn gtcactgca agctctgcct cccgggttca cgccattctc 5100
	ctgcctcaaa gtcggcggact agctggact acagaccccc gcacccancg ctcggctaatt 5160
	tttttgtatt tttagtagag acggggtttc actgtgttag ccaggatgtt ctcgatctcc 5220
	agacctcggt atccacccccc ctcgcctcc caaatcttcg ggattacagg cgtgagccgc 5280
	cgcgcggc cccagctcc ctcttattcc cttaggacccct gaggtcaga ggggcagctt 5340
30	caggggagga caccctactg gccaggacgc cccaggctct gctgtctgc cactcagctg 5400
	ccctcgaggc agcgtacaca cccacccaggc ctgcatttgc ccagctgtgc agccctgccc 5460
	agatgtggga ggcagcttagc tgcccagagg catgcccccc tgccagccac agcgcacccct 5520
	gctgtgttg ctgtgtgtc tggcctggca ggtgaggact cacagcaccc tcagcacccca 5580
	ggggccntcc tgtgaggact gcacactgtat ggctctctgt ctgcctgcct gcctgcctgc 5640
	ctgcctgcct gtctgtctgt ctgcccgtct gcctgccat ctgcctgtct gtctgcctgt 5700
	ccgtctgtct gtccatctgt ccatctgcct atccatctgc ctgcctgtct gcctgtccgt 5760
	ctgcctgtct gtctgcctgt ccatctgtcc atctgcctat ccatctgcct gcctgtctgt 5820
	cggcctgcct gcctgcctgt ctgtctgtc cctgtctgtc cgctgcctg tctgcctgtc 5880
	cgtctgcctg cctgtccgtc tgcctgtccg tgcctgcctc tgctgtctgt tctgcctgccc 5940
	tgtctgcctg cctgtccgtc tgcctgtccg tgcctgcctc tgctgtctgt cctgtctgccc 6000
	tgtctgccc tctgcctgtc tgctgtctgt tccgtctgc tgcctgtccg tctgtccatc 6060
	tgcctatcca tctgcctgcc tatctgtctg tccgtctgc tgcctgtctgt tctgcctgtc 6120
	tgcctgtctg tctgcctgtc tgccatctgc cctatccatc tacctgcctg cctgtctgccc 6180
	tgtctgtctg cctgtctgtc tgccctgcctg tctgtctgtc tgctgtgttgc tttgntgtcat 6240
35	gtgtccccca gccacaggc ccctccgcctc aggtgtatgg ctccctgttt gagaagtgga 6300
	agctctacgg tgaccaggtt caccacaacc tgagcctgtct gcctccctccc acgggtgagc 6360
	cccccaccca gaggctttca gcctgtgcct gcctcagca ctccctgagt tctcttncat 6420
	ggaaagggttc ctgggtgtt atgcagccct tgaggacccc gccaaggggc cctgtcattc 6480

	ctcaggcccc caccaccgtg ggcaggttag gtaacgaggt aactgagcca cagagctggg 6540
5	gacttgcc tc aggccgcaga gccaggaaat aacagaacgg tggcattgcc ccagaaccgg 6600
	ctgctgctgc tgccccccagg cccagatggg taataccacc tacagccccg tggagtttc 6660
	agtgggcaga cagtgcagg gcgttgaagc tgggaccagg gggcttggg gggctcggt 6720
	ggagagtgtatcatggcc tggacacttg gggtcaggg agaggatagg gctggaggac 6780
	tcacccggga ggcagtgcct ggggtcggat gaggggaggca gccaccanct gggcagaggg 6840
	ggcagggtgt ggcagcctcc attggngcag agggagcagn atgtggcagc cacagtttgc 6900
	gcgatgcacc tggaaangga taaaaatggc attnnggttc agccccca gagggaggtg 6960
	ctgagagaag gtcacngaga atgggnanc cnnntgnnnn nnnnnnnnnn nntnnnnnnn 7020
	nggggtctnc caagggaaagg tgtcctncag agntgnant cagggtcggn ctggcgtgc 7080
	tagcggagnc tngtccagng gagggngatn ntcaaggttag gaaggtggag gtcagatggg 7140
	ngaggtggag gtcaagtggg ggagggagca gcccaggcca tggccttggc gaggtgacgg 7200
10	ccgagctcag gcttccagag agaggagaga ggcnncnna nnanncnn nnnnnnnnnn 7260
	tncctgccc tgctctgccc tgccttaccc taccctgcag agtgggtgtg naacagaacn 7320
	ttcgacaagt attcctgtc gccggacacc cccgccaata ccacggccaa catctctgc 7380
	ccctggtaacc tgccttggca ccacaaaggt acccatagag gggaggaact gtgggggggg 7440
	cggggccagg gtggggctga cncccangcc tcccccnna cnacncnccc agtgcacac 7500
	cgcnttcgtg ttcaagagat gggggccgaa cggtcagtgg gtgcgtggac cccggggca 7560
	gccttggcgt gatgcctccc agtgcagat gatggcgag gagattgagg tccaggtcag 7620
	tggcggcag gcaggcgcgg tgggcttgg tgggaacggg catggggggc cctgcctggc 7680
	cctcacaggc cactgttaact cgacaaagga ggtggccaaag atgtacagca gtttccaggt 7740
	gatgtacaca gtgggctaca gcctgtccct gggggccctg ctccctgcct tggccatcct 7800
15	ggggggccctc aggtaggatt ccgcacgc cccggggccgc cgcaagaggac agggaggggg 7860
	acgggcgtg actggctgtg cccacaccaa gtcacactgc accgcataatg ccatccacgc 7920
	gaatctgtt gctccnttc gtgtgaaag ccagctccgt gctggtcatt gatggctgc 7980
	tcagaccccg ctacagccag aaaattggcg acgacctcag tgcagtcacc tggctcagtg 8040
	atggagttag ccccccctcgg cggcccccagg cagggtgggtg nggtggcag ccaggcaggt 8100
	ggccangtag ccgcgtcac actgcacctg taccaggcgg tggctggctg ccgtgtggcc 8160
	gcgggttca tgcataatgg catcgtggcc aactactgt ggctgctggt ggagggctg 8220
	tacctgcaca acntgcttggg cctggccacc ctccccgaga ggagcttctt cagcctctac 8280
	ctggcattcg gctgggggtga tggggctggc atgagagggg gttaaggcag gtcaccaag 8340
20	ccttggac cancagctgc tgccccccac aggtggccccc atgtgttgc tgccttcg 8400
	ggcagtggc aagtgtctgt tcgagaaacgt ccagtgaata tgagcggctg gacagctgg 8460
	ggagggaccg gggggctggg gtgcggcgtc ctggcctgag gcaggaggagg gcccggatg 8520
	agcctggcgc ctggggaggg ggtcattttgt gaccccttcc cttcttttc tgagaccncg 8580
	aattagatcc tggcaaaatc gggacggggg tgctgagggg cggagggngc tggggctgt 8640
	gccccnagta tgcgtgtgc ctggcctcgnc cangntgtcg gaccagcaat gacaacatgg 8700
	gttctgggtg gatcctgcgg tccccctct tccctggccat cctgggtgagg aaatgaagag 8760
	ccagaacgc accccaggcc cctccctccct tggcgtccct aggtgcctcc aggagacagc 8820
25	agcatectgt ctgagagcgc tggggagggag cggcaccacca gacaggacac caggacactg 8880
	gccagcaccc tggacactga gccaggctgt tccctccctgg ctgtgtgccc accagcccc 8940
	ggctatgtg gcccaggccc tatettgtc ccaggccccac ctgcaggagg gtcaggtggg 9000
	gccttccaag ggcacagagc tgccccctgg ggtcggtact gcccctact cgcaccctnt 9060
	ctcacacaga tcaactttt catcttcgtc cgcacatgttca agtgcgtctgt ggccaagctg 9120
	cgggcacggc agatgcacca cacagactac aagtccctgt ggtggccgcg gcagctggcg 9180
	tctcgagacc tggagacctt cagggccaga gggcagctgg ggtggggac tccaaatcc 9240
	acgtggatgg tgcggccga gggggggggc ggtgggtgac tcaggcgtct cctctgcagg 9300
	ctggccaagt ccacgctgac cctccatccct ctgtggggc tccacgaat ggtcttcg 9360
30	ttcgtgacgg acgagcacgc ccaggccacc ctgcgcntcc gccaagctct tcttcgacct 9420
	cttcctcagc tccttccagg tgnccgcncg cccggccggc ccccccggc gggcgactg 9480
	tgccaccctt gaccaccctg tcttccagg gctgtctgt ggtgtctct tactgtttcc 9540
	tcaacaagga ggttaggtggg agtgggggca tctgagacca tcagcactgg cctgtgggt 9600
	cagggccaga gagaggcaca gggatgccag ccccccctt gcccgggggt tggaaacacgt 9660
	ggggcccaag ctttccctc cccctgtct tattgggtgc agttgcctat ggcgtgggt 9720
	tcagggcccc aggacaggtt ggcctcagcc ccatcgctac ggtgtccacc gtngggggc 9780
	cccaggtgtc tgcagactgc tttccgtggc gatgtctgggt ggcatactgt tgcccagcag 9840
35	ggagcttggtg tcgctctgca cccctcagag cggagactgg gcatctccga tgaggcccac 9900
	agcaggtccc ggntgggtg gangnangga cagngcaggc cctaggactg gcctgcccc 9960
	tccccctccc caggtgcagt cggagctgcg cggcgcttgg caccgctggc gcctggca 10020

	agtgcatagg gaggagcgga acaccagcaa ccacagggcc tcatcttcgc ccggccacgg 10080
	ccctcccagc aaggagctgc agtttggag gggtgggtgc agccaggatt catctgcgga 10140
	gaccccttg gctggtggcc tcccttagatt ggctgagagc cccttctgaa ccctgtggg 10200
	accccagcta ggctggact ctggcaccca gnagggcgtc gctggacaac ccagaactgg 10260
	acgcccagct gaggctgggg gcgggggagc caacagcagc nccccaccta ncccccnac 10320
	ccccagtgtg gctgtctgcg agattggcc tcctctccct gcacctgcnt tgtccctgg 10380
5	gcagaggtga gcagaggagt ccagggcggg agtggggct gtggcgtaa ctgcgtgcca 10440
	gtgtcccac gtagtgcggc acgtccccatg tgcatggaaa tgcctccaa caataaagag 10500
	ctcaangtgg tcacncgtgc atgtcntgga aagcagggtct gganaatgct gggccgaag 10560
	cnagtgggg atggaacagn cggtggtgg tcagcgccag tgccggctgt tgaagggtcc 10620
	ccntgctgtc ccagttcaact cagagttggc actggAACCC cggaggatcc ngaaggcagc 10680
	cagctgtgc ccacatgtgc aggtcctggc caccttccca tnctggttct ggcgggcagt 10740
	ccccctggac gcttggcca ccagagggtc accattcacc agcagagacn tgaggggcac 10800
	agtggctaag gccgcatgag gcatcacagt cccctgaccg accccatcag cactggattc 10860
10	acccgagggc gtcttctccc tggaggccgt gaggacactg gcacctggct catcgccccg 10920
	cccttcctct gaggcctctg gcctccgttt catctcagct ccagccccct cggcaattt 10980
	acaggccacg tagcagattt a 11001
	<210> 8
	<211> 20
	<212> ADN
15	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Compuesto oligomérico
	<400> 8
	cgtgtctg tgcttagtccc 20
20	<210> 9
	<211> 20
	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
	<220>
25	<223> Compuesto oligomérico
	<400> 9
	ggcaacgtga acaggccaa 20
	<210> 10
	<211> 18
30	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Compuesto oligomérico
	<400> 10
35	gccattgct ggacatgc 18
	<210> 11
	<211> 20

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Compuesto oligomérico  
5 <400> 11  
agccattgc tggacatgca 20  
<210> 12  
<211> 20  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Compuesto oligomérico  
<400> 12  
ttgtccagt cccaggcctc 20  
15 <210> 13  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
20 <223> Compuesto oligomérico  
<400> 13  
cttccgttg gaccctggg 20  
<210> 14  
<211> 20  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Compuesto oligomérico  
<400> 14  
30 gtgcgcgcga gcccgaaatc 20  
<210> 15  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
35 <220>  
<223> Compuesto oligomérico

<400> 15  
atccaagtgc tactgttagta 20  
<210> 16  
<211> 20  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Compuesto oligomérico  
<220>  
10 <221> característica miscelánea  
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20  
<223> n = A, T, C o G  
<400> 16  
nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn 20  
15 <210> 17  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
20 <223> Compuesto oligomérico  
<400> 17  
gccctccatg ctggcacagg 20  
<210> 18  
<211> 20  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Compuesto oligomérico  
<400> 18  
30 agcaaaagat caatccgtta 20  
<210> 19  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
35 <220>  
<223> Compuesto oligomérico

<400> 19  
tacagaaggc tgggccttga 20  
<210> 20  
<211> 20  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Compuesto oligomérico  
<400> 20  
10 atgcattctg cccccaagga 20  
<210> 21  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
15 <220>  
<223> Cebador de PCR  
<400> 21  
tgccgttccc cgctttc 17  
<210> 22  
20 <211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador de PCR  
25 <400> 22  
ctttagtct gtgtgggtca tctg 24  
<210> 23  
<211> 17  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Sonda de PCR  
<400> 23  
catcttcgtc cgcatcg 17  
35 <210> 24  
<211> 21  
<212> ADN

<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador de PCR  
<400> 24

5 cagtgccacc acaacctaag c 21  
<210> 25  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Cebador de PCR  
<400> 25  
agtacttgtc gaaaggctcg ttgca 25  
<210> 26

15 <211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Sonda de PCR

20 <400> 26  
tgctggcccc acctactgag ctg 23  
<210> 27  
<211> 16  
<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador de PCR  
<400> 27  
actgcacccg caacgc 16

30 <210> 28  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>

35 <223> Cebador de PCR  
<400> 28  
cacggagctg gccttcag 18

<210> 29  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
5 <220>  
<223> Sonda de PCR  
<400> 29  
atccacgcga acctgttgtt gtcctt 26  
<210> 30  
10 <211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador de PCR  
15 <400> 30  
gaaccttcga caagtattcc tgct 24  
<210> 31  
<211> 18  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador de PCR  
<400> 31  
gggcaggaga tttggcc 18  
25 <210> 32  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
30 <223> Sonda de PCR  
<400> 32  
ccagacaccc ccgccaataa ca 22

## **REIVINDICACIONES**

1. Un oligonucleótido antisentido con una longitud de 13 a 26 bases nucleicas dirigido a una molécula de ácido nucleico que codifica el GCGR humano, en el que el oligonucleótido comprende una primera región, una segunda región y una tercera región, en el que dicha primera región comprende al menos 11 desoxinucleótidos, en el que dichas segunda y tercera regiones comprenden de 1 a 4 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, flanqueando dichas segunda y tercera regiones la primera región en los extremos 5' y 3' de dicha primera región, en el que dicho oligonucleótido tiene al menos un 85% de complementariedad de secuencia con una región diana dentro de la molécula de ácido nucleico que codifica el GCGR humano, y en el que el oligonucleótido hibrida específicamente al GCGR humano y reduce su expresión.

2. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido comprende una región de desoxinucleótidos con una longitud de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 bases nucleicas.

3. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el oligonucleótido tiene una longitud de 20 bases nucleicas.

4. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 3 **caracterizado por**:

(i) una región de 16 desoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos;

(ii) una región de 18 desoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con un 2'-O-(2-metoxietil) nucleótido;

(iii) una región de 17 desoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con uno o dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos;

(iv) una región de 12 desoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con cuatro 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos; o

(v) una región de 14 desoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con tres 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos.

5. El oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:

(i) al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato;

(ii) todos los enlaces internucleósido son enlaces fosforotioato;

(iii) al menos una citosina es una 5-metilcitosina; o

(iv) todas las citosinas son 5-metilcitosinas.

6. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1, **caracterizado por** una región de 16 desoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos en el que cada enlace internucleótido es un enlace fosforotioato y cada citosina es una 5-metilcitosina.

7. El oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho oligonucleótido tiene al menos el 90%, o al menos el 92%, o al menos el 95%, o al menos el 97%, o al menos el 98%, o al menos el 99% de complementariedad de secuencia con una región diana dentro de la molécula de ácido nucleico que codifica el GCGR humano.

8. El oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el oligonucleótido está dirigido a una molécula de ácido nucleico de ID. SEC. N° 1, ID. SEC. N° 5, ID. SEC. N° 6 o ID. SEC. N° 7.

9. El oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el oligonucleótido está dirigido a una molécula de ácido nucleico de ID. SEC. N° 1.

10. Una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y opcionalmente un vehículo, diluyente, potenciador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, para su uso en la reducción de la expresión del GCGR en tejidos o células.

12. Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 10 en la fabricación de un medicamento para reducir la expresión del GCGR en tejidos o células.

13. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, para su uso en:

- (i) la disminución de los niveles de glucosa en sangre en un animal;
- (ii) el aumento de los niveles de GLP-1 en un animal;
- (iii) la mejora de la sensibilidad a la insulina en un animal;
- (iv) la disminución de los triglicéridos en sangre en un animal;
- 5 (v) la disminución de los niveles de colesterol en sangre en un animal;
- (vi) la prevención o el retardo de la aparición de niveles elevados de glucosa en sangre en un animal; o
- (vii) la protección de la función de las células beta en un animal.

**14.** Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 10 en la fabricación de un medicamento para:

- (i) disminuir los niveles de glucosa en sangre en un animal;
- 10 (ii) aumentar los niveles de GLP-1 en un animal;
- (iii) mejorar la sensibilidad a la insulina en un animal;
- (iv) disminuir los triglicéridos en sangre en un animal;
- (v) disminuir los niveles de colesterol en sangre en un animal;
- (vi) prevenir o retardar la aparición de niveles elevados de glucosa en sangre en un animal; o
- 15 (vii) proteger la función de las células beta en un animal.

**15.** La composición farmacéutica de la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento de un animal que tiene una enfermedad o afección asociada con la actividad del glucagón a través del GCGR.

**16.** Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 10 en la fabricación de un medicamento para tratar a un animal que tiene una enfermedad o afección asociada con la actividad del glucagón a través del GCGR.

**20 17.** La composición farmacéutica de la reivindicación 15 o el uso de la reivindicación 16 en el que:

- (i) la enfermedad o afección es una enfermedad o afección metabólica;
- (ii) la enfermedad o afección es la diabetes, la hiperglucemia, la obesidad, la hiperglucagonemia primaria, la deficiencia de insulina o la resistencia a la insulina; o
- (iii) la enfermedad o afección es la diabetes tipo 2.