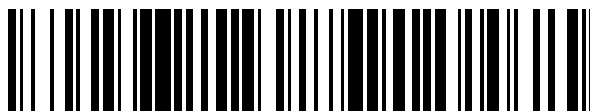


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 101**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04749914 .0**  
96 Fecha de presentación: **15.04.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1622597**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.02.2006**

54 Título: **MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE APOLIPOPROTEÍNA C-III.**

30 Prioridad:  
**16.04.2003 US 418780**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**31.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**31.01.2012**

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

72 Inventor/es:  
**CROOKE, Rosanne, M.;**  
**GRAHAM, Mark, J.;**  
**LEMONIDIS TARBET, Kristina, M. y**  
**DOBIE, Kenneth, W.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 373 101 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 de apolipoproteína C-III

**Campo de la invención**

5 La presente invención proporciona composiciones y procedimientos para modular la expresión de apolipoproteína C-III. En particular, la presente invención se refiere a compuestos, en particular compuestos oligonucleótidos que se hibridan con moléculas de ácidos nucleicos que codifican la apolipoproteína C-III. Dichos compuestos se muestran en el presente documento para modular la expresión de apolipoproteína C-III.

**Antecedentes de la invención**

10 Las lipoproteínas son partículas globulares, similares a micelas, que constan de un núcleo no polar de acilglicérols y ésteres de colesterol rodeado por un recubrimiento anfífilo de proteína, fosfolípido y colesterol. Las lipoproteínas se han clasificado en cinco amplias categorías sobre la base de sus propiedades funcionales y físicas: quilomicrones, que transportan los lípidos de la dieta del intestino a los tejidos; lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL); lipoproteínas de densidad intermedia (IDL); lipoproteínas de baja densidad (LDL); todas ellas transportan triacilglicérols y colesterol del hígado a los tejidos; y lipoproteínas de alta densidad (HDL), que transportan colesterol endógeno de los tejidos al hígado.

15 Las partículas lipoproteicas experimentan un proceso metabólico continuo y tienen propiedades y composiciones variables. Las densidades de las lipoproteínas aumentan sin disminuir el diámetro de partícula debido a que la densidad de sus recubrimientos exteriores es inferior a la del núcleo interno. Los componentes proteicos de las lipoproteínas se conocen como apolipoproteínas. Al menos nueve apolipoproteínas están distribuidas en cantidades significativas entre las diversas lipoproteínas humanas.

20 La apolipoproteína C-III es un constituyente de HDL y de lipoproteínas ricas en triglicéridos y tiene un papel en la eridemia hipertriglicémica, un factor de riesgo de enfermedad arterial coronaria. La apolipoproteína C-III ralentiza la eliminación de lipoproteínas ricas en triglicéridos inhibiendo la lipólisis, tanto inhibiendo la lipoproteína lipasa como interfiriendo en la unión de la lipoproteína a la matriz de glucosaminoglicano de la superficie celular (Shachter, Curr. Opin. Lipidol., 2001, 12, 297-304).

El gen que codifica la apolipoproteína C-III humana (también denominada APOC3, APOC-III, APO CIII y APO C-III) fue clonado en 1984 por tres grupos de investigación (Levy-Wilson y col., DNA, 1984, 3, 359-364; Protter y col., DNA, 1984, 3, 449-456; Sharpe y col., Nucleic Acids Res., 1984, 12, 3917-3932).

30 La secuencia codificante está interrumpida por tres intrones (Protter y col., DNA, 1984, 3, 449-456). El gen de la apolipoproteína C-III humana está ubicado aproximadamente a 2,6 kb en la dirección 3' del gen de la apolipoproteína A-1 y estos dos genes se transcriben de forma convergente (Karathanasis, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1985, 82, 6374-6378). También se clonó una variante de la apolipoproteína C-III humana con mutación Thr74 a Ala74 a partir de un paciente con un nivel inusualmente alto de apolipoproteína C-III en suero. Debido a que la Thr74 está O-glucosilada, el mutante Ala74, por lo tanto, provocó unos niveles aumentados en suero de apolipoproteína C-III que carece del resto carbohidrato (Maeda y col., J. Lipid Res., 1987, 28, 1405-1409).

40 Se han identificado cinco polimorfismos en la región promotora del gen: C(-641) a A, G(-630) a A, T(-625) a eliminación, C(-482) a T y T(-455) a C). Todos estos polimorfismos están en desequilibrio de unión con el polimorfismo SstI en la región 3' no traducida. El sitio SstI distingue los alelos S1 y S2 y el alelo S2 se ha asociado con niveles elevados de triglicéridos en plasma (Dammerman y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1993, 90, 4562-4566). El promotor de apolipoproteína C-III está regulado a la baja por la insulina y este sitio polimórfico anula la regulación de insulina. De este modo, la sobreexpresión potencial de apolipoproteína C-III resultante de la pérdida de regulación de insulina puede ser un factor que contribuya al desarrollo de hipertrigliceridemia asociada con el alelo S2 (Li y col., J. Clin. Invest., 1995, 96, 2601-2605). El polimorfismo T(-455) a C se ha asociado con un aumento del riesgo de enfermedad arterial coronaria (Olivieri y col., J. Lipid Res., 2002, 43, 1450-1457).

45 Además de la insulina, se han identificado otros reguladores de la expresión del gen de la apolipoproteína III. Un elemento de respuesta para el receptor huérfano nuclear rev-erb alfa se ha localizado en las posiciones -23/-18 en la región promotora de la apolipoproteína C-III y el rev-erb alfa disminuye la actividad del promotor de la apolipoproteína C-III (Raspe y col., J. Lipid Res., 2002, 43, 2172-2179). La región promotora de la apolipoproteína C-III -86 a -74 se reconoce por dos factores nucleares CIIIb1 y CIIIb2 (Ogami y col., J. Biol. Chem., 1991, 266, 9640-9646). La expresión de la apolipoproteína C-III está también regulada al alza por retinoides que actúan a través del receptor X retinoide, y las alteraciones en la abundancia del receptor X de retinoides afectan a la transcripción de apolipoproteína C-III (Vu-Dac y col., J. Clin. Invest., 1998, 102, 625-632). Se ha demostrado que la proteína de especificidad 1 (Sp1) y el factor nuclear del hepatocito 4 (HNF-4) actúan de forma sinérgica para transactivar el promotor de la apolipoproteína C-III a través del sitio de unión HNF-4 (Kardassis y col., Biochemistry, 2002, 41, 1217-1228). El HNF-4 también actúa conjuntamente con SMAD3-SMAD4 para transactivar el promotor de la apolipoproteína C-III (Kardassis y col., J. Biol. Chem., 2000, 275, 41405-41414).

Se ha definido adicionalmente el papel de la apolipoproteína C-III en lipólisis usando ratones transgénicos e inactivados. La sobreexpresión de apolipoproteína C-III en ratones transgénicos provoca hipertrigliceridemia y una eliminación deficiente de triglicéridos VLDL (de Silva y col., J. Biol. Chem., 1994, 269, 2324-2335; Ito y col., Science, 1990, 249, 790-793). Los ratones inactivados con una ausencia total de la proteína apolipoproteína C-III mostraron  
5 unos niveles significativamente reducidos de colesterol y triglicéridos en plasma en comparación con ratones de tipo silvestre y estaban protegidos de hipertrigliceridemia posprandial (Maeda y col., J. Biol. Chem., 1994, 269, 23610-23616).

Actualmente no existen agentes terapéuticos conocidos que afecten a la función de la apolipoproteína C-III. Se ha postulado que el efecto hipolipidémico de la clase de fármacos fibrato tiene lugar a través de un mecanismo en el  
10 que el receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR) media el desplazamiento de HNF-4 desde el promotor de apolipoproteína C-III, dando como resultado la supresión transcripcional de la apolipoproteína C-III (Hertz y col., J. Biol. Chem., 1995, 270, 13470-13475). Los fármacos hipolipidémicos de la clase de las estatinas también reducen los niveles de triglicéridos usando un mecanismo desconocido que da como resultado el aumento de ARNm de la lipoproteína lipasa y una disminución de los niveles en plasma de apolipoproteína C-III (Schoonjans y col.,  
15 FEBS Lett., 1999, 452, 160-164). En consecuencia, existe todavía una necesidad de agentes adicionales capaces de inhibir eficazmente la función de la apolipoproteína C-III.

### **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un oligonucleótido antisentido de 20 a 30 bases nitrogenadas de longitud dirigido a una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III, hibridándose específicamente dicho  
20 oligonucleótido con dicha molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III e inhibiendo la expresión de la apolipoproteína C-III, y comprendiendo dicho oligonucleótido una secuencia seleccionada de entre las SEC ID N°: 69, 71, 72, 73, 75, 78, 81, 84, 85, 86, 87 y 88 y tiene una secuencia que es al menos en un 90 % complementaria con dicha molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III.

La presente invención también proporciona un procedimiento de inhibición de la expresión de la apolipoproteína C-III en células o tejidos *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con el oligonucleótido antisentido de la invención de tal modo que se inhiba la expresión de apolipoproteína C-III.  
25

La presente invención también proporciona un oligonucleótido antisentido de la invención para su uso en terapia.

Otros aspectos de la presente invención se establecen en las reivindicaciones.

### **Sumario de la divulgación**

En el presente documento se divulgan composiciones y procedimientos para modular la expresión de apolipoproteína C-III. La tecnología antisentido surge como un medio eficaz para reducir la expresión de productos génicos específicos y es excepcionalmente útil en una serie de aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de investigación para la modulación de la expresión de la apolipoproteína C-III.  
30

La presente divulgación se refiere a compuestos, especialmente oligómeros de ácidos nucleicos y similares a ácidos nucleicos dirigidos a un ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III y que modulan la expresión de la apolipoproteína C-III. También se divulgan composiciones farmacéuticas y de otro tipo que comprenden los compuestos que se divulgan en el presente documento.  
35

También se divulgan procedimientos de análisis de moduladores de apolipoproteína C-III y procedimientos de modulación de la expresión de apolipoproteína C-III en células, tejidos o animales que comprenden poner en contacto dichas células, tejidos o animales con uno o varios compuestos o composiciones de la divulgación. En estos procedimientos, las células o tejidos se ponen en contacto *in vivo*. Alternativamente, las células o tejidos se ponen en contacto *ex vivo*.  
40

También se exponen en el presente documento procedimientos para tratar un animal, en particular un ser humano, sospechoso de tener, o que es propenso a tener, una enfermedad o afección asociada con la expresión de la apolipoproteína C-III. Dichos procedimientos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente o profilácticamente activa de uno o varios de los compuestos o composiciones de la divulgación a una persona con necesidad de tratamiento.  
45

También se divulga un procedimiento para preparar un compuesto de la divulgación que comprende hibridar específicamente *in vitro* una primera cadena de bases nitrogenadas de al menos 8 bases nitrogenadas contiguas a la secuencia establecida en la SEC ID N°: 4 y/o la SEC ID N°: 18 a una segunda cadena de bases nitrogenadas que comprende una secuencia lo suficientemente complementaria a dicha primera cadena de tal modo que se permita una hibridación estable.  
50

También se divulga en el presente documento un compuesto de la invención para su uso en terapia.

También se divulga en el presente documento el uso de un compuesto o composición de la divulgación en la

fabricación de un medicamento para el tratamiento de todas las afecciones divulgadas en el presente documento y de cualquiera de las mismas.

**Descripción detallada**

**A. Visión general**

5 La presente divulgación usa compuestos, preferentemente oligonucleótidos y especies similares, para su uso en la modulación de la función o el efecto de moléculas de ácido nucleico que codifican la apolipoproteína C-III. Esto se realiza proporcionando oligonucleótidos que se hibridan específicamente con una o varias moléculas de ácido nucleico que codifican la apolipoproteína C-III.

10 Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "ácido nucleico diana" y "molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III" se han usado por conveniencia para incluir ADN que codifica la apolipoproteína C-III, ARN (incluidos pre-ARNm o ARNm y porciones de los mismos) transcrito a partir de dicho ADN y también ADNc derivado de dicho ARN.

15 La hibridación de un compuesto de la presente invención con su ácido nucleico diana se denomina generalmente como "antisentido". En consecuencia, el mecanismo incluido en la práctica de realizaciones de la invención se denomina en el presente documento como "inhibición antisentido". Dicha inhibición antisentido se basa típicamente en la hibridación basada en enlaces de hidrógeno de cadenas o segmentos de oligonucleótidos de tal manera que al menos una cadena o un segmento se escinda, se degrade o se vuelva no operativa de cualquier otro modo. A este respecto, es preferente actualmente dirigirse a moléculas específicas de ácido nucleico y a sus funciones para dicha inhibición antisentido.

20 Las funciones de ADN sobre las que se interfiere incluyen replicación y transcripción. La replicación y la transcripción, por ejemplo, pueden ser a partir de una plantilla celular endógena, un vector, un constructo de plásmido o de otro tipo. Las funciones de ARN sobre las que se interfiere pueden incluir funciones tales como translocación del ARN a un sitio de traducción de proteínas, translocación del ARN a sitios dentro de la célula que están distantes del sitio de síntesis de ARN, traducción de proteínas a partir de ARN, ajuste del ARN para proporcionar una o varias especies de ARN y actividad catalítica o formación de complejos que implican al ARN en las que puede estar involucrado, o pueden estar facilitadas por, el ARN. Un resultado preferente de dicha interferencia con la función de ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de apolipoproteína C-III. En el contexto de la presente divulgación, "modulación" y "modulación de la expresión" quieren decir o bien un aumento (estimulación) o una disminución (inhibición) en la cantidad o en los niveles de una molécula de ácido nucleico que codifica el gen, por ejemplo, ADN o ARN. La inhibición es a menudo la forma preferente de modulación de la expresión y el ARNm es a menudo el ácido nucleico diana preferente.

35 En el contexto de la presente invención, "hibridación" significa el apareamiento de cadenas complementarias de compuestos oligoméricos. En la presente invención, el mecanismo preferente de apareamiento implica enlaces de hidrógeno, que pueden ser enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, de Hoogsteen o de Hoogsteen inversos, entre nucleósidos complementarios o bases nitrogenadas (bases nucleótidas) complementarias de las cadenas de compuestos oligoméricos. Por ejemplo, la adenina y la timina son bases nitrogenadas complementarias que se aparean mediante la formación de enlaces de hidrógeno. La hibridación puede tener lugar en diversas circunstancias.

40 Un compuesto antisentido puede hibridarse específicamente cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico diana para provocar una pérdida de actividad, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a las secuencias de ácido nucleico no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico y en condiciones en las que se realizan los ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

45 En la presente invención la expresión "condiciones de hibridación restrictivas" o "condiciones restrictivas" se refiere a condiciones en las que un compuesto de la invención se hibridará a su secuencia diana, pero a un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones restrictivas dependen de la secuencia y son diferentes en circunstancias diferentes. En el contexto de la presente invención, "condiciones restrictivas" en las que los compuestos oligoméricos se hibridan a una secuencia diana se determina por la naturaleza y la composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos en los que se está investigando.

50 "Complementario", tal como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad para un apareamiento preciso entre dos bases nitrogenadas de un compuesto oligomérico. Por ejemplo, si una base nitrogenada en una posición determinada de un oligonucleótido (un compuesto oligomérico) es capaz de formar un enlace de hidrógeno con una base nitrogenada en una posición determinada de un ácido nucleico diana, siendo dicho ácido nucleico diana una molécula de ADN, de ARN o de oligonucleótido, entonces la posición del enlace de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana se considera que es una posición complementaria. El oligonucleótido y la molécula adicional de ADN, ARN u oligonucleótido son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias de cada molécula están ocupadas por bases nitrogenadas que pueden formar enlaces de hidrógeno una con otra. De este modo, "que puede hibridarse específicamente" y "complementario" son expresiones que se

usan para indicar un grado suficiente de apareamientos precisos o complementariedad a lo largo de un número suficiente de bases nitrogenadas de tal modo que tenga lugar una unión estable y específica entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana.

5 Se entiende en la técnica que la secuencia del compuesto antisentido puede ser, pero no necesita ser, complementaria al 100 % a la del ácido nucleico diana para poder hibridarse específicamente. Además, un oligonucleótido puede hibridarse a lo largo de uno o varios segmentos de tal modo que segmentos interpuestos o adyacentes no estén implicados en el evento de hibridación (por ejemplo, una estructura de bucle o estructura de horquilla). En una realización, los compuestos antisentido de la presente divulgación comprenden al menos el 70 %, o al menos el 75 %, o al menos el 80 %, o al menos el 85 % de complementariedad de secuencia a una región diana que se encuentra dentro del ácido nucleico diana. En otra realización, los compuestos antisentido de la presente divulgación comprenden el 90 % de complementariedad de secuencia e, incluso más preferentemente, comprenden el 95 % o al menos el 99 % de complementariedad de secuencia con la región diana que se encuentra dentro de la secuencia de ácido nucleico diana a la que están dirigidos. Preferentemente, los compuestos antisentido comprenden al menos 8 bases nitrogenadas contiguas de un compuesto antisentido divulgado en el presente documento. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de 20 bases nitrogenadas del compuesto antisentido son complementarias a la región diana y, por lo tanto, se hibridaría específicamente, representaría un 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, las bases nitrogenadas no complementarias restantes pueden estar agrupadas o intercaladas entre bases nitrogenadas complementarias y no necesitan ser contiguas entre sí o a bases nitrogenadas complementarias. Como tal, un compuesto antisentido de 18 bases nitrogenadas de longitud que tiene 4 (cuatro) bases nitrogenadas no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría un 77,8 % de complementariedad total con el ácido nucleico diana y estaría, por lo tanto, dentro del alcance de la presente divulgación. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse de forma rutinaria usando los programas BLAST (basic local alignment search tools (herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales)) y los programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul y col., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656).

El porcentaje de homología, de identidad de secuencia o de complementariedad puede determinarse por, por ejemplo, el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 cuatro Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI, Estados Unidos), usando la configuración predeterminada, que usa el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489). En algunas realizaciones preferentes, la homología, la identidad de secuencia o la complementariedad, entre el oligómero y la diana es de entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 60 %. En algunas realizaciones, la homología, la identidad de secuencia o la complementariedad es de entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 70%. En realizaciones preferentes, la homología, la identidad de secuencia o la complementariedad es de entre aproximadamente el 70 % y aproximadamente el 80 %. En realizaciones más preferentes, la homología, la identidad de secuencia o la complementariedad es de entre aproximadamente el 80 % y aproximadamente el 90 %. En realizaciones preferentes, la homología, la identidad de secuencia o la complementariedad es de aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 92 %, de aproximadamente el 94 %, de aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 96 %, de aproximadamente el 97 %, de aproximadamente el 98 % o de aproximadamente el 99 %.

## B. Compuestos

De acuerdo con la presente divulgación, los compuestos incluyen compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), empalmadores alternativos, cebadores, sondas y otros compuestos oligoméricos que se hibridan con al menos una porción del ácido nucleico diana. Como tales, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos de cadena sencilla, de cadena doble circulares o con forma de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias o bucles internos o terminales. Una vez introducidos en un sistema, los compuestos pueden facilitar la acción de una o varias enzimas o proteínas estructurales para efectuar la modificación del ácido nucleico diana.

50 Un ejemplo no limitante de dichas enzimas es la ARNasa H, una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN. Se sabe en la técnica que los compuestos antisentido de cadena sencilla que son "similares a ADN" producen como respuesta ARNasa H. La activación de ARNasa H, por lo tanto, da como resultado una escisión de la diana de ARN, potenciando de este modo enormemente la eficacia de la inhibición mediada por oligonucleótidos de la expresión génica. Se han postulado papeles similares para otras ribonucleasas tales como las de las familias de enzimas ARNasa III y ribonucleasa L.

Aunque la forma preferente de compuesto antisentido es un oligonucleótido monocatenario, en muchas especies la introducción de estructuras bicatenarias, tales como moléculas de ARN bicatenario (ARNds) induce una reducción potente y específica mediada por antisentido de la función de un gen o de sus productos génicos asociados. Este fenómeno tiene lugar tanto en plantas como en animales y se cree que tiene una conexión evolutiva con la defensa contra los virus y el silenciamiento de transposones.

- La primera evidencia de que el ARNs podría provocar el silenciamiento génico en animales se tuvo en 1995 por el trabajo en el nematodo, *Caenorhabditis elegans* (Guo y Kempheus, Cell, 1995, 81, 611-620). Los efectos de interferencia principales del ARNs son postranscripcionales (Montgomery y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 15502-15507). El mecanismo antisentido postranscripcional definido en *Caenorhabditis elegans* resultante de la
- 5 exposición al ARN bicatenario (ARNds) se ha denominado desde entonces ARN de interferencia (ARNi). Se ha generalizado que este término significa silenciamiento génico mediado por antisentido que implica la introducción de ADNds que provoca la reducción específica de secuencia de niveles de ARNm dirigido endógeno (Fire y col., Nature, 1998, 391, 806-811). Recientemente, se ha informado que estos oligómeros de ARN monocatenario de polaridad antisentido de los ARNs son inductores potentes de ARNi (Tijsterman y col., Science, 2002, 295, 694-697).
- 10 En el contexto de la presente invención, la expresión "compuesto oligomérico" se refiere a un polímero u oligómero que comprende una pluralidad de unidades monoméricas. En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o desoxirribonucleico (ADN) o miméticos, quimeras, análogos y homólogos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos por bases nitrogenadas de origen natural, azúcares y enlaces covalentes entre nucleósidos (esqueleto), así como
- 15 oligonucleótidos que no tienen porciones de origen natural que operan de modo similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos son preferentes a menudo sobre las formas nativas debido a unas propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por un ácido nucleico diana y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas.
- Los oligonucleótidos de la presente invención también incluyen oligonucleótidos modificados en los que una base nitrogenada diferente está presente en una o varias de las posiciones de nucleótidos en el oligonucleótido. Por
- 20 ejemplo, si el primer nucleótido es adenosina, pueden producirse oligonucleótidos modificados que contengan timidina, guanosina o citidina en esta posición. Esto puede realizarse en cualquiera de las posiciones del oligonucleótido. Estos oligonucleótidos se analizan después usando los procedimientos descritos en el presente documento para determinar su capacidad para inhibir la expresión de la apolipoproteína C-III.
- 25 Aunque los oligonucleótidos son una forma preferente de los compuestos de la presente divulgación, la presente divulgación comprende también otras familias de compuestos, incluidos, pero no limitados a, análogos y miméticos de oligonucleótidos tales como los que se describen en el presente documento.
- Los compuestos según la divulgación comprenden preferentemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 bases nitrogenadas (es decir, de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleósidos enlazados). Un experto en
- 30 la técnica apreciará que esto abarca compuestos de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 bases nitrogenadas de longitud.
- 35 En una realización preferente, los compuestos tienen de 12 a 50 bases nitrogenadas de longitud. Un experto en la técnica apreciará que esto abarca compuestos de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50 bases nitrogenadas de longitud.
- En una realización preferente, los compuestos tienen de 15 a 30 bases nitrogenadas de longitud. Un experto en la técnica apreciará que esto abarca compuestos de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 bases nitrogenadas de longitud.
- 40 Son compuestos particularmente preferentes los oligonucleótidos de aproximadamente 12 a aproximadamente 50 bases nitrogenadas; son incluso más preferentes los que comprenden de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 bases nitrogenadas.
- Los compuestos antisentido de 8-80 bases nitrogenadas de longitud que comprenden un tramo de al menos ocho (8) bases nitrogenadas consecutivas seleccionadas de entre los compuestos antisentido ilustrativos se consideran
- 45 también compuestos antisentido adecuados.
- Los compuestos antisentido preferentes incluyen secuencias de oligonucleótidos que comprenden al menos las 8 bases nitrogenadas consecutivas desde el extremo 5' de uno de los compuestos antisentido preferentes ilustrativos (siendo las bases nitrogenadas restantes un tramo consecutivo del mismo oligonucleótido que comienza inmediatamente cadena arriba del extremo 5' del compuesto antisentido que puede hibridarse específicamente al
- 50 ácido nucleico diana y que continúa hasta el oligonucleótido que comprende de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 bases nitrogenadas). Similarmente, los compuestos antisentido preferentes están representados por secuencias de oligonucleótidos que comprenden al menos las 8 bases nitrogenadas consecutivas desde el extremo 3' de uno de los compuestos antisentido preferentes ilustrativos (siendo las bases nitrogenadas restantes un tramo consecutivo del mismo oligonucleótido que comienza inmediatamente cadena abajo del extremo
- 55 3' del compuesto antisentido que puede hibridarse específicamente al ácido nucleico diana y que continúa hasta el oligonucleótido que comprende de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 bases nitrogenadas). Pueden encontrarse identificados ejemplos de compuestos de una variedad de fuentes de mamífero, incluido el ser humano, en los ejemplos y enumerados en las tablas 1 a 21. Un experto en la técnica equipado con los compuestos

antisentido preferentes que se ilustran en el presente documento será capaz, sin una experimentación excesiva, de identificar compuestos antisentido preferentes adicionales.

### C. Dianas

5 "Dirigir" un compuesto antisentido a una molécula de ácido nucleico diana que codifica la apolipoproteína C-III, en el contexto de la presente invención, puede ser un proceso de varias etapas. El proceso comienza habitualmente con la identificación de un ácido nucleico diana cuya función es ser modulado. Este ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito a partir de un gen) cuya expresión esté asociada con un trastorno o estado patológico particular, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. En la presente invención, el ácido nucleico diana codifica la apolipoproteína C-III.

10 El proceso de dirección también incluye habitualmente la determinación de al menos una región, segmento o sitio diana dentro del ácido nucleico diana para una interacción antisentido que tenga lugar de tal modo que dé como resultado el efecto deseado, por ejemplo, la modulación de la expresión. Dentro del contexto de la presente invención, el término "región" se define como una porción de un ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identificable. Dentro de las regiones de ácidos nucleicos diana están los segmentos. Los "segmentos" se definen como regiones más pequeñas o subporciones de regiones dentro del ácido nucleico diana. "Sitios", tal como se usa este término en la presente invención, se definen como posiciones dentro de un ácido nucleico diana.

Ya que, tal como se sabe en la técnica, el codón de iniciación de la traducción es típicamente 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcrito; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de iniciación de la traducción también se denomina "codón AUG", el "codón de inicio" o el "codón de inicio AUG". Se ha demostrado que una minoría de genes, que tienen codones de iniciación de la traducción con la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG, y 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG, operan *in vivo*. De este modo "codón de iniciación de la traducción" y "codón de inicio" pueden abarcar muchas secuencias de codones, incluso aunque el aminoácido iniciador en cada caso sean típicamente metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). También se sabe en la técnica que los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de inicio alternativos, cualquiera de los cuales puede usarse con preferencia para la iniciación de la traducción en un tipo celular o tejido particular, o en un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la presente invención, "codón de inicio" y "codón de iniciación de la traducción" se refiere al codón o codones que se usan *in vivo* para iniciar la traducción de un ARNm transcrito a partir de un gen que codifica la apolipoproteína C-III, independientemente de la(s) secuencia(s) de dichos codones. También se sabe en la técnica que un codón de terminación de la traducción (o "codón de detención") de un gen puede tener de una a tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

Las expresiones "región de codón de inicio" y "región de codón de iniciación de la traducción" se refieren a una porción de dicho ARNm o gen que abarca de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') a partir de un codón de iniciación de la traducción. De modo similar, las expresiones "región de codón de detención" y "región de codón de terminación de la traducción" se refieren a una porción de dicho ARNm o gen que abarca de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') a partir de un codón de terminación de la traducción. En consecuencia, la "región de codón de inicio" (o "región de codón de iniciación de la traducción") y la "región de codón de detención" (o "región de codón de terminación de la traducción") son todas las regiones que pueden ser dianas eficaces para los compuestos antisentido que se divulgan en el presente documento.

El marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que se sabe en la técnica que se refiere a la región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación de la traducción, también es una región que puede ser una diana eficaz. Dentro del contexto del presente divulgación, una región preferente es la región intragénica que abarca el codón de iniciación o de terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) de un gen.

45 Otras regiones diana incluyen la región no traducida 5' (5'UTR), conocida en la técnica por referirse a la porción de un ARNm en la dirección 5' a partir de un codón de iniciación de la traducción y que, de este modo, incluye nucleótidos entre el sitio de remate 5' y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen), y la región no traducida 3' (3'UTR), conocida en la técnica por referirse a la porción de un ARNm en la dirección 3' a partir de un codón de iniciación de la traducción y que, de este modo, incluye nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). El sitio de remate 5' de un ARNm comprende un resto de guanosina metilada en N7 unido al resto del extremo 5' del ARNm por medio de un enlace 5'-5' trifosfato. La región de remate 5' de un ARNm se considera que incluye la estructura de remate 5' en sí misma así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes al sitio de remate. También es preferente dirigirse a la región de remate 5'.

55 En consecuencia, la presente divulgación incluye compuestos antisentido que se dirigen a una porción de bases nitrogenadas 1 – 533 tal como se expone en la SEC ID N°: 18. En una realización, los compuestos antisentido se dirigen al menos a una porción de 8 bases nitrogenadas de las bases nitrogenadas 1 - 533 tal como se expone en la SEC ID N°: 18 y las tablas 1 y 4. En otra realización, los compuestos antisentido se dirigen a al menos una porción de bases nitrogenadas de 8 bases nitrogenadas que comprende la región 5' UTR tal como se expone en la SEC ID N°: 18 y

las tablas 1 y 4. En otra realización, los compuestos antisentido se dirigen a al menos una porción de bases nitrogenadas de 8 bases nitrogenadas que comprende la región 3' UTR tal como se expone en la SEC ID N°: 18 y las tablas 1 y 4. En otra realización, los compuestos antisentido se dirigen a al menos una porción de bases nitrogenadas de 8 bases nitrogenadas que comprende la región codificante tal como se expone en la SEC ID N°: 18 y las tablas 1 y 4. En otras realizaciones más, los compuestos antisentido se dirigen a al menos una porción de 8 bases nitrogenadas de un "segmento diana preferente" (tal como se define en el presente documento) tal como se expone en la tabla 3.

Además, la presente divulgación incluye compuestos antisentido que se dirigen a una porción de bases nitrogenadas 1 – 3958 tal como se expone en la SEC ID N°: 4. En una realización, los compuestos antisentido se dirigen al menos a una porción de 8 bases nitrogenadas de las bases nitrogenadas 1 - 3958 tal como se expone en la SEC ID N°: 4 y las tablas 1 y 4. En otra realización, los compuestos antisentido se dirigen a al menos una porción de bases nitrogenadas de 8 bases nitrogenadas que comprende la región 5' UTR tal como se expone en la SEC ID N°: 4 y las tablas 1 y 4. En otra realización, los compuestos antisentido se dirigen a al menos una porción de bases nitrogenadas de 8 bases nitrogenadas que comprende la región 3' UTR tal como se expone en la SEC ID N°: 4 y las tablas 1 y 4. En otra realización, los compuestos antisentido se dirigen a al menos una porción de bases nitrogenadas de 8 bases nitrogenadas que comprende la región codificante tal como se expone en la SEC ID N°: 4 y las tablas 1 y 4. En otras realizaciones más, los compuestos antisentido se dirigen a al menos una porción de 8 bases nitrogenadas de un "segmento diana preferente" (tal como se define en el presente documento) tal como se expone en la tabla 3.

Aunque algunos transcritos de ARNm eucariótico se traducen directamente, muchos contienen uno o varias regiones, conocidas como "intrones" que se escinden de un transcrito antes de traducirse. Las regiones restantes (y, por lo tanto, traducidas) son conocidas como "exones" y se empalman entre sí para formar una secuencia de ARNm continua. Los sitios de ajuste diana, por ejemplo, empalmes intrón-exón o empalmes exón-intrón, también pueden ser particularmente útiles en situaciones en las que el ajuste aberrante está implicado en una enfermedad, o en el que una sobreproducción de un producto de ajuste particular está implicada en una enfermedad. Las uniones de fusión aberrante debidas a reordenamientos o deleciones también son sitios diana preferentes. Los transcritos de producidos mediante el proceso de ajuste de dos (o más) ARNm de diferentes fuentes génicas son conocidos como "transcritos de fusión". También se sabe que los intrones pueden actuar como dianas eficaces usando compuestos antisentido que se dirigen, por ejemplo, a ADN o pre-ARNm.

Los transcritos de ARN alternativos pueden producirse a partir de la misma región genómica de ADN. Estos transcritos alternativos se conocen generalmente como "variantes". Más específicamente, "las variantes pre-ARNm" son transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico que difieren de otros transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico en bien su posición de inicio o bien su posición de detención y contienen tanto secuencias intrónicas como exónicas.

Por medio de la escisión de una o varias regiones exónicas o intrónicas, o porciones de las mismas, durante el ajuste, las variantes de pre-ARNm producen "variantes de ARNm" más pequeñas. En consecuencia, las variantes de ARNm son variantes de pre-ARNm procesadas y cada variante pre-ARNm única debe producir siempre una variante de ARNm única como resultado del ajuste. Estas variantes de ARNm se conocen también como "variantes de ajuste alternativas". Si no tiene lugar un ajuste de la variante de pre-ARNm, entonces la variante de pre-ARNm es idéntica a la variante de ARNm .

Las variantes pueden producirse mediante el uso de señales alternativas para iniciar o detener la transcripción. Los pre-ARNm y ARNm pueden poseer más de un codón de inicio o codón de detención. Las variantes que se origina a partir de pre-ARNm o ARNm que usan codones de inicio alternativos son conocidos como "variantes de inicio alternativas" de ese pre-ARNm o ARNm. Esos transcritos que usan un codón de detención alternativo son conocidos como "variantes de detención alternativas" de ese pre-ARNm o ARNm. Un tipo específico de variante de detención alternativa es la "variante poliA" en la que los múltiples transcritos producidos son el resultado de la selección alternativa de una de las "señales de detención poliA" por la maquinaria de la transcripción, produciendo, por lo tanto, transcritos que terminan en sitios poliA únicos. Dentro del contexto de la divulgación, los tipos de variantes descritos en el presente documento también son ácidos nucleicos diana preferentes.

Las localizaciones del ácido nucleico diana a las que los compuestos antisentido preferentes se hibridan se denominan en adelante en el presente documento "segmentos diana preferentes". Tal como se usa en el presente documento la expresión "segmento diana preferente" se define como al menos una porción de 8 bases nitrogenadas de una región diana a la que se dirige un compuesto antisentido activo. Aunque sin pretender vincularse a ninguna teoría, se cree actualmente que estos segmentos diana representan porciones del ácido nucleico diana que son accesibles para la hibridación.

Aunque las secuencias específicas de determinados segmentos diana preferentes se exponen en el presente documento, un experto en la técnica reconocerá que éstas sirven para ilustrar y describen realizaciones particulares dentro del alcance de la presente divulgación. Los segmentos diana preferentes adicionales pueden ser identificados por un experto.

Los segmentos diana de 8-80 bases nitrogenadas de longitud que comprenden un tramo de al menos ocho (8) bases nitrogenadas consecutivas seleccionadas de entre los segmentos diana preferentes ilustrativos se consideran



también dianas adecuadas.

Los segmentos diana pueden incluir secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos las 8 bases nitrogenadas consecutivas a partir del extremo 5' de uno de los segmentos diana preferentes ilustrativos (siendo las bases nitrogenadas restantes un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que comienza inmediatamente cadena arriba del extremo 5' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contenga de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 bases nitrogenadas). De forma similar, los segmentos diana preferentes están representados por secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos las 8 bases nitrogenadas consecutivas a partir del extremo 3' de uno de los segmentos diana preferentes ilustrativos (siendo las bases nitrogenadas restantes un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que comienza inmediatamente cadena abajo del extremo 3' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contenga de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 bases nitrogenadas). Un experto en la técnica equipado con los segmentos diana preferentes que se ilustran en el presente documento será capaz, sin experimentación excesiva, de identificar segmentos diana preferentes adicionales.

Una vez una o varias regiones, segmentos o sitios diana se haya identificado, se eligen los compuestos antisentido que sean lo suficientemente complementarios a la diana, es decir, que se hibrida lo suficientemente bien y con especificidad suficiente para proporcionar el efecto deseado.

Los compuestos oligoméricos están dirigidos o no están dirigidos a regiones de la secuencia de bases nitrogenadas de la apolipoproteína C-III diana (por ejemplo, tales como las dadas a conocer en los ejemplos 15 y 17) que comprenden las bases nucleótidos 1-50, 51-100, 101-150, 151-200, 201-250, 251-300, 301-350, 351-400, 401-450, 451-500, 501-550, 551-600, 601-650, 651-700, 701-750, 751-800, 801-850, 851-900, 901-950, 951-1000, 1001-1050, 1051-1100, 1101-1150, 1151-1200, 1201-1250, 1251-1300, 1301-1350, 1351-1400, 1401-1450, 1451-1500, 1501-1550, 1551-1600, 1601-1650, 1651-1700, 1701-1750, 1751-1800, 1801-1850, 1851-1900, 1901-1950, 1951-2000, 2001-2050, 2051-2100, 2101-2150, 2151-2200, 2201-2250, 2251-2300, 2301-2350, 2351-2400, 2401-2450, 2451-2500, 2501-2550, 2551-2600, 2601-2650, 2651-2700, 2701-2750, 2751-2800, 2801-2850, 2851-2900, 2901-2950, 2951-3000, 3001-3050, 3051-3100, 3101-3150, 3151-3200, 3201-3250, 3251-3300, 3301-3350, 3351-3400, 3401-3450, 3451-3500, 3501-3550, 3551-3600, 3601-3650, 3651-3700, 3701-3750, 3751-3800, 3801-3850, 3851-3900, 3901-3950, 3951-3958 de SEC ID N°: 4, o cualquier combinación de las mismas.

Además, los compuestos oligoméricos están dirigidos o no están dirigidos a regiones de la secuencia de bases nitrogenadas de la apolipoproteína C-III diana (por ejemplo, tales como las dadas a conocer en los ejemplos 15 y 17) que comprenden las bases nucleótidos 1-50, 51-100, 101-150, 151-200, 201-250, 251-300, 301-350, 351-400, 401-450, 451-500, 501-533 de la SEC ID N°: 18, o cualquier combinación de las mismas.

En una realización, los compuestos oligonucleótidos son 100 % complementarios a estas secuencias o a secuencias pequeñas encontradas dentro de cada una de las secuencias enumeradas anteriormente. Preferentemente, los compuestos antisentido comprenden al menos 8 bases nitrogenadas contiguas de un compuesto antisentido divulgado en el presente documento. En otra realización, los compuestos oligonucleótidos tienen de al menos 3 ó 5 bases nitrogenadas no coincidentes por cada 20 consecutivas en posiciones de bases nitrogenadas individuales a estas regiones diana. Otros compuestos más están dirigidos a regiones de superposición de las porciones identificadas anteriormente de la secuencia de la apolipoproteína C-III.

#### D. Selección y validación de la diana

En una realización adicional, los "segmentos diana preferentes" identificado en el presente documento pueden usarse en un proceso de selección para determinar compuestos adicionales que modulen la expresión de la apolipoproteína C-III. Los "moduladores" son los compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III y que comprende al menos una porción de 8 bases nitrogenadas que es complementaria a un segmento diana preferente. El procedimiento de selección comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana preferente de una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III con uno o más moduladores candidatos y seleccionar uno o varios moduladores candidatos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III. Una vez se demuestre que el modulador o los moduladores candidatos son capaces de modular (por ejemplo, o bien disminuyendo o bien aumentando) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III, el modulador puede usarse en otros estudios de investigación de la función de la apolipoproteína C-III, o como agente de investigación, de diagnóstico o terapéutico según la presente invención.

Los segmentos diana preferentes que se divulgan en la presente invención también pueden combinarse con sus compuestos antisentido complementarios respectivos para formar oligonucleótidos bicatenarios (duplicados) estabilizados.

Se ha demostrado en la técnica que dichos restos de oligonucleótido bicatenario modulan la expresión diana y la traducción regulada, así como el procesamiento de ARN mediante un mecanismo antisentido. Además, los restos bicatenarios pueden ser objeto de modificaciones químicas (Fire y col., Nature, 1998, 391, 806-811; Timmons y Fire, Nature 1998, 395, 854; Timmons y col., Gene, 2001, 263, 103-112; Tabara y col., Science, 1998, 282, 430-431; Montgomery y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 15502-15507; Tuschl y col., Genes Dev., 1999, 13, 3191-

3197; Elbashir y col., Nature, 2001, 411, 494-498; Elbashir y col., Genes Dev. 2001, 15, 188-200). Por ejemplo, se ha demostrado que dichos restos bicatenarios inhiben la diana mediante la hibridación clásica de cadena antisentido del dúplex a la diana, desencadenando, por lo tanto, la degradación enzimática de la diana (Tijsterman y col., Science, 2002, 295, 694-697).

5 Los compuestos de la presente invención también se pueden aplicar en los sectores de descubrimiento de fármacos y la validación de dianas. La presente invención comprende el uso de los compuestos y segmentos dianas preferentes identificados en el presente documento en investigaciones de descubrimiento de fármacos para elucidar la relación que existe entre la apolipoproteína C-III y un estado patológico, fenotipo o afección. Estos procedimientos incluyen detectar o modular la apolipoproteína C-III que comprende poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo  
10 con los compuestos de la presente invención, medir el nivel de ácido nucleico o proteína de apolipoproteína C-III y/o un punto final fenotípico o químico relacionado en un punto temporal después del tratamiento y, opcionalmente, comparar el valor medido con una muestra no tratada o una muestra tratada con un compuesto adicional de la presente invención. Estos procedimientos también pueden realizarse en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el proceso de validación de diana o para  
15 determinar la validez de un producto génico particular como una diana para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, afección o fenotipo particular.

#### **E. Kits, reactivos de investigación, agentes de diagnóstico y agentes terapéuticos**

Los compuestos de la presente invención se usan para agentes de diagnóstico, terapéuticos, de profilaxis y como reactivos de investigación y kits. En una realización, dichos compuestos de la presente invención son útiles en  
20 sectores de obesidad y trastores relacionados con el metabolismo tales como hiperlipidemia. Además, los oligonucleótidos antisentido, que son capaces de inhibir la expresión génica con especificidad exquisita, se usan a menudo por los expertos para elucidar la función de genes particulares o para distinguir entre funciones de varios miembros de una ruta biológica.

Para su uso en kits y agentes de diagnóstico, los compuestos de la presente invención, bien solos o bien en combinación con otros compuestos o productos terapéuticos, se usan como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para elucidar los patrones de expresión de una porción o el complemento total de genes expresados dentro de células y tejidos.  
25

Tal como se usa en el presente documento, el término "sistema" se define como cualquier organismo, célula, cultivo celular o tejido que expresa, o se hace competente para expresar productos del gen que codifica la apolipoproteína C-III. Éstos incluyen, pero no están limitados a, seres humanos, animales transgénicos, células, cultivos celulares, tejidos, xenotransplantes y combinaciones de los mismos  
30

Como un ejemplo no limitante, los patrones de expresión dentro de células o tejidos tratados con uno o varios compuestos antisentido se comparan con células o tejidos control no tratados con compuestos antisentido y los patrones producidos se analizan para determinar niveles diferenciales de expresión génica tal como se aplican, por ejemplo, para asociación de enfermedades, ruta de señalización, localización celular, nivel de expresión, tamaño, estructura o función de los genes examinados. Estos análisis pueden realizarse en células estimuladas o no estimuladas y en presencia o ausencia de otros compuestos que afectan a patrones de expresión.  
35

Los ejemplos de procedimientos de análisis de expresión génica conocidos en la técnica incluyen chips o microchips de ADN (Brazma y Vilo, FEBS Lett., 2000, 480, 17-24; Celis, y col., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16), SAGE (serial analysis of gene expresión (análisis en serie de la expresión génica))(Madden y col., Drug Discov. Today, 2000, 5, 415-425), READS (restriction enzyme amplification of digested cDNAs (amplificación de enzimas de restricción de ADN digeridos) (Prashar y Weissman, Methods Enzymol., 1999, 303, 258-72), TOGA (total gene expression analysis (análisis de expresión génica total)) (Sutcliffe y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 1976-81), chips de proteínas y proteómica (Celis y col., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Jungblut y col., Electrophoresis, 1999, 20, 2100-10), secuenciación de etiquetas de secuencias expresadas (EST) (Celis y col., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson y col., J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57), huella genética de ARN sustractiva (SuRF) (Fuchs y col., Anal. Biochem., 2000, 286, 91-98; Larson y col., Cytometry, 2000, 41, 203-208), clonación sustractiva, presentación diferencial (DD) (Jurecic y Belmont, Curr. Opin. Microbiol., 2000, 3, 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli y col., J. Cell Biochem. Suppl., 1998, 31, 286-96), técnicas de FISH (hibridación fluorescente in situ) (Going y Gusterson, Eur. J. Cancer, 1999, 35, 1895-904) y procedimientos de espectrometría de masas (To, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2000, 3, 235-41).  
40  
45  
50

Los compuestos de la presente invención son útiles para investigación y diagnóstico, debido a que estos compuestos se hibridan con ácidos nucleicos que codifican apolipoproteína C-III. Por ejemplos, los oligonucleótidos que se ha demostrado que se hibridan con la eficacia y en las condiciones que se divulgan en el presente documento como para ser inhibidores eficaces de la apolipoproteína C-III también serán cebadores y sondas eficaces en condiciones que favorecen la amplificación o la detección de genes, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en procedimientos que requieren la detección específica de moléculas de ácidos nucleicos que codifican la apolipoproteína C-III y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios posteriores de la apolipoproteína C-III. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y sondas, de la invención con un ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III  
55

puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Dichos medios pueden incluir la conjugación de una enzima al oligonucleótido, radiomarcado del oligonucleótido o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse los kits que usan dichos medios de detección para detectar el nivel de apolipoproteína C-III en una muestra.

5 También se divulga un procedimiento para preparar un compuesto de la invención que comprende hibridar específicamente *in vitro* una primera cadena de bases nitrogenadas de al menos 8 bases nitrogenadas contiguas de la secuencia establecida en SEQ ID N°: 4 y/o la SEC ID N°: 18 a una segunda cadena de bases nitrogenadas que comprende una secuencia lo suficientemente complementaria a dicha primera cadena de tal modo que se permita una hibridación estable.

10 También se divulga en el presente documento un compuesto de la divulgación para su uso en terapia.

También se divulga en el presente documento el uso de un compuesto o composición de la divulgación en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de todas las afecciones divulgadas en el presente documento y de cualquiera de las mismas.

15 Entre los usos de diagnóstico está la medición de apolipoproteína C-III en pacientes para identificar a los que pueden beneficiarse de una estrategia de tratamiento dirigida a reducir los niveles de apolipoproteína C-III. Dichos pacientes adecuados para diagnóstico incluyen pacientes con hipertrigliceridemia (por ejemplo, para tendencias de diagnóstico para enfermedad arterial coronaria), metabolismo de lípidos anormal, obesidad, hiperlipidemia, entre otros trastornos.

20 La especificidad y sensibilidad de antisentido también se usan de un modo controlado por los expertos en la técnica para usos terapéuticos. Los compuestos antisentido se han usado como restos terapéuticos en el tratamiento de estados patológicos en animales, incluidos seres humanos. Los fármacos de oligonucleótidos antisentido, incluidos ribozimas, se han administrado de un modo inocuo y eficaz a seres humanos y actualmente se están llevando a cabo numerosos ensayos clínicos. De este modo, se ha establecido que los compuestos antisentido pueden ser útiles en modalidades terapéuticas que puede configurarse que son útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

25 Para terapia, un animal, preferentemente un ser humano, sospechoso de tener una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión de la apolipoproteína C-III se trata administrando compuestos antisentido según la divulgación. Por ejemplo, en una realización no limitante, los procedimientos comprenden la etapa de administrar al animal con necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la apolipoproteína C-III. Los inhibidores de la apolipoproteína C-III de la presente divulgación inhiben eficazmente la actividad de la proteína apolipoproteína C-III o inhiben la expresión de la proteína apolipoproteína C-III. Por ejemplo, un compuesto de este tipo que reduzca los niveles de apolipoproteína C-III es útil para prevenir la morbimortalidad de sujetos con trastornos cardíacos. Por ejemplo, tal como se demuestra en los ejemplos, la reducción de apolipoproteína C-III puede dar como resultado la reducción de los niveles de colesterol, triglicéridos y glucosa en el suero. De este modo, los inhibidores de la apolipoproteína C-III son útiles en el tratamiento de hipertrigliceridemia, metabolismo anormal de lípidos, metabolismo anormal de colesterol, aterosclerosis, hiperlipidemia, diabetes, incluida diabetes de tipo 2, obesidad, enfermedad cardiovascular, enfermedad arterial coronaria, entre otros trastornos relacionados con un metabolismo anormal o de otro tipo.

40 En una realización, la actividad o expresión de la apolipoproteína C-III en un animal se inhibe aproximadamente el 10 %. Preferentemente, la actividad o expresión de la apolipoproteína C-III en un animal se inhibe aproximadamente el 30 %. Más preferentemente, la actividad o expresión de la apolipoproteína C-III en un animal se inhibe aproximadamente el 50 %. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión de ARNm de apolipoproteína C-III en al menos el 10 %, en al menos el 20 %, en al menos el 25 %, en al menos el 30 %, en al menos el 40 %, en al menos el 50 %, en al menos el 60 %, en al menos el 70 %, en al menos el 75 %, en al menos el 80 %, en al menos el 85 %, en al menos el 90 %, en al menos el 95 %, en al menos el 98 %, en al menos el 99 % o el 100 %.

50 Por ejemplo, la reducción de la expresión de apolipoproteína C-III puede medirse en suero, tejido adiposo, hígado o cualquier otro fluido corporal, tejido u órgano del animal. Preferentemente, las células presentes en dichos fluidos, tejidos u órganos que están siendo analizados contienen una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III y/o apolipoproteína C-III. Los compuestos de la presente invención pueden usarse en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad eficaz de un compuesto a un diluyente o vehículo adecuado farmacéuticamente aceptable. El uso de los compuestos y procedimientos de la presente invención también pueden ser útiles profilácticamente.

## F. Modificaciones

55 Tal como se sabe en la técnica, un nucleósido es una combinación base-azúcar. La porción de la base del nucleósido es normalmente una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de dichas bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para los nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar unido o bien al resto 2', 3' o 5'-hidroxilo del azúcar. Al formar oligonucleótidos, los grupos fosfato unen

covalentemente nucleósidos adyacentes entre sí formando un compuesto polimérico lineal. A su vez, los extremos respectivos de este compuesto polimérico lineal pueden unirse posteriormente formando un compuesto circular; no obstante, son preferentes, generalmente, los compuestos lineales. Además, los compuestos lineales pueden tener complementariedad de bases nitrogenadas internas y pueden, por lo tanto, plegarse de modo que se produzca un compuesto bicatenario total o parcial. Dentro de los oligonucleótidos, los grupos fosfato se denominan comúnmente formadores del esqueleto entre nucleósidos del oligonucleótido. La unión normal o esqueleto de ARN y ADN es una unión 3' a 5' fosfodiéster.

*Uniones entre nucleósidos modificadas (esqueleto)*

Los ejemplos específicos de compuestos antisentido útiles en la presente invención incluyen oligonucleótidos que contienen esqueletos modificados o uniones entre nucleósidos no naturales. Tal como se definen en la presente memoria descriptiva, los oligonucleótidos que tienen esqueletos modificados incluyen los que mantienen un átomo de fósforo en el esqueleto y los que no tienen un átomo de fósforo en el esqueleto. Para los fines de la presente memoria descriptiva y tal como se refiere a los mismos a veces en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto internucleósido también pueden considerarse oligonucleótidos.

Los esqueletos de oligonucleótidos modificados preferentes que contienen un átomo de fósforo incluyen, por ejemplo fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y de otros alquilo que incluyen fosfonatos de 3'-alquilo, fosfonatos de 5'-alquilo y fosfonatos quirales, fosfinatos, forforamidatos que incluyen 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos que tienen uniones 3'-5' normales, análogos unidos 2'-5' de los mismos y los que tienen polaridad inversa en los que una o varias uniones entre nucleótidos es una unión 3' a 3', 5'a 5' o 2' a 2'. Los oligonucleótidos preferentes que tienen polaridad invertida comprenden una unión 3' a 3' única en la unión entre nucleótidos del extremo 3', es decir, un resto de nucleósido invertido sencillo, que puede ser no básico (la base nitrogenada se ha perdido o tiene un grupo hidroxilo en el sitio de la misma). También están incluidas diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de las uniones que contienen fósforo mencionadas anteriormente incluyen, pero no están limitadas a, los documentos de patente de Estados Unidos Nº: 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.194.599; 5.565.555; 5.527.899; 5.721.218; 5.672.697 y 5.625.050, algunas de las cuales se encuentran en propiedad conjunta con la presente solicitud.

Los esqueletos de oligonucleótidos modificados preferentes que no incluyen un átomo de fósforo en el mismo tienen esqueletos que se forman por uniones entre nucleósidos alquílicas de cadena corta o cicloalquílicas, uniones entre nucleósidos mixtas de heteroátomos y alquilo o cicloalquilo, o una o más uniones entre nucleósidos heteroatómicas o heterocíclicas de cadena corta. Éstos incluyen los que tienen uniones de morfolino (formadas en parte desde la porción de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano, esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metileno formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de riboacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilnimino y metilhidrazon; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes componentes mixtas de N, O, S y CH<sub>2</sub>.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los oligonucleótidos mencionados anteriormente incluyen, pero no están limitadas a, los documentos de patente de Estados Unidos Nº: 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; 5.792.608; 5.646.269 y 5.677.439, algunas de las cuales se encuentran en propiedad conjunta con la presente solicitud.

*Azúcar modificado y uniones entre nucleótidos - miméticos*

En otros miméticos de oligonucleótido preferentes, tanto el azúcar como el enlace entre nucleótidos (es decir, el esqueleto), de las unidades de nucleótidos están reemplazados por grupos nuevos. Las unidades de bases nitrogenadas se mantienen para la hibridación con un ácido nucleico diana apropiado. Un compuesto de este tipo, un mimético de oligonucleótido que se ha demostrado que tiene propiedades de hibridación excelentes, se denomina un ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las bases nitrogenadas se mantienen y están unidas directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno azoicos de la porción de amida del esqueleto. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los compuestos PNA mencionados anteriormente incluyen, pero no están limitadas a, los documentos de patente de Estados Unidos Nº: 5.539.082; 5.714.331 y 5.719.262. También se pueden encontrar enseñanzas sobre compuestos PNA en Nielsen y col., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Son realizaciones preferentes de la invención oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y oligonucleótidos con esqueletos con heteroátomos, y en particular -CH<sub>2</sub>-NH-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>- [conocido como un esqueleto de

metileno (metilimino) o MMI],  $-\text{CH}_2\text{-O-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2-$  y  $-\text{O-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$  [en el que el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como  $-\text{O-P-O-CH}_2-$ ] del documento de patente de Estados Unidos N° 5.489.677 mencionado anteriormente, y los esqueletos de amida del documento de patente de Estados Unidos N° 5.602.240 mencionado anteriormente. También son preferentes los oligonucleótidos que tienen estructuras de esqueleto de morfolino del documento de patente de Estados Unidos N° 5.034.506 mencionado anteriormente.

#### Azúcares modificados

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o varios restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferentes comprenden uno de los grupos siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, pudiendo ser el alquilo, el alqueno y el alquino alquilo  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_{10}$  o alqueno y alquino  $\text{C}_2$  a  $\text{C}_{10}$  sustituidos o no sustituidos. Son particularmente preferentes  $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$  y  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ , en los que n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferentes comprenden uno de los grupos siguientes en la posición 2': alquilo  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_{10}$  inferior, alquilo, alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, o-alcarilo o O-aralquilo inferiores sustituidos, SH,  $\text{SCH}_3$ , OCN, Cl, Br, CN,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{OCF}_3$ ,  $\text{SOCH}_3$ ,  $\text{SO}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{ONO}_2$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{NH}_2$ , heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo comunicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tengan propiedades similares. Una modificación preferente incluye 2'-metoxietoxi (2'-O- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ , también conocido como 2'-O-(2'-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin y col., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504), es decir, un grupo alcoxialcoxi. Una modificación preferente adicional incluye 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo  $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$ , también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en ejemplos más adelante en el presente documento, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetil-amino-etoxi-etilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O- $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$ , que también se describe en ejemplos más adelante en el presente documento.

Otras modificaciones preferentes incluyen 2'-metoxi (2'-O- $\text{CH}_3$ ), 2'-aminopropoxi (2'-O- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 2'-alilo (2'- $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$ ), 2'-O-alilo (2'-O- $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$ ) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación 2' puede estar en la posición arabino (arriba) o en la posición ribo (abajo). Una modificación 2'-arabino es 2'-F. También pueden realizarse modificaciones similares en otras posiciones del oligonucleótido, particularmente en la posición 3' del azúcar del nucleótido del extremo 3' o de oligonucleótidos unidos en 2'-5' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en el sitio del azúcar pentofuranosilo. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no están limitadas a, los documentos de patente de Estados Unidos N°: 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; 5.792.747 y 5.700.920, algunas de las cuales se encuentran en propiedad conjunta con la presente solicitud.

Otra modificación preferente del azúcar incluye ácidos nucleicos inaccesibles (LNA) en los que el grupo 2'-hidroxilo está unido al átomo de carbono 3' o 4' del anillo de azúcar, formando, por lo tanto, un resto de azúcar bicíclico. La unión es preferentemente un grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ )<sub>n</sub> que hace de puente entre el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4', en el que n es 1 ó 2. Los LNA y la preparación de los mismos se describen en las Publicaciones de patente internacional N°. WO 98/39352 y WO 99/14226.

#### 40 Bases nitrogenadas naturales y modificadas

Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de bases nitrogenadas (a menudo denominadas en la técnica simplemente como "bases"). Tal como se usan en el presente documento, bases nitrogenadas "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases purinas adenina (A) y guanina (G) y las bases pirimidinas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las bases nitrogenadas modificadas incluyen otras bases nitrogenadas sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halo-uracilo y citosina, 5-propinil ( $-\text{C}\equiv\text{C-CH}_3$ ) uracilo y citosina y otros derivados de alquino de bases pirimidínicas, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en la posición 8, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en la posición 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaadenina. Otras bases nitrogenadas modificadas incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoti-azin-2(3H)-ona), abrazaderas en G tales como una fenoxazina citidina sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminotoxi)-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 nitrogenadas modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base purina o pirimidina está reemplazada por otros heterociclos, por ejemplo, 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Otras bases nitrogenadas incluyen las divulgadas en el documento de patente de Estados Unidos N° 3.687.808, las divulgadas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, las divulgadas por Englisch y col., Angewandte Chemie, edición internacional, 1991, 30, 613, y las divulgadas por Sanghvi, Y.S.,

capítulo 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas bases nitrogenadas son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos de la invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluidas 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 preferentes, incluso más particularmente si se combinan con modificaciones 2'-O-metoxietil azúcar.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de algunas de las bases nitrogenadas modificadas citadas anteriormente así como otras bases nitrogenadas incluyen, pero no están limitadas a, el documento de patente de Estados Unidos N° 3.687.808 citada anteriormente, así como los documentos de patente de Estados Unidos N°: 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121; 5.596.091; 5.614.617; 5.645.985; 5.830.653; 5.763.588; 6.005.096 y 5.681.941, algunas de las cuales se encuentran en propiedad conjunta con la presente solicitud y el documento de patente de Estados Unidos N° 5.750.692, que se encuentra en propiedad conjunta con la presente solicitud.

#### *Conjugados*

Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica la unión química al oligonucleótido de uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular de los oligonucleótidos. Estos restos o conjugados pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la presente invención incluyen intercaladores, moléculas comunicadoras, poliaminas, polietileno, glicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de oligómeros y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesterol, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, coumarinas y pigmentos. Los grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de la presente invención, incluyen grupos que mejoran la captación, potencian la resistencia a la degradación y/o potencian la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico diana. Los grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de la presente invención, incluyen grupos que mejoran la captación, la distribución, el metabolismo o la excreción de los compuestos de la presente invención. Se divulgan grupos conjugados representativos en la Solicitud de patente internacional PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre de 1992, y en el documento de patente de Estados Unidos N° 6.287.860. Los restos conjugados incluyen, pero no están limitados a, restos lipídicos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietileno glicol, o ácido adamantano acético, un resto palmitílico, o un resto de octadecilamina o de hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la invención también pueden conjugarse con sustancias farmacológicamente activas, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triidobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometicina, un barbiturato, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Los conjugados oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 09/334.130 (presentada el 15 de junio de 1999).

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos conjugados de oligonucleótido incluyen, pero no están limitadas a, los documentos de patente de Estados Unidos N°: 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241. 5.391.723; 5.416.203. 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941, algunas de las cuales se encuentran en propiedad conjunta con la presente solicitud.

#### *Compuestos quiméricos*

No es necesario para todas las posiciones en un compuestos dado estar uniformemente modificado y, de hecho, más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente puede incorporarse en un compuesto individual o incluso en un nucleósido individual dentro de un oligonucleótido.

La presente invención también incluye compuestos antisentido que son compuestos quiméricos. Compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras," en el contexto de la presente invención, son compuestos antisentido, en particular oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta por al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región en la que el oligonucleótido está modificado de modo que confiere sobre el oligonucleótido una resistencia aumentada a la degradación por nucleasa, captación celular aumentada, estabilidad aumentada y/o afinidad de unión aumentada por el ácido nucleico diana. Una región adicional del nucleótido puede

servir con sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplos, la ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN. La activación de la ARNasa H, por lo tanto, da como resultado la escisión de la diana de ARN, potenciando ampliamente de este modo la eficacia de la inhibición mediada por oligonucleótidos de la expresión génica. La escisión de los híbridos ARN:ARN puede, de igual manera, realizarse mediante las acciones de endorribonucleasas, tales como ARNasa L, que escinde tanto el ARN celular como vírico. La escisión de la diana de ARN puede detectarse rutinariamente mediante electroforesis en gel y, si es necesario, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica.

En una realización, los oligonucleótidos quiméricos deseables tienen 20 nucleótidos de longitud, compuestos por una región central que consta de diez 2'-desoxinucleótidos, flanqueados en ambos lados (direcciones 5' y 3') por cinco 2'-metoxietil (2'-MOE) nucleótidos. Las uniones internucleosídicas son fosforioato a lo largo del oligonucleótido y todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas.

En otra realización, determinados oligonucleótidos quiméricos preferentes son los divulgados en los ejemplos del presente documento. Los oligonucleótidos quiméricos particularmente quiméricos son los denominados ISIS 304757, ISIS 304758, ISIS 304755, ISIS304800 y ISIS 304756.

Los compuestos antisentido quiméricos de la presente invención pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos tal como se ha descrito anteriormente. Dichos compuestos también se han denominado en la técnica como híbridos o gapmer. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras híbridas incluyen, pero no están limitadas a, los documentos de patente de Estados Unidos N°: 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356 y 5.700.922, algunas de las cuales se encuentran en propiedad conjunta con la presente solicitud.

## G. Formulaciones

Los compuestos de la invención también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas o de otro tipo, para asistir en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas formulaciones que asisten la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no están limitadas a, los documentos de patente de Estados Unidos N°: 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575 y 5.595.756.

Los compuestos antisentido de la invención comprenden cualesquiera sales farmacéuticamente aceptables, ésteres o sales de dichos ésteres, o cualquier otro compuestos que después de la administración a un animal, incluidos seres humanos, sean capaces de proporcionar (directamente o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o un residuo del mismo. En consecuencia, por ejemplo, la divulgación también se refiere a profármacos y a sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención, a sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos y a otros bioequivalentes. El término "profármaco" indica un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte en una forma activa (es decir, el fármaco) dentro del organismo o de las células del mismo mediante la acción de enzimas endógenas u otros productos químicos y/o condiciones. En particular, las versiones profármaco de los oligonucleótidos de la presente invención se preparan como derivados de SATE [(S-acetil-2-tioetil) fosfato] según los procedimientos divulgados en la Solicitud internacional de patente N° WO 93/24510 de Gosselin y col., publicada el 9 de diciembre de 1993, o en la Solicitud internacional de patente N° WO 94/26764 y el documento de patente de Estados Unidos N° 5.770.713 de Imbach y col.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención: es decir, sales que mantienen la actividad biológica deseada del compuesto progenitor y no imparten efectos toxicológicos no deseados a los mismos. Para oligonucleótidos, los ejemplos preferentes de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en el documento de patente de Estados Unidos N° 6.287.860.

La presente invención también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos antisentido de la invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por una serie de vías dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y de la zona que se va a tratar. La administración puede ser tópica (que incluye oftálmicamente y por membranas mucosas que incluyen la administración vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluyen por nebulizador, intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intreperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular. Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para la administración oral. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas,

geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Los vehículos farmacéuticos, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares convencionales pueden ser necesarios o deseables. Los condones, guantes y similares recubiertos también pueden ser útiles.

5 Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden estar presentes convenientemente en formas de dosificación unidad pueden prepararse según técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de mezclar los ingredientes activos con el/los vehículo(s) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general, las formulaciones se preparan mezclando uniformemente e íntimamente el ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, dar forma al producto.

10 Las composiciones de la presente invención pueden formularse in cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tales como, pero sin limitarse a, comprimidos, cápsulas, cápsulas en gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener, además, sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, incluidas, por ejemplo carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano.

15 La suspensión también puede contener estabilizantes.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, soluciones, emulsiones, espumas y formulaciones que contienen liposomas. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender uno o varios promotores de penetración, vehículos, excipientes y otros ingredientes activos o inactivos.

20 Las emulsiones son típicamente sistemas heterogéneos de un líquido disperso en otro en forma de gotas que generalmente exceden 0,1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersas y el fármaco activo que puede estar presente como solución bien en la fase acuosa, en la fase oleosa o bien por sí mismo como fase separada. Las microemulsiones están incluidas como una realización de la presente invención. Las emulsiones y sus usos son bien conocidas en la técnica y se describen adicionalmente en el

25 documento de patente de Estados Unidos N° 6.287.860.

Las formulaciones de la presente invención incluyen formulaciones liposomales. Tal como se usa en la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta por lípidos anfífilos dispuestos en una bicapa o en bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada a partir de material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición que se va a administrar. Los liposomas

30 catiónicos son liposomas cargados positivamente que se cree que interactúan con moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable. Los liposomas que son sensibles al pH o están cargados negativamente se cree que atrapan el ADN más que acomplejarse con el mismo. Tanto los liposomas catiónicos como los no catiónicos se han usado para proporcionar ADN a las células.

Los liposomas también incluyen liposomas "estabilizados estéricamente", una expresión que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o varios lípidos especializados que, cuando se incorporan a los liposomas, dan como resultado una duración en circulación potenciada con respecto a liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Los ejemplos de liposomas estabilizados estéricamente son aquellos en los que parte de la porción lipídica que forma la vesícula del liposoma comprende uno o varios glucolípidos o está

35 derivatizada con uno o varios polímeros hidrófilos, tales como un resto polietileno glicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en el documento de patente de Estados Unidos N° 6.287.860.

40

Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden incluir tensioactivos. El uso de tensioactivos en productos farmacéuticos, formulaciones y en emulsiones es bien conocidos en la técnica. Los tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en el documento de patente de Estados Unidos N° 6.287.860.

45 En una realización, la presente invención usa diversos potenciadores de la penetración para incluir en la administración eficaz de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos. Además de dirigir la difusión de fármacos no lipófilos a través de membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos. Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como que pertenecen a una de cinco categorías amplias, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no

50 quelantes. Los potenciadores de la penetración se describen adicionalmente en el documento de patente de Estados Unidos N° 6.287.860.

Un experto en la técnica reconocerá que las formulaciones se diseñan rutinariamente según su pretensión de uso, es decir, su vía de administración.

Las formulaciones preferentes para administración tópica incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos de la invención se mezclan con un agente de administración tópico tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y liposomas preferentes incluyen los neutros (por ejemplo dioleoilfosfatidil DOPE etanolamina, dimiristoilfosfatidil colina DMPC, diestearoilfosfatidil colina) los negativos (por ejemplo dimiristoilfosfatidil glicerol DMPG) y los catiónicos (por ejemplo dioleiltetrametilaminopropil DOTAP y



dioleoilfosfatidil etanolamina DOTMA).

Para la administración tópica o de otro tipo, los oligonucleótidos de la invención pueden encapsularse dentro de liposomas o pueden complejarse con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden acomplejarse con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Los ácidos grasos preferentes y sus ésteres, sus sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en el documento de patente de Estados Unidos N° 6.287.860. Las formulaciones tópicas se describen en detalle en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 09/315.298, presentada el 20 de mayo de 1999.

Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o en medios no acuosos, cápsulas, cápsulas en gel, bolsitas, comprimidos o minicompimidos. Pueden ser deseables espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, espesantes o aglutinantes. Las formulaciones orales preferentes son aquellas en las que los oligonucleótidos de la invención se administran conjuntamente con uno o varios potenciadores de la penetración tensioactivos o quelantes. Los tensioactivos preferentes incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos y/o sales biliares de los mismos. Los ácidos/sales biliares y ácidos grasos y sus usos se describen adicionalmente en el documento de patente de Estados Unidos N° 6.287.860, que se incorpora al presente documento en su totalidad. También son preferentes las combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales grasas en combinación con ácidos/sales biliares. Una combinación particularmente preferente es la sal sódica de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Otros potenciadores de la penetración incluyen polioxietileno-9-lauril éter, polioxietileno-20-cetil éter. Los oligonucleótidos de la invención pueden administrarse oralmente, en forma de gránulos que incluye partículas secas pulverizadas o complejos para formar micro o nanopartículas. Los agentes acomplejantes de oligonucleótidos y sus usos se describen adicionalmente en el documento de patente de Estados Unidos N° 6.287.860. Las formulaciones orales para oligonucleótidos y su preparación se describen en detalle en la Solicitud de patente publicadada de Estados Unidos N° 2003/0040497 (27 de febrero, 2003) y sus solicitudes principales; la Solicitud de patente publicadada de Estados Unidos N° 2003/0027780 (6 de febrero, 2003) y sus solicitudes principales; y la Solicitud de patente publicada de Estados Unidos N° 10/071.822, presentada el 8 de febrero, 2002.

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero sin limitarse a, potenciadores de la penetración, compuestos vehículos y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Determinadas realizaciones de la invención proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o varios compuestos oligoméricos y uno o varios de otros agentes quimioterapéuticos que operan mediante un mecanismo no antisentido. Los ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no están limitados a, fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer tales como daunorrubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinosido, bis-cloroetilnitrosurea, busulfan, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostaza nitrogenada, melfalan, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiiurea, desoxicofurformicina, 4-hidroxihiperoxiciclofosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etoposido (VP-16), trimetrexato, irinotecan, topotecan, gemcitabina, teniposida, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usan con los compuestos de la invención, dichos agentes quimioterapéuticos pueden usarse individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo seguido de MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o varios de otros agentes quimioterapéuticos (por ejemplos, 5-FU, MTX y oligonucleótido o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Los fármacos antiinflamatorios, que incluyen, pero no se limitan a, fármacos antiinflamatorios y corticoesteroides, y fármacos antivirales, que incluyen, pero no se limitan a, ribavirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en composiciones de la invención. Las combinaciones de compuestos antisentido y otros fármacos no antisentido también están dentro del ámbito de la presente invención. Pueden usarse juntos o secuencialmente dos o más compuestos combinados.

En otra realización relacionada, las composiciones de la presente invención pueden contener uno o varios compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o varios compuestos antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Alternativamente, las composiciones de la presente invención pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a regiones diferentes del mismo ácido nucleico diana. Se conocen en la técnica numerosos ejemplos de compuestos antisentido. Pueden usarse juntos o secuencialmente dos o más compuestos combinados.

#### H. Dosificación

La formulación de composiciones terapéuticas y su administración subsiguiente (dosificación) se asume que está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. La dosificación depende de la gravedad y de la respuesta del estado patológico que se va tratar, con una duración del curso del tratamiento de varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución del estado patológico. La planificación óptima de la dosificación

pueden calcularse a partir de mediciones de la acumulación de fármaco en el organismo del paciente. Los expertos pueden determinar fácilmente las dosis óptimas, las metodologías de dosificación y las tasas de repetición. Las dosis óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de oligonucleótidos individuales y pueden estimarse, en general, sobre la base de los CE<sub>50</sub> que se ha encontrado que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosis varía de 0,01 µg a 1,00 g por kg de peso corporal y puede administrarse una o más veces al día, a la semana, al mes o al año, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la técnica pueden estimar fácilmente las tasas de repetición para dosificaciones sobre la base del tiempo de residencia medido y las concentraciones de fármaco en fluidos y tejidos corporales. Después de un tratamiento exitoso, puede ser deseable que el paciente se someta a una terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado patológico, en la que el nucleótido se administra en dosis de mantenimiento que varían de 0,01 µg a 1,00 g por kg de peso corporal, una o varias veces al día a una vez cada 20 años.

Mientras la presente invención se ha descrito con especificidad según algunas de sus realizaciones preferentes, los siguientes **ejemplos** sirven sólo como ilustración de la invención y no pretenden limitarla.

### Ejemplos

Los ejemplos que no se refieran directamente a la invención reivindicada están por motivos de comparación e ilustración.

#### Ejemplo 1: Síntesis de fosforamiditas de nucleósido

Los compuestos siguientes, que incluyen fosforamiditas y sus intermedios se prepararon tal como se describe en el documento de patente de Estados Unidos N° 6.426.220 y en la Publicación de patente internacional N° WO 02/36743; 5'-O-dimetoxitritil-timidina intermedio para 5-metil dC amidita, 5'-O-dimetoxitritil-2'-deoxi-5-metilcitidina intermedio para 5-metil-dC amidita, 5'-O-dimetoxitritil-2'-desoxi-N<sup>4</sup>-benzoil-5-metilcitidina penúltimo intermedio para 5-metil dC amidita, [5'-O-(4,4'-dimetoxitriifenilmetil)-2'-O-(2-metoxietil)-5-metiluridin-3'-O-il]-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (5-metil dC amidita), 2'-fluorodesoxiadenosina, 2'-fluorodesoxiguanosina, 2'-fluorouridina, 2'-fluorodesoxicidina, 2'-O-(2-metoxietil) amiditas modificadas, intermedio 2'-O-(2-metoxietil)-5-metiluridina, intermedio penúltimo 5'-O-DMT-2'-O-(2-metoxietil)-5-metiluridina, [5'-O-(4,4'-dimetoxitriifenilmetil)-2'-O-(2-metoxietil)-5-metiluridin-3'-O-il]-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (MOE T amidita), intermedio 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-(2-metoxietil)-5-metiluridina, intermedio penúltimo 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-(2-metoxietil)-N<sup>4</sup>-benzoil-5-metil-citidina, [5'-O-(4,4'-dimetoxitriifenilmetil)-2'-O-(2-metoxietil)-N<sup>4</sup>-benzoil-5-metilcitidin-3'-O-il]-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (MOE 5-Me-C amidita), [5'-O-(4,4'-dimetoxitriifenilmetil)-2'-O-(2-metoxietil)-N<sup>6</sup>-benzoiladenosin-3'-O-il]-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (MOE A amidita), [5'-O-(4,4'-dimetoxitriifenilmetil)-2'-O-(2-metoxietil)-N<sup>4</sup>-isobutirilguanosa-3'-O-il]-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (MOE G amidita), 2'-O-(aminooxietil) nucleósido amiditas y 2'-O-(dimetilaminooxietil) nucleósido amiditas, 2'-(dimetilaminooxietoxi) nucleósido amiditas, 5'-O-terc-butildifenilsilil-O<sup>2</sup>-2'-anhidro-5-metiluridina, 5'-O-terc-butildifenilsilil-2'-O-(2-hidroxietil)-5-metiluridina, 2'-O-[(2-ftalimidoxi)etil]-5'-t-butildifenilsilil-5-metiluridina, 5'-O-terc-butildifenilsilil-2'-O-[(2-formadroximinooxi)etil]-5-metiluridina, 5'-O-terc-butildifenilsilil-2'-O-[N,N-dimetilaminooxietil]-5-metiluridina, 2'-O-(dimetilaminooxietil)-5-metiluridina, 5'-O-DMT-2'-O-(dimetilaminooxietil)-5-metiluridina, 5'-O-DMT-2'-O-(2-N,N-dimetilaminooxietil)-5-metiluridina-3'-O-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita], 2'-(aminooxietoxi) nucleósido amiditas, N<sup>2</sup>-isobutiril-6-O-difenilcarbamoil-2'-O-(2-etilacetil)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)guanosina-3'-O-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita], 2'-dimetilaminoetoxietoxi (2'-DMAEOE) nucleósido amiditas, 2'-O-[2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)etil]-5-metil uridina, 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-[2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)-etil]-5-metil uridina y 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-[2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)-etil]-5-metil uridina-3'-O-(cianoetil-N,N-diisopropil) fosforamidita.

#### Ejemplo 2: Oligonucleótidos y síntesis de oligonucleótidos

Los compuestos antisentido que se usan según la presente invención pueden prepararse conveniente y rutinariamente mediante técnicas bien conocidas de síntesis en fase sólida. El equipo para dicha síntesis se comercializa por parte de varias empresas, incluida, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA, Estados Unidos). Puede usarse adicional o alternativamente cualquier otro medio para dicho síntesis conocido en la técnica. Es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y sus derivados alquilados.

Oligonucleótidos: Los oligonucleótidos de fosfodiéster (P=O) no sustituidos y sustituidos se sintetizan en un sintetizador de ADN automático (Applied Biosystems modelo 394) usando química estándar de fosforamidita con oxidación por yodo.

Los fosforotioatos (P=S) se sintetizan de forma similar a los oligonucleótidos de fosfodiéster con las siguientes excepciones: la tiación se efectuó usando una solución al 10 % p/v de 1,1-dióxido de 3,4-dihidro-2-benzoditiol-3-ona en acetonitrilo para la oxidación de los enlaces de fosfito. El tiempo de la etapa de reacción de tiación se aumentó a 180 s y fue precedida por la etapa normal de remate. Después de escisión a partir de la columna CPG y desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55 °C (12-16 h), los oligonucleótidos se recuperaron por precipitación con >3 volúmenes de etanol de una solución 1 M de NH<sub>4</sub>OA. Los oligonucleótidos de fosfinato se preparan tal como se describe en el documento de patente de Estados Unidos N° 5.508.270.

Los oligonucleótidos de fosfonato de alquilo se preparan tal como se describe en el documento de patente de

Estados Unidos N° 4.469.863.

Los oligonucleótidos de fosfonato de 3'-desoxi-3'-metileno se preparan tal como se describe en los documentos de patente de Estados Unidos N° 5.610.289 ó 5.625.050.

5 Los oligonucleótidos de fosforamidita se preparan tal como se describe en los documentos de patente de Estados Unidos N° 5.256.775 ó 5.366.878.

Los oligonucleótidos de fosfonotioato de alquilo se preparan tal como se describe en las Solicitud de patente internacional N° PCT/US94/00902 y PCT/US93/06976 (publicadas como WO 94/17093 y WO 94/02499, respectivamente).

10 Los oligonucleótidos de 3'-desoxi-3'-amino fosforamidato se preparan tal como se describe en el documento de patente de Estados Unidos N° 5.476.925. Los oligonucleótidos de fosfotriéster se preparan tal como se describe en el documento de patente de Estados Unidos N° 5.023.243.

Los oligonucleótidos de borano fosfato se preparan tal como se describe en los documentos de patente de Estados Unidos N° 5.130.302 y 5.177.198.

15 Oligonucleósidos: Los oligonucleósidos unidos a metilendimetilimino, también identificados como oligonucleósidos unidos a MMI, los oligonucleósidos unidos a metilendimetilhidrazo, también identificados como oligonucleósidos unidos a MDH y los oligonucleósidos unidos a metilencarbonilamino, también identificados como oligonucleósidos unidos a amida-3 y los oligonucleósidos unidos a metilaminocarbonilo, también identificados como oligonucleósidos unidos a amida-4, así como compuestos de esqueleto mixto que tienen, por ejemplo, uniones alternas MMI y P=O o P=S se preparan tal como se describe en los documentos de patente de Estados Unidos N° 5.378.825, 5.386.023, 5.489.677, 5.602.240 y 5.610.289.

20 Los oligonucleósidos unidos a formacetal y tiformacetal se preparan tal como se describe en los documentos de patente de Estados Unidos N° 5.264.562 y 5.264.564.

Los oligonucleótidos unidos a óxido de etileno se preparan tal como se describe en el documento de patente de Estados Unidos N° 5.223.618.

### 25 **Ejemplo 3: Síntesis de ARN**

En general, la química de síntesis de ARN se base en la incorporación selectiva de varios grupos protectores en reacciones intermedias estratégicas. Aunque un experto en la técnica entenderá el uso de grupos protectores en síntesis orgánica, una clase útil de grupos protectores incluye silil éteres. En particular, se usan silil éteres voluminosos para proteger el 5'-hidroxilo en combinación con un grupo protector de ortoéster lábil frente a ácidos en el 2'-hidroxilo. Este conjunto de grupos protectores se usa, entonces, con tecnología de síntesis en fase sólida estándar. Es importante eliminar, por último, el grupo protector de ortoéster lábil frente a ácidos después de todas las etapas de síntesis. Además, el uso temprano de grupos protectores de sililo durante la síntesis asegura la eliminación sencilla cuando se desee, sin la desprotección no deseada del 2' hidroxilo.

30 Siguiendo esté procedimiento para proteger secuencialmente el 5'-hidroxilo en combinación con la protección del 2'-hidroxilo mediante grupos protectores que se eliminan diferencialmente y son lábiles químicamente de modo diferencial, se sintetizaron los oligonucleótidos de ARN.

Los oligonucleótidos de ARN se sintetizan en etapas. Cada nucleótido se añade secuencialmente (dirección 3' a 5') a un oligonucleótido unido a un soporte sólido. El primer nucleósido del extremo 3' de la cadena se une covalentemente a un soporte sólido. Se añaden el precursor de nucleótidos, una fosforamidita de ribonucleósido, y el activador, que acopla la segunda base en el extremo 5' del primer nucleósido. El soporte se lava y cualquier grupo 5'-hidroxilo no reaccionado se remata con anhídrido acético para proporcionar restos 5'-acetilo. La unión se oxida después para proporcionar una unión más estable y deseada en última instancia P(V). Al final del ciclo de adición de nucleótidos, el grupo 5'-sililo se escinde con fluoruro. El ciclo se repite para cada nucleótido subsiguiente.

45 Siguiendo con la síntesis, los grupos protectores de metilo en los fosfatos se escinden en 30 minutos usando 2-carbamoil-2-cianoetileno-1,1-ditiolato de disodio trihidrato (S<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>) 1 M en DMF. La solución de desprotección se lava a partir del oligonucleótido unido al soporte sólido usando agua. Después, el soporte se trata con metilamina al 40 % en agua durante 10 minutos a 55 °C. Esto libera los oligonucleótidos de ARN a la solución, desprotege las aminas exocíclicas y modifica los grupos 2'. En este estado pueden analizarse los oligonucleótidos mediante HPLC de intercambio aniónico.

50 Los grupos 2'-ortoéster son los últimos grupos de protección que se eliminan. El grupo protector de ortoéster de monoacetato de etilenglicol desarrollado por Dharmacon Research, Inc. (Lafayette, CO, Estados Unidos) es un ejemplo de un grupo protector de ortoéster útil que tiene las siguientes propiedades importantes. Es estable en las condiciones de síntesis de fosforamidita de nucleósidos y la síntesis de oligonucleótidos. No obstante, después de la síntesis de oligonucleótido, el oligonucleótido se trata con metilamina, que no sólo escinde el oligonucleótido del

soporte sólido, sino que también elimina los grupos acetilo de los ortoésteres. Los sustituyentes 2-etilhidroxilo resultantes en el ortoéster son menos electroaceptores que su precursor acetilado. Como resultado, el ortoéster modificado se vuelve más lábil frente a la hidrólisis catalizada por ácidos. Específicamente, la velocidad de escisión es aproximadamente 10 veces más rápida después de eliminar los grupos acetilo. Por lo tanto, este ortoéster posee suficiente estabilidad con el fin de ser compatible con la síntesis de oligonucleótidos y ahora, cuando se modifica subsiguientemente, permite que la desprotección se realice en condiciones acuosas relativamente templadas compatibles con el producto de oligonucleótido de ARN final.

Adicionalmente, los procedimientos de síntesis de ARN son bien conocidos en la técnica (Scaringe, S. A. Ph.D. Thesis, Universidad de Colorado, 1996; Scaringe, S. A. y col., J. Am. Chem. Soc, 1998, 120, 11820-11821; Matteucci, M. D. y Caruthers, M. H. J. Am. Chem. Soc, 1981, 103, 3185-3191; Beaucage, S. L. y Caruthers, M. H. Tetrahedron Lett., 1981, 22, 1859-1862; Dahl, B. J. y col., Acta Chem. Scand. 1990, 44, 639-641; Reddy, M. P. y col., Tetrahedron Lett., 1994, 25, 4311-4314; Wincott, F. y col., Nucleic Acids Res., 1995, 23, 2677-2684; Griffin, B. E. y col., Tetrahedron, 1967, 23, 2301-2313; Griffin, B. E. y col., Tetrahedron, 1967, 23, 2315-2331).

Los compuestos antisentido de ARN (oligonucleótidos de ARN) de la presente invención pueden sintetizarse mediante los procedimientos del presente documento o adquirirse de Dharmacon Research, Inc (Lafayette, CO, Estados Unidos). Una vez sintetizados, los compuestos de ARN complementarios pueden alinearse después mediante procedimientos conocidos en la técnica para formar compuestos antisentido bicatenarios (duplicados). Por ejemplo, los dúplex pueden formarse combinando 30 µl de cada una de las cadenas complementarias de oligonucleótidos de ARN (solución de oligonucleótidos de ARN 50 µM) y 15 µl de tampón de alineación 5X (acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM, pH 7,4, acetato de magnesio 2 mM) seguido de calentamiento durante 1 minuto a 90 °C, después 1 hora a 37 °C. Los compuestos antisentido duplicados resultantes pueden usarse en kits, ensayos, análisis u otros procedimientos para investigar el papel de un ácido nucleico diana.

#### Ejemplo 4: Síntesis de oligonucleótidos quiméricos

Los oligonucleótidos sintéticos, oligonucleósidos u oligonucleótidos/oligonucleósidos mixtos de la invención pueden ser de varios tipos diferentes. Estos incluyen un primer tipo en el que el segmento "hueco" de nucleósidos unidos se posiciona entre los segmentos "flanco" 5' y 3' de nucleósidos unidos y un segundo tipo de "extremo abierto" en el que el segmento "hueco" se localiza bien en el extremo 3' o bien en el 5' del compuesto oligomérico. Los oligonucleótidos del primer tipo también se conocen en la técnica como "gapmers" u oligonucleótidos con huecos. Los oligonucleótidos del segundo tipo también se conocen en la técnica como "hemimers" o "wingmers".

#### 30 Oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos de [2'-O-Me]--[2'-desoxi]--[2'-O-Me]

Los oligonucleótidos quiméricos que tienen segmentos de oligonucleótidos de 2'-O-alkil fosforotioato y de 2'-desoxi fosforotioato se sintetizan usando un sintetizador de ADN automático de Applied Biosystems modelo 394, como anteriormente. Los oligonucleótidos se sintetizan usando el sintetizador automático y 2'-desoxi-5'-dimetoxitritil-3'-O-fosforamidita para la porción de ADN y 5'-dimetoxitritil-2'-O-metil-3'-O-fosforamidita para los flancos 5' y 3'. El ciclo de síntesis estándar se modifica incorporando etapas de acoplamiento con tiempos de reacción aumentados para la 5'-dimetoxitritil-2'-O-metil-3'-O-fosforamidita. El oligonucleótido totalmente protegido se escinde del soporte y se desprotege en amoniaco concentrado (NH<sub>4</sub>OH) durante 12-16 h a 55 °C. El oligo desprotegido se recupera después usando un procedimiento apropiado (precipitación, cromatografía en columna, volumen reducido al vacío y se analiza espectrofotométricamente para determinar el rendimiento y la pureza por electroforesis capilar y espectrometría de masas.

#### Oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos de [2'-O-(2-metoxietil)]--[2'-desoxi]--[2'-O-(metoxietil)]

Los oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos de [2'-O-(2-metoxietil)]--[2'-desoxi]--[2'-O-(metoxietil)] se prepararon igual que en el procedimiento anterior para oligonucleótidos quiméricos de 2'-O-metilo con la sustitución de 2'-O-(metoxietil) amiditas por las 2'-O-metil amiditas.

#### 45 Oligonucleótidos quiméricos de [2'-O-(2-metoxietil)fosfodiéster]--[2'-desoxi fosforotioato]--[2'-O-(metoxietil)fosfodiéster]

Los oligonucleótidos quiméricos de [2'-O-(2-metoxietil)fosfodiéster]--[2'-desoxi fosforotioato]--[2'-O-(metoxietil)fosfodiéster] se prepararon igual que en el procedimiento anterior para oligonucleótidos de 2'-O-metilo quiméricos con la sustitución de 2'-O-(metoxietil) amiditas por las 2'-O-metil amiditas, oxidación con yodo para generar las uniones entre nucleótidos fosfodiéster dentro de las porciones de los flancos de las estructuras quiméricas y la sulfuración usando 1,1-dióxido de 3,4-dihidro-2H-pyridin-2-ona (Beaucage Reagent) para generar las uniones fosforotioato entre nucleótidos para el hueco central.

Otros oligonucleótidos quiméricos, oligonucleósidos quiméricos y oligonucleótidos/oligonucleósidos quiméricos mixtos se sintetizan según el documento de patente de Estados Unidos N° 5.623.065.

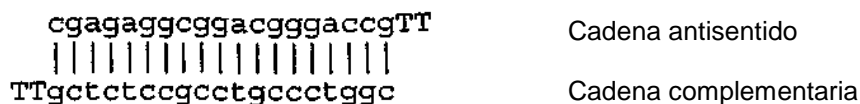
#### 55 Ejemplo 5: Diseño y selección de compuestos antisentido duplicados dirigidos a la apolipoproteína C-III

Una serie de dúplex de ácidos nucleicos que comprende los compuestos antisentido de la presente divulgación y sus complementos se diseña para dirigirse a la apolipoproteína C-III. La secuencia de bases nitrogenadas de la cadena antisentido del dúplex comprende al menos una porción de un oligonucleótido en la tabla 1. Los extremos de las cadenas pueden modificarse por adición de una o varias bases nitrogenadas para formar un saliente. Después, la cadena en sentido correcto del ARNs se diseña y se sintetiza como el complemento de la cadena antisentido y también puede contener modificaciones o adiciones en cada extremo. Por ejemplo, en una realización, ambas cadenas del dúplex de ARNs serían complementarias con respecto a las bases nitrogenadas centrales, teniendo cada una salientes en uno de los extremos o en ambos.

5

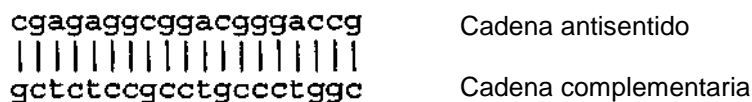
10

Por ejemplo, un dúplex que comprende una cadena antisentido que tiene la secuencia CGAGAGGCGGACGGGACCG (SEC ID N°: 465) y que tiene un saliente de dos bases nitrogenadas de desoxitimidina (dT) tendría las estructuras siguientes (secuencia antisentido SEC ID N°: 466, secuencia complementaria SEC ID N°: 467):



15

En otra realización, un dúplex que comprende una cadena antisentido que tiene la misma secuencia CGAGAGGCGGACGGGACCG (SEC ID N°: 465) puede prepararse con extremos romos (ningún saliente de cadena sencilla) tal como se muestra (secuencia antisentido SEC ID N°: 465, secuencia complementaria SEC ID N°: 468):



20

25

Las cadenas de ARN del dúplex pueden sintetizarse mediante procedimientos divulgados en el presente documento o adquirirse de Dharmacon Research Inc., (Lafayette, CO, Estados Unidos). Una vez sintetizadas, las cadenas complementarias se alinean. Las cadenas sencillas se dividen en partes alícuotas y se diluyen a una concentración 50 µM. Una vez diluidas, se combinan 30 µl de cada cadena con 15 µl de una solución 5X de tampón de alineación. La concentración final de dicho tampón es acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM, pH 7,4, y acetato de magnesio 2 mM. El volumen final es de 75 µl. Esta solución se incuba durante 1 minuto a 90 °C y después se centrifuga durante 15 minutos. El tubo se deja asentar durante 1 hora a 37 °C y al final de dicho periodo se usan los dúplex de ARNs en experimentación. La concentración final del dúplex de ARNs es 20 µM. Esta solución puede almacenarse congelada (-20 °C) y descongelarse hasta 5 veces.

Una vez preparados, los compuestos antisentido duplicados se evalúan para determinar su capacidad de modulación de la expresión de la apolipoproteína C-III.

30

Cuando las células han alcanzado un 80 % de confluencia, se tratan con compuestos antisentido duplicados de la invención. Para células cultivadas en placas de 96 pocillos, los pocillos se lavan una vez con 200 µl de medio de suero reducido OPTI-MEM-1™ (Gibco BRL) y después se tratan con 130 µl de medio OPTI-MEM-1™ que contiene 12 µg/ml de reactivo LIPOFECTIN™ (Gibco BRL) y el compuesto antisentido dúplex deseado a una concentración final de 200 nM. Después de 5 horas de tratamiento, el medio se reemplaza con medio reciente. Las células se recogen 16 horas después del tratamiento, en dicho momento se aísla el ARN y se mide la reducción de diana por RT-PCR.

**35 Ejemplo 6: Aislamiento de oligonucleótidos**

40

Después de la escisión a partir del soporte sólido de vidrio poroso controlado y de desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55 °C durante 12-16 horas, los oligonucleótidos u oligonucleótidos se recuperan por precipitación de NH<sub>4</sub>OAC 1 M con >3 volúmenes de etanol. Los oligonucleótidos sintetizados se analizaron por electroscopía de masas por electropulverización (determinación del peso molecular) y por electroforesis en gel capilar y se determinó que eran al menos en el 70 % material de cadena completa. Las cantidades relativas de uniones fosforotioato y fosfodiéster obtenidas en la síntesis se determinaron mediante la relación del peso molecular correcto con respecto al producto de -16 uma (+/-32 +/-48). Para algunos estudios los oligonucleótidos se purificaron por HPLC, tal como se describe por Chiang y col., J. Biol. Chem. 1991, 266, 18162-18171. Los resultados obtenidos con material purificado por HPLC fueron similares a los obtenidos con material no purificado por HPLC.

**45 Ejemplo 7: Síntesis de oligonucleótidos. Formato de placas de 96 pocillos**

50

Los oligonucleótidos se sintetizaron mediante química de fosoramidita en fase sólida P(III) en un sintetizador automático capaz de ensamblar 96 secuencias simultáneamente en un formato de 96 pocillos. Las uniones entre nucleótidos fosfordiéster se realizaron por oxidación con yodo acuoso. Las uniones entre nucleótidos fosforotioato se generaron por sulfuración usando 1,1-dióxido de 3,4-dihidro-2-benzoditioil-3-ona (Beaucage Reagent) en acetonitrilo anhidro. Las beta-cianoetil-diiso-propil fosoramiditas protegidas de bases se adquirieron de proveedores comerciales (por ejemplo, PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos, o Pharmacia, Piscataway, NJ, Estados Unidos).

Los nucleósidos no estándar se sintetizaron como para los procedimientos estándar o patentados. Se utilizan como beta-cianoetil-diisopropil fosforamiditas protegidas de bases.

5 Los oligonucleótidos se escindieron del soporte y se desprotegeron con  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado a temperatura elevada (55-60 °C) durante 12-16 horas y el producto liberado se secó después al vacío. El producto seco se resuspendió después en agua estéril para proporcionar una placa maestra a partir de la cual se diluyeron después todas las muestras de placas analíticas y de ensayo usando un pipeteador automático.

#### **Ejemplo 8: Análisis de oligonucleótidos. Formato de placas de 96 pocillos**

10 La concentración de oligonucleótidos en cada pocillo se evaluó por dilución de muestras y espectroscopía de absorción UV. La integridad de longitud completa de los productos individuales se evaluó por electroforesis capilar (CE) bien en un formato de 96 pocillos (aparato Beckman P/ACE™ MDQ) o bien, para muestras preparadas individualmente, en un aparato de CE comercial (por ejemplo, un aparato Beckman P/ACE™ 5000, ABI 270). La composición de la base y el esqueleto se confirmó por análisis de masas de los compuestos usando espectroscopía de masas con electropulverización. Todos las placas de ensayo se diluyeron a partir de la placa maestra usando pipeteadores robóticos de varios canales. Se consideró que las placas eran aceptables si al menos el 85 % de los compuestos de la placa tenían al menos el 85 % de longitud completa.

#### **Ejemplo 9: Cultivo celular y tratamiento de oligonucleótidos**

20 El efecto de compuestos antisentido en la expresión de ácidos nucleicos diana pueden analizarse en cualquiera de entre una variedad de tipos celulares siempre que el ácido nucleico esté presente en niveles medibles. Esto puede determinarse rutinariamente usando, por ejemplo, PCR o inmunotransferencia (Northern). Los tipos celulares siguientes se proporcionan por fines ilustrativos, pero pueden usarse rutinariamente otros tipos celulares, siempre que la diana se exprese en el tipo celular elegido. Esto puede determinarse fácilmente mediante procedimientos de rutina en la técnica, por ejemplo inmunotransferencia (Northern), ensayos de protección de ribonucleasa o RT-PCR.

Células T-24:

25 Se obtuvo la línea celular T-24 de carcinoma de vejiga de células transicionales humanas de la Colección estadounidense de cultivos tipo (ATCC) (Manassas, VA, Estados Unidos). Las células T-24 se cultivaron de forma rutinaria en medio basal 5A de McCoy (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) suplementado con suero de carnero fetal al 10 % (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), penicilina (100 unidades por ml) y estreptomycin (100 microgramos por ml) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Las células se sometieron rutinariamente a tripsinización y a dilución cuando alcanzaron una confluencia del 90 %. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon-primaria N° 353872) a una densidad de 7.000 células/pocillo para su uso en análisis RT-PCR.

30 Para el análisis de inmunotransferencia (Northern) u otros análisis, las células se siembran en placas de cultivo de tejidos de 100 mm o de otro tamaño estándar y se tratan de forma similar usando volúmenes apropiados de medio y oligonucleótido.

35 Células A549:

40 Se obtuvo la línea celular A549 de carcinoma de pulmón humano de la Colección estadounidense de cultivos tipo (ATCC) (Manassas, VA, Estados Unidos). Las células A549 se cultivaron de forma rutinario en medio basal DMEM (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) suplementado con suero de carnero fetal al 10 % (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), penicilina (100 unidades por ml) y estreptomycin (100 microgramos por ml) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Las células se sometieron rutinariamente a tripsinización y a dilución cuando alcanzaron una confluencia del 90 %.

Células NHDF:

45 Se obtuvieron fibroblastos dérmicos de recién nacido humano (NHDF) de Clonetics Corporation (Walkersville, MD, Estados Unidos). Los NHDF se mantuvieron rutinariamente en medio de crecimiento de fibroblastos (Clonetics Corporation, Walkersville, MD, Estados Unidos) suplementado tal como recomienda el proveedor. Las células se mantuvieron durante hasta 10 pasos tal como recomienda el proveedor.

Células HEK:

50 Se obtuvieron queratinocitos embiónicos humanos (NHDF) de Clonetics Corporation (Walkersville, MD, Estados Unidos). Los HEK se mantuvieron rutinariamente en medio de crecimiento de queratinocitos (Clonetics Corporation, Walkersville, MD, Estados Unidos) formulado tal como recomienda el proveedor. Las células se mantuvieron durante hasta 10 pasos tal como recomienda el proveedor.

Células HepG2:

Se obtuvo la línea celular HepG2 de hepatoblastoma humano de la Colección estadounidense de cultivos tipo (ATCC)

(Manassas, VA, Estados Unidos). Las células HepG2 se cultivaron rutinariamente en MEM de Eagle suplementado con suero de carnero fetal al 10 %, aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio 1 mM (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD, Estados Unidos). Las células se sometieron rutinariamente a tripsinización y a dilución cuando alcanzaron una confluencia del 90 %. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon-primaria N° 3872) a una densidad de 7.000 células/pocillo para su uso en análisis RT-PCR.

5 Para el análisis de inmunotransferencia (Northern) u otros análisis, las células se siembran en placas de cultivo de tejidos de 100 mm o de otro tamaño estándar y se tratan de forma similar usando volúmenes apropiados de medio y oligonucleótido.

Células Hep3B:

10 Se obtuvo la línea celular Hep3B de carcinoma hepatocelular humano de la Colección estadounidense de cultivos tipo (ATCC) (Manassas, VA, Estados Unidos). Las células Hep3B se cultivaron de forma rutinaria en MEM de Dulbecco de alta concentración de glucosa suplementado con suero de carnero fetal al 10 %, L-glutamina e clorhidrato de piridoxina (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD, Estados Unidos). Las células se sometieron rutinariamente a tripsinización y a dilución cuando alcanzan una confluencia del 90 %. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (Falcon-primaria N° 3846) a una densidad de 50.000 células/pocillo para su uso en análisis de RT-PCR.

15 Para el análisis de inmunotransferencia (Northern) u otros análisis, las células se siembran en placas de cultivo de tejidos de 100 mm o de otro tamaño y se tratan de forma similar usando volúmenes apropiados de medio y oligonucleótido.

Hepatocitos de ratón primarios:

20 Los hepatocitos de ratón primarios se prepararon a partir de ratones CD-1 adquiridos de Charles River Labs (Wilmington, MA, Estados Unidos) y se cultivaron de forma rutinaria en DMEM, de alta concentración de glucosa (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) suplementado con suero de bovino fetal al 10 % (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 100 unidades por ml de penicilina y 100 microgramos por ml de espectomicina (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Las células se cultivaron hasta un 80 % de confluencia para su uso en experimentos de transfección de oligonucleótidos antisentido.

25 Para el análisis de inmunotransferencia (Northern) u otros análisis, las células se siembran en placas de cultivo de tejidos de 100 mm o de otro tamaño y se tratan de forma similar usando volúmenes apropiados de medio y oligonucleótido.

Hepatocitos de rata primarios:

30 Los hepatocitos de rata primarios se prepararon a partir de ratas Sprague-Dawley adquiridas de Charles River Labs (Wilmington, MA, Estados Unidos) y se cultivaron rutinariamente en DMEM, de alta concentración de glucosa (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) suplementado con suero de bovino fetal al 10 % (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 100 unidades por ml de penicilina y 100 microgramos por ml de espectomicina (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Las células se cultivaron hasta un 80 % de confluencia para su uso en experimentos de transfección de oligonucleótidos antisentido.

35 un 80 % de confluencia para su uso en experimentos de transfección de oligonucleótidos antisentido.

Tratamiento con compuestos antisentido:

40 Cuando las células alcanzaron un 65 – 75 % de confluencia, se trataron con oligonucleótidos. Para células cultivadas en placas de 96 pocillos, los pocillos se lavaron una vez con 100 µl de medio de suero reducido OPTI-MEM™-1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y después se trataron con 130 µl de OPTI-MEM™-1 de medio que contenía 3,75 µg/ml de reactivo LIPOFECTIN™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y la concentración deseada de oligonucleótido. Las células se tratan y los datos se obtienen por triplicado. Después de 4-7 horas de tratamiento a 37 °C, el medio se reemplaza con medio reciente. Las células se recogieron 16-24 horas después del tratamiento con oligonucleótido.

45 La concentración de oligonucleótido usado varía de línea celular a línea celular. Para determinar la concentración óptima de oligonucleótido para una línea celular particular, las células se trataron con un oligonucleótido de control positivo a una variedad de concentraciones. Para células humanas el oligonucleótido de control positivo se selecciona de bien ISIS 13920 (**TCCGT-CATCGCTCCTCAGGG**, SEC ID N°: 1) que está dirigido a H-ras humano, o bien ISIS 18078, (**GT-GCGCGGAGCCCGAAATC**, SEC ID N°: 2) que está dirigido a quinasa Jun-N-terminal 2 (JNK2) humana. Ambos controles con 2'-O-metoxietil *gapmers* (2'-O-metoxietilos se muestran en negrita) con un esqueleto de fosforotioato. Para células de ratón o rata, el oligonucleótido de control positivo es ISIS 15770, **ATGCATTCTGCCCCAAAGGA**, SEC ID N°: 3, un 2'-O-metoxietil *gapmer* (2'-O-metoxietilo se muestra en negrita) con un esqueleto de fosforotioato que está dirigido a c-raf tanto de ratón como de rata. La concentración de oligonucleótido de control positivo que da como resultado un 80 % de inhibición de ARNm de c-H-ras (para ISIS 13920), JNK2 (para ISIS 18078) o c-raf (para ISIS 15770) se usa después como la concentración para seleccionar nuevos nucleótidos en experimentos subsiguientes para esa línea celular. Si no se logra una inhibición del 60 %, la concentración más baja de oligonucleótido de control positivo que da como resultado una inhibición del 60 % de

55 nuevos nucleótidos en experimentos subsiguientes para esa línea celular. Si no se logra una inhibición del 60 %, la concentración más baja de oligonucleótido de control positivo que da como resultado una inhibición del 60 % de

ARNm de c-H-ras, JNK2 o c-raf se usa después como la concentración para seleccionar nuevos nucleótidos en experimentos subsiguientes para esa línea celular. Si no se logra el 60 % de inhibición, esa línea celular particular se considera inadecuada para los experimentos de transfección de oligonucleótidos. Las concentraciones de oligonucleótidos antisentido que se usan en el presente documento son de 50 nM a 300 nM.

**5 Ejemplo 10: Análisis de la inhibición con oligonucleótidos de la expresión de apolipoproteína C-III**

La modulación antisentido de la expresión de apolipoproteína C-III puede analizarse mediante una variedad de formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los niveles de ARNm de apolipoproteína C-III pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante análisis de inmunotransferencia (Northern), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva o PCR en tiempo real (RT-PCR). Actualmente es preferente la PCR cuantitativa en tiempo real. El análisis de ARN puede realizarse sobre el ARN celular total o ARNm de poli(A)+. El procedimiento preferente de análisis de ARN de la presente invención es el uso del ARN celular total tal como se describe en otros ejemplos del presente documento. Los procedimientos de aislamiento son bien conocidos en la técnica. El análisis de inmunotransferencia (Northern) también es rutinario en la técnica. La PCR cuantitativa en tiempo real se realiza usando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM™ 7600, 7700 ó 7900, disponible de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos, y se usa de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los niveles proteicos de la apolipoproteína C-III pueden cuantificarse de una variedad de formas bien conocidas en la técnica, tales como inmunoprecipitación, análisis de inmunotransferencia (Western), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o selección celular activada por fluorescencia (FACS). Los anticuerpos dirigidos a la apolipoproteína C-III pueden identificarse y obtenerse a partir de una variedad de fuentes, tales como el catálogo MSRS de anticuerpos (Aerie Corporation, Birmingham, MI, Estados Unidos), o pueden prepararse usando procedimientos de generación de anticuerpos monoclonales y policlonales convencionales bien conocidos en la técnica.

**Ejemplo 11: Diseño de ensayos fenotípicos y estudios *in vivo* para el uso de inhibidores de apolipoproteína C-III**

**25 *Ensayos fenotípicos***

Una vez se han identificado los inhibidores de apolipoproteína C-III usando los procedimientos divulgados en el presente documento, los compuestos se analizan adicionalmente en uno o varios ensayos fenotípicos, teniendo cada uno puntos finales medibles que predicen la eficacia en el tratamiento de un estado patológico o trastorno particular. Los ensayos fenotípicos, kits y reactivos para su uso son bien conocidos por los expertos en la técnica y se usan en el presente documento para analizar el papel y/o la asociación de apolipoproteína en estados de salud y de enfermedad. Los ensayos fenotípicos representativos que pueden adquirirse de uno cualquiera de entre varios proveedores comerciales incluyen los ensayos para determinar la viabilidad celular, la citotoxicidad, la proliferación o supervivencia celular (Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos; PerkinElmer, Boston, MA, Estados Unidos), ensayos basados en proteínas que incluyen ensayos enzimáticos (Panvera,-LLC, Madison, WI, Estados Unidos; BD Bio-sciences, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos; Oncogene Research Products, San Diego, CA, Estados Unidos), regulación celular, transducción de señales, inflamación, procesos oxidativos y apoptosis (Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI, Estados Unidos), acumulación de triglicéridos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), ensayos de angiogénesis, ensayos de formación de tubos, ensayos de citocinas y hormonas y ensayos de metabolismo (Chemicon International Inc., Temecula, CA, Estados Unidos; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, Estados Unidos).

En un ejemplos no limitante, las células que se ha determinado que son apropiadas para un ensayo fenotípico particular (es decir, células MCF-7 seleccionadas para estudios de cáncer de mama; adipocitos para estudios de obesidad) se tratan con inhibidores de la apolipoproteína C-III identificados a partir de estudios *in vitro* y compuestos control a concentraciones óptimas que se determinan usando los procedimientos descritos anteriormente. Al final del periodo de tratamiento, las células tratadas y no tratadas se analizan usando uno o varios procedimientos específicos para el ensayo para determinar los resultados y puntos finales fenotípicos.

Los puntos finales fenotípicos incluyen cambios en la morfología celular en función del tiempo o de la dosis de tratamiento, así como cambios en niveles de componentes celulares tales como proteínas, lípidos, ácido nucleicos, hormonas, sacáridos o metales. Las mediciones del estado celular, que incluyen pH, estado del ciclo celular, captación o excreción de indicadores biológicos por la célula, son también puntos finales de interés.

El análisis del genotipo de la célula (medición de la expresión de uno o varios de los genes de la célula) después del tratamiento también se usa como indicador de la eficacia o potencia de los inhibidores de apolipoproteína C-III. Los genes caracterizadores o los genes sospechosos de estar asociados con un estado patológico, trastorno o fenotipo específico se miden tanto en células tratadas como en células no tratadas.

**55 *Estudios in vivo***

Los sujetos individuales de los estudios *in vivo* descritos en el presente documento son animales vertebrados de sangre caliente que incluyen seres humanos.



El ensayo clínico se somete a controles rigurosos para asegurar que no se ponga en riesgo innecesariamente a los individuos y que éstos estén informados de su papel en el estudio. Para justificar los efectos psicológicos de los tratamientos que se van a recibir, a los voluntarios se les administró aleatoriamente placebo o inhibidor de la apolipoproteína C-III. Además, para evitar que los médicos estuvieran predispuestos con respecto a los tratamientos, no se les informó de si la medicación que van a administrar es un inhibidor de la apolipoproteína C-III o un placebo. Usando este enfoque de aleatoriedad, cada voluntario tiene la misma posibilidad de que se le administre el nuevo tratamiento o el placebo.

Los voluntarios reciben bien el inhibidor de apolipoproteína C-III o placebo durante un periodo de ocho semanas y se miden parámetros biológicos asociados con el estado patológico o trastorno indicado al comienzo (mediciones de línea bases antes de cualquier tratamiento, al final (después del tratamiento final) y a intervalos regulares durante el periodo de estudio. Dichas mediciones incluyen los niveles de moléculas de ácido nucleico que codifican la apolipoproteína C-III o los niveles de proteína apolipoproteína C-III en fluidos corporales, tejidos y órganos en comparación con los niveles de antes del tratamiento. Otras mediciones incluyen, pero no están limitadas a, índices del estado patológico o trastorno que hay que tratar, peso corporal, tensión arterial, valoraciones en suero de indicadores farmacológicos de enfermedad o toxicidad, así como mediciones de ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción).

La información registrada de cada paciente incluye edad (años), sexo, altura (cm), historial familiar del estado patológico o trastorno (sí/no), valoración de motivación (alguna/moderada/grande) y número y tipo de regímenes de tratamiento previos para la enfermedad o el trastorno indicado.

Los voluntarios que toman parte en este estudio son adultos sanos (edad: 18 a 65 años) y participan en el estudio un número aproximadamente igual de varones que de mujeres. Los voluntarios con determinadas características se distribuyen equitativamente entre el tratamiento con placebo y el tratamiento con inhibidor de apolipoproteína C-III. En general, los voluntarios tratados con placebo no presentan una respuesta al tratamiento o ésta es pequeña, mientras que los voluntarios tratados con inhibidor de apolipoproteína C-III muestran tendencias positivas en el índice del estado patológico o trastorno al finalizar el estudio.

#### **Ejemplo 12: Aislamiento de ARN**

##### *Aislamiento de ARNm de Poli(A)+*

Se aisló ARNm de Poli(A)+ de acuerdo con Miura y col., (Clin. Chem., 1996, 42, 1758-1764). Otros procedimientos para aislar ARNm de poli(A)+ son rutinarios en la técnica. Brevemente, para células cultivadas en placas de 96 pocillos, el medio de cultivo se eliminó de las células y cada pocillo se lavó con 200 µl de PBS frío. Se añadieron a cada pocillo 60 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 110 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM, NaCl 0,5 M, NP-40 al 0,5 %, complejo vanadil-ribonucleósido 20 mM), la placa se agitó vigorosamente y después se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos. Se transfirieron 55 µl de lisado a placas de 96 pocillos recubiertas con Oligo d(T) (AGCT Inc., Irvine, CA, Estados Unidos). Las placas se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con 200 µl de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM, NaCl 0,3 M). Después del lavado final, la placa se transfirió a toallas de papel para eliminar el exceso de tampón de lavado y después se secaron al aire durante cinco minutos. Se añadieron a cada pocillo 60 µl de tampón de elución (Tris-HCl 5 mM, pH 7,6), precalentados a 70 °C, la placa se incubó sobre una placa caliente a 90 °C y el eluato se transfirió después a una placa nueva de 96 pocillos.

Las células cultivadas en placas estándar de 100 mm o de otro tamaño pueden tratarse de forma similar usando volúmenes apropiados de todas las soluciones.

##### *Aislamiento de ARN total*

El ARN total se aisló usando un kit RNEASY 96™ y tampones adquiridos de Qiagen Inc. (Valencia, CA, Estados Unidos) siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante. Brevemente, para células cultivadas en placas de 96 pocillos, el medio de crecimiento se retiró de las células y cada pocillo se lavó con 200 µl de PBS frío. Se añadieron a cada pocillo 150 µl de tampón RLT y la placa se agitó vigorosamente durante 20 segundos. Después se añadieron a cada pocillo 150 µl de etanol al 70 % y los contenidos se mezclaron pipeteando tres veces hacia arriba y hacia abajo. Después se transfirieron las muestras a una placa RNEASY 96™ de 96 pocillos unida a un colector QIAVAC™ equipado con una bandeja de recogida de desechos y unido a una fuente de vacío. Se aplicó vacío durante 1 minuto. Se añadieron 500 µl de tampón RW1 a cada pocillo de la placa RNEASY 96™ y se incubaron durante 15 minutos y se aplicó de nuevo vacío durante 1 minuto. Se añadieron 500 µl adicionales de tampón RW1 a cada pocillo de la placa RNEASY 96™ y se aplicó vacío durante 2 minutos. Después se añadió 1 ml de tapón RPE a cada pocillo de la placa RNEASY 96™ y se aplicó vacío durante un periodo de 90 segundos. Después se repitió el lavado con tampón RPE y se aplicó vacío durante 3 minutos adicionales. Después se retiró la placa del colector QIAVAC™ y se transfirió sobre toallas de papel para que se secase. Después se volvió a unir la placa al colector QIAVAC™ equipado con una gradilla de tubos de recolección que contenía tubos de recolección de 1,2 ml. Después se eluyó el ARN pipeteando 140 µl de ARNasa exenta de agua a cada pocillo, incubando durante 1 minuto y, después, aplicando vacío durante 3 minutos.

Las etapas repetitivas de pipeteo y elución pueden automatizarse usando un aparato QIAGEN® Bio-Robot™ 9604

(Qiagen, Inc., Valencia, CA, Estados Unidos). Esencialmente, después de lisar las células en la placa de cultivo, la placa se transfiere a una cubierta robótica en la que se llevaron a cabo las etapas de pipeteo, tratamiento de ADNasa y de elución.

### Ejemplo 13: Análisis de PCR cuantitativa en tiempo real de niveles de ARNm de apolipoproteína C-III

5 La cuantificación de los niveles de ARNm de apolipoproteína C-III se realizó por PCR cuantitativa en tiempo real usando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM™ 7600, 7700 ó 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Éste es un sistema de detección por fluorescencia, de tubo cerrado, no basado en gel, que permite la cuantificación de alto rendimiento de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Al contrario que la PCR estándar, en la que los productos de amplificación se cuantifican después de completar la PCR, los productos en PCR cuantitativa en tiempo real se cuantifican según se van acumulando. Esto se realiza incluyen en la reacción PCR una sonda oligonucleótido que se alinea específicamente entre los cebadores de PCR directos e inversos y contiene dos colorantes fluorescentes. Un colorante informador (por ejemplo, FAM o JOE, obtenidos bien de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos, bien de Operon Technologies Inc., Alameda, CA, Estados Unidos, o bien de Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, Estados Unidos) se une al extremo 5' de la sonda y el colorante inactivador (por ejemplo, TAMRA, obtenido bien de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos, bien de Operon Technologies Inc., Alameda, CA, Estados Unidos, o bien de Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, Estados Unidos) se une al extremo 3' de la sonda. Cuando la sonda y los colorantes están intactos, la emisión del colorante informador se inactiva por la proximidad del colorante inactivador 3'. Durante la amplificación, el alineamiento de la sonda con la secuencia diana crea un sustrato que puede escindirse por la actividad de 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa. Durante la fase de extensión del ciclo de amplificación por PCR, la escisión de la sonda por Taq polimerasa libera el colorante informador del resto de la sonda (y, en consecuencia, del resto inactivador) y se genera la señal fluorescente específica de secuencia. Con cada ciclo, las moléculas informadoras adicionales se escinden de sus sondas respectivas y se realiza un seguimiento de la intensidad de la fluorescencia a intervalos regulares mediante un láser óptico integrado en un sistema de detección de secuencia ABI PRISM™. En cada ensayo, una serie de reacciones paralelas que contienen diluciones de señal de ARNm de las muestras de control no tratadas genera una curva estándar que se usa para cuantificar el porcentaje de inhibición después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido de las muestras de ensayo.

30 Antes del análisis por PCR cuantitativa, los conjuntos cebador-sonda específicos del gen diana que se analiza se evalúan para determinar su capacidad de ser "multiplexados" con una reacción de amplificación GAPDH. En la multiplexación, tanto el gen diana como el gen patrón interno GAPDH se amplifican simultáneamente en una muestra única. En este análisis, el ARNm aislado de células no tratadas se diluye serialmente. Cada dilución se amplifica en presencia de conjuntos cebador-sonda específicos de GAPDH sólo, del gen diana sólo ("monoplexación") o de ambos (multiplexación). Siguiendo la amplificación por PCR, se generan curvas estándar de señal de GAPDH y ARNm diana como función de la dilución de las muestras monoplexadas y multiplexadas. Si tanto la pendiente y el coeficiente de correlación de las señales de GAPDH y diana generadas de las muestras multiplexadas están dentro del 10 % de sus valores correspondientes generados de muestras monoplexadas, el conjunto cebador-sonda específico para esa diana se considera multiplexable. También se conocen en la técnica otros procedimientos de PCR.

40 Los reactivos de PCR se obtuvieron de Invitrogen Corporation, (Carlsbad, CA, Estados Unidos). Las reacciones de RT-PCR se realizaron añadiendo 20 µl de cóctel de PCR (2,5 x tampón PCR menos MgCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> 6,6 mM, dATP, dCTP, dGTP y dTTP, cada uno 375 µM, cebador directo y cebador inverso, cada uno 375 nM, sonda 125 nM, 4 unidades de inhibidor de ARNasa, 1,25 unidades de PLAT-INUM® Taq, 5 unidades de transcriptasa inversa MuLV y 2,5 x colorante ROX) a placas de 96 pocillos que contenían 30 µl de solución de ARN total (20-200 ng). La reacción a tiempo real se llevó a cabo por incubación durante 30 minutos a 48 °C. Siguiendo a 10 minutos de incubación a 95 °C para activar el PLATINUM® Taq, se llevaron a cabo 40 ciclos de un protocolo de PCR de dos etapas: 95 °C durante 15 segundos (desnaturalización) seguidos de 60 °C durante 1,5 minutos (alineamiento/extensión).

50 Las cantidades de diana génica obtenidas por RT-PCR en tiempo real se normalizan usando bien el nivel de expresión de GAPDH, un gen cuya expresión es constante, o bien cuantificando el ARN total usando el reactivo RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR, Estados Unidos). La expresión de GAPDH se cuantifica por RT-PCR en tiempo real, operando simultáneamente con la diana, multiplexación, o por separado. El ARN total se cuantifica usando reactivo de cuantificación de ARN RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR, Estados Unidos). Los procedimientos de cuantificación de ARN usando reactivo RiboGreen™ se enseñan en Jones, L.J. y col., (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374).

55 En este ensayo, se pipetea 170 µl de reactivo de trabajo RiboGreen™ (reactivo RiboGreen™ diluido 1:350 en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) a una placa de 96 pocillos que contiene 30 µl de ARN molecular purificado. La placa se lee en un lector CytoFluor 4000 (PE Applied Biosystems) con excitación a 485 nm y emisión a 530 nm.

60 Las sondas y los cebadores de apolipoproteína C-III humana se diseñaron para que se hibridaran con una secuencia de apolipoproteína C-III humana usando información de secuencias publicada (nucleótidos 6238608 a 6242565 de la secuencia de número de acceso del GenBank NT\_035088.1, que se incorpora al presente documento como SEC ID N°:

4). Para la apolipoproteína C-III humana los cebadores de PCR fueron: cebador directo: TCAGCTTCATGCAGGGTTACAT (SEC ID N°: 5) cebador inverso: ACGCTGCTCAGTGCATCCT (SEC ID N°: 6) y la sonda PCR fue: FAM-AAGCACGCCACCAAGACCGCC-TAMRA (SEC ID N°: 7) en la que FAM es el colorante fluorescente y TAMRA es el colorante inactivador. Para GAPDH humano los cebadores PCR fueron: cebador directo: GAAGGTGAAGGTCCGAGTC (SEC ID N°: 8) cebador inverso: GAAGATGGTGATGGGATTTT GGGTCTCGCTCCT-GGAAGAT (SEC ID N°: 9) y la sonda PCR fue: 5' JOE-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC- TAMRA 3' (SEC ID N°: 10) en la que JOE es el colorante fluorescente y TAMRA es el colorante inactivador.

Las sondas y los cebadores de apolipoproteína C-III de ratón se diseñaron para que se hibridaran con una secuencia de apolipoproteína C-III de ratón usando información de secuencias publicada (número de acceso del GenBank L04150.1, que se incorpora al presente documento como SEC ID N°: 11). Para la apolipoproteína C-III de ratón los cebadores de PCR fueron: cebador directo: TGCAGGGCTACATGGAACAA (SEC ID N°: 12) cebador inverso: CGGACTCCTGCACGCTACTT (SEC ID N°: 13) y la sonda PCR fue: FAM-CTCAA-GACGGTCCAGGATGCGC-TAMRA (SEC ID N°: 14) en la que FAM es el colorante fluorescente informador y TAMRA es el colorante inactivador. Para GAPDH de ratón los cebadores PCR fueron:

cebador directo: GGCAAATTCAACGGCACAGT (SEC ID N°: 15)

cebador inverso: GGGTCTCGCTCCTGGAAGAT (SEC ID N°: 16) y la sonda PCR fue: 5' JOE-AAGGCCGA-GAATGGGAAGCTTGTCATC- TAMRA 3' (SEC ID N°: 17) en la que JOE es el colorante fluorescente informador y TAMRA es el colorante inactivador.

#### **Ejemplo 14: Análisis de inmunotransferencia (Northern) de niveles de ARNm de apolipoproteína C-III**

Dieciocho horas después del tratamiento antisentido, las monocapas celulares se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron en 1 ml de reactivo RNAZOL™ (TEL-TEST "B" Inc., Friendswood, TX, Estados Unidos). El ARN total se preparó siguiendo protocolos recomendados por el fabricante. Se fraccionaron veinte microgramos de ARN total por electroforesis a través de geles de agarosa al 1,2 % que contenían formaldehído al 1,1 % usando un sistema tampón MOPS (AMRESCO, Inc. Solon, OH, Estados Unidos). El ARN se transfirió del gel a membranas de nailon HYBOND™-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, Estados Unidos) mediante transferencia capilar durante la noche usando un sistema tampón de transferencia Northern/Southern (TEL-TEST "B" Inc., Friendswood, TX, Estados Unidos). La transferencia de ARN se confirmó mediante visualización UV. Las membranas se fijaron mediante reticulación UV usando un reticulador UV STRATALINKER™ 2400 (Stratagene, Inc, La Jolla, CA, Estados Unidos) y después se analizaron usando solución de hibridación QUICKHYB™ (Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos) usando las recomendaciones del fabricante para condiciones restrictivas.

Para detectar la apolipoproteína C-III humana se preparó una sonda específica de apolipoproteína PCR humana usando el cebador directo TCAGCTTCATGCAGGGTTACAT (SEC ID N°: 5) y el cebador inverso ACGCTGCTCAGTGCATCCT (SEC ID N°: 6). Para normalizar por variaciones en la eficacia en la carga y la transferencia se retiraron membranas y se analizaron para evaluar el ARN de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) humano (Clontech, Palo Alto, CA, Estados Unidos).

Para detectar la apolipoproteína C-III de ratón se preparó una sonda específica de apolipoproteína PCR de ratón usando el cebador directo TGCAGGGCTACATGGAACAA (SEC ID N°: 12) y el cebador inverso CGGACTCCT-GCAGCTACTT (SEC ID N°: 13). Para normalizar por variaciones en la eficacia en la carga y la transferencia se retiraron membranas y se analizaron para evaluar el ARN de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de ratón (Clontech, Palo Alto, CA, Estados Unidos). Las membranas hibridadas se visualizaron y cuantificaron usando un aparato PHOSPHORIMAGER™ y el programa informático IM-AGEQUANT™ V3.3 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, Estados Unidos). Los datos se normalizaron a niveles de GAPDH en controles no tratados.

#### **Ejemplo 15: Inhibición antisentido de la expresión de apolipoproteína C-III humana mediante oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi**

Se diseñó una serie de compuestos antisentido para dirigirlos a regiones diferentes de ARN de apolipoproteína C-III humana, usando secuencias publicadas (nucleótidos 6238608 a 6242565 de número de acceso del GenBank NT\_035088.1, que representa una secuencia genómica que se incorpora al presente documento como SEC ID N°: 4, y el número de acceso del GenBank NM\_000040.1, que se incorpora al presente documento como SEC ID N°: 18). Los compuestos se muestran en la tabla 1. "Sitio diana" indica el primer nucleótido (extremo 5') numerado en la secuencia diana particular al que se une el compuesto. Todos los compuestos de la tabla 1 son oligonucleótidos quiméricos ("gapmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos por una región "hueco" que consta de diez 2'-desoxi-nucleótidos, que están flanqueados por ambos lados (direcciones 5' y 3') por "flancos" de cinco nucleótidos. Los flancos están compuestos por 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, también conocidos como (2'-MOE) nucleótidos. Las uniones entre nucleósidos (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los restos de citidina son 5-metilcitidinas. Los compuestos se analizan para determinar su efecto sobre niveles de ARNm de apolipoproteína C-III humana mediante PCR cuantitativa en tiempo real tal como se describe en otros ejemplos en el presente documento. Los datos son datos promedio de los tres experimentos en los que se trataron células HepG2 con los oligonucleótidos antisentido. El control positivo para cada dato puntual se identifica en la tabla por el número de

ES 2 373 101 T3

secuencia ID. Si está presente, "N.D." indica "sin datos".

**Tabla 1 - Inhibición de niveles de ARNm de apolipoproteína C-III humana mediante oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi**

ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	%DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º	SECUENCIA CONTROL SEC ID N.º
167824	5'UTR	4	414	ctggagcagctgcctctagg	79	19	1
167835	Codificante	4	1292	ccctgcatgaagctgagaag	60	20	1
167837	Codificante	18	141	gtgcttcatgtaaccctgca	88	21	1
167846	Codificante	4	1369	tggcctgctgggccactgg	66	22	1
167848	Codificante	4	3278	tgctccagtagtcttcagg	81	23	1
167851	Codificante	4	3326	tgacctcagggtccaatcc	41	24	1
304739	5'UTR	4	401	ctctagggatgaactgagca	62	25	1
304740	5'UTR	4	408	cagctgcctctagggatgaa	44	26	1
304741	5'UTR	18	17	ttcttgagcagctgcctct	57	27	1
304742	5'UTR	18	24	acctctgttctggagcagc	78	28	1
304743	Codón de inicio	18	29	atggcacctctgttctgga	78	29	1
304744	Codón de inicio	4	1065	gggctgcatcggcacctctgt	73	30	1
304745	Codificante	4	1086	ggcaacaacaaggagtacc	90	31	1
304746	Codificante	4	1090	ggagggcaacaacaaggagt	80	32	1
304747	Codificante	18	87	agctcgggagagggccagga	49	33	1
304748	Codificante	18	92	tctgaagctcgggagagggc	72	34	1
304749	Codificante	18	97	cggcctctgaagctcgggca	11	35	1
304750	Codificante	4	1267	catcctcggcctctgaagct	49	36	1
304751	Codificante	4	1273	gggagggatcctcggcctct	65	37	1
304752	Codificante	4	1278	gagaagggagggatcctcgg	82	38	1
304753	Codificante	4	1281	gctqagaagggagggatcct	75	39	1
304754	Codificante	4	1289	tgcatgaagctgagaaggga	74	40	1
304755	Codificante	18	143	gcgtgcttcatgtaaccctg	95	41	1
304756	Codificante	4	1313	ttggtggcgtgcttcatgta	92	42	1
304757	Codificante	4	1328	gcatcctggcggcttgggt	98	43	1
304758	Codificante	4	1334	ctcagtgcatccttggcgggt	97	44	1
304759	Codificante	4	1336	tgctcagtcaccttggcg	93	45	1
304760	Codificante	4	1347	ctcctgcacgctgctcagtg	65	46	1
304761	Codificante	4	1349	gactcctgcacgctgctcag	77	47	1
301762	Codificante	4	1358	gccacctgggactcctgcac	89	48	1
304763	Codificante	18	210	gcccctggcctgctgggcca	71	49	1
304764	Codificante	18	211	agcccctggcctgctgggcc	62	50	1

ES 2 373 101 T3

(continuación)

ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	%DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º	SECUENCIA CONTROL SEC ID N.º
304765	Codificante	4	3253	gaagccatcggtcaccacgc	71	51	1
304766	Codificante	4	3255	ctgaagccatcggtcaccca	85	52	1
304767	Codificante	4	3265	ttcagggaaactgaagccat	73	53	1
304768	Codificante	4	3273	cagtagtctttcagggaaact	40	54	1
304769	Codificante	4	3283	aacgggtgctccagtagtctt	66	55	1
304770	Codificante	4	3287	ccttaacgggtgctccagtag	88	56	1
304771	Codificante	4	3295	gaactgtccttaacgggtgc	59	57	1
304772	Codificante	4	3301	ctcagagaactgtccttaa	88	58	1
304773	Codificante	4	3305	agaactcagagaactgtcc	75	59	1
304774	Codificante	4	3310	atcccagaactcagagaact	0	60	1
304775	Codificante	4	3320	caggggtccaatcccagaac	70	61	1
304776	Codificante	4	3332	ttggtctgacctcaggggtcc	90	62	1
304777	Codificante	4	3333	gttggtctgacctcaggggtc	84	63	1
304778	Codificante	4	3339	gctgaagttggtctgacctc	81	64	1
304779	Codificante	4	3347	cagccacggctgaagttggt	75	65	1
304780	Codón de detención	4	3351	caggcagccacgggtgaagt	83	66	1
304781	Codón de detención	4	3361	attgaggtctcaggcagcca	79	67	1
304782	3'UTR	4	3385	tggataggcaggtggacttg	64	68	1
304783	3'UTR	18	369	ctcgcaggatggataggcag	76	69	1
304784	3'UTR	18	374	aggagctcgcaggatggata	58	70	1
304785	3'UTR	18	380	gaccaagagctcgagga	73	71	1
304786	3'UTR	18	385	tgcaggaccaaggagctcg	92	72	1
304787	3'UTR	4	3417	tggagattgcaggaccaag	88	73	1
304788	3'UTR	4	3422	agccctggagattgcaggac	69	74	1
304789	3'UTR	4	3425	ggcagccctggagattgcag	76	75	1
304790	3'UTR	4	3445	cctttaagcaacctacagg	65	76	1
304791	3'UTR	4	3450	ctgtccctttaagcaacct	53	77	1
304792	3'UTR	4	3456	agaatactgtccctttaag	72	78	1
304793	3'UTR	4	3461	cactgagaatactgtccctt	67	79	1
304794	3'UTR	4	3469	taggagagcactgagaatac	59	80	1
304795	3'UTR	4	3472	gggtaggagagcactgagaa	74	81	1
304796	3'UTR	4	3509	aggccagcatgcctggaggg	63	82	1
304797	3'UTR	4	3514	ttgggaggccagcatgcctg	55	83	1
304798	3'UTR	4	3521	agctttattgggaggccagc	90	84	1
304799	3'UTR	4	3526	tgtccagctttattgggagg	85	85	1
304800	3'UTR	4	3528	ctgtccagctttattggga	94	86	1

(continuación)

ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	%DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º	SECUENCIA CONTROL SEC ID N.º
304801	3'UTR	4	3533	agcttctgtccagcttat	74	87	1
304802	3'UTR	4	3539	catagcagcttctgtccag	73	88	1
304803	Unión exón:intrón	4	416	acctggagcagctgcctcta	87	89	1
304804	Unión exón:intrón	4	424	agggcattacctggagcagc	68	90	1
304805	Unión exón:intrón	4	1053	acctctgttcctgcaaggaa	74	91	1
304806	Unión exón:intrón	4	1121	aagtgcttacggcagagggc	78	92	1
304807	Unión exón:intrón	4	1380	gcgggtgtacctggcctgct	52	93	1
304808	Intrón	4	2337	aaccctgttgtaactgcac	59	94	1
304809	Intrón	4	2405	agtgagcaataccgcctgag	80	95	1
304810	Intrón	4	2542	cgggctgaattaggtcagg	56	96	1

5 Tal como se muestra en la tabla 1, las secuencias SEC ID N° 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 y 96 mostraron al menos un 45 % de inhibición de la expresión de la apolipoproteína C-III en este ensayo y son, por lo tanto, preferentes. Son más preferentes las secuencias SEC ID N° 75, 86 y 85. Las regiones diana a las que estas secuencias preferentes son complementarias se denominan en el presente documento "segmentos diana preferentes" y son preferentes, por lo tanto, como diana para los compuestos de la presente divulgación. Los segmentos diana preferentes se muestran en la tabla 3. Las secuencias representan el complemento inverso de los compuestos antisentido preferentes que se muestran en la tabla 1. "Sitio diana" indica el primer nucleótido (extremo 5') numerado en un ácido nucleico diana particular al que se une el oligonucleótido. En la tabla 3 se muestran también las especies en las que se han encontrado cada uno de los segmentos diana preferentes.

**Ejemplo 16: Inhibición antisentido de la expresión de apolipoproteína C-III de ratón mediante oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi**

15 Se diseñó una segunda serie de compuestos antisentido para dirigirla a diferentes regiones del ARN de apolipoproteína C-III de ratón usando secuencias publicadas (número de acceso del GenBank L04150.1, que se incorpora al presente documento como secuencia SEC ID N°: 11). Los compuestos se muestran en la tabla 2. "Sitio diana" indica el primer nucleótido (extremo 5') numerado en el ácido nucleico diana particular al que se une el compuesto. Todos los compuestos de la tabla 2 son oligonucleótidos quiméricos ("gapmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos por una región "hueco" que consta de diez 2'-desoxinucleótidos, que están flanqueados por ambos lados (direcciones 5' y 3') por "flancos" de cinco nucleótidos. Los flancos están compuestos por 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, también conocidos como (2'-MOE) nucleótidos. Las uniones entre nucleósidos (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los restos de citidina son 5-metilcitidinas. Los compuestos se analizan para determinar su efecto sobre niveles de ARNm de apolipoproteína C-III de ratón mediante PCR cuantitativa en tiempo real tal como se describe en otros ejemplos en el presente documento. Los datos son datos promedio de los tres experimentos en los que se trataron células hepatocíticas principales con los oligonucleótidos antisentido. Si está presente, "N.D." indica "sin datos".

**Tabla 2 - Inhibición de niveles de ARNm de apolipoproteína C-III de ratón mediante oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi**

ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	% DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º
167858	5'UTR	11	1	tagggataaaaactgagcagg	47	97
167859	5'UTR	11	21	ctggagtagctagctgcttc	30	98
167860	Codón de inicio	11	41	gctgcatggcacctacgtac	80	99
167861	Codificante	11	62	ccacagtgaggagcgtccgg	86	100
167862	Codificante	11	88	ggcagatgccaggagagcc a	55	101
167863	Codificante	11	104	ctacctctcagctcgggca	56	102
167864	Codificante	11	121	cagcagcaaggatccctcta	83	103
167865	Codificante	11	131	gcacagagcccagcagcaa g	49	104
167867	Codificante	11	215	ccctggccaccgcagctata	67	105
167868	Codificante	11	239	atctgaagtgattgtccatc	11	106
167869	Codificante	11	254	agtagccttcaggaatctg	57	107
167870	Codificante	11	274	ctgtcagtaaacttgctcc	89	108
167871	Codificante	11	286	gaagccggtgaacttgctag	55	109
167872	Codificante	11	294	gaatcccagaagccggtgaa	29	110
167873	Codificante	11	299	ggttagaatcccagaagccg	55	111
167874	Codificante	11	319	tggagttggtgctctcag	79	112
167875	Codón de detención	11	334	tcacgactcaatagctggag	77	113
167877	3'UTR	11	421	cccttaagcaaccttcagg	71	114
167878	3'UTR	11	441	agacatgagaacatacttc	81	115
167879	3'UTR	11	471	catgttagtgagatctag	87	116
167880	3'UTR	11	496	tcttatccagctttattagg	98	117

5 Tal como se muestra en la tabla 2, las SEC ID N° 97, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 107, 108, 109, 111, 112, 113, 114, 115, 116 y 117 mostraron al menos un 45 % de inhibición de la expresión de la apolipoproteína C-III de ratón en este experimento y son, por lo tanto, preferentes. Son más preferentes las secuencias SEC ID N° 117, 116 y 100. Las regiones diana a las que estas secuencias preferentes son complementarias se denominan en el presente documento "segmentos diana preferentes" y son preferentes, por lo tanto, como diana para los compuestos de la presente divulgación. Estos segmentos diana preferentes se muestran en la tabla 3. Las secuencias representan el complemento

10 inverso de los compuestos antisentido preferentes que se muestran en la tabla 2. Se muestra que estas secuencias contienen timina (T) pero un experto en la técnica apreciará que la timina (T) se reemplaza generalmente por uracilo (U) en secuencias de ARN. "Sitio diana" indica el primer nucleótido (extremo 5') numerado en un ácido nucleico diana particular el que se une el oligonucleótido. En la tabla 3 se muestran también las especies en las que se han encontrado

15 cada uno de los segmentos diana preferentes.

ES 2 373 101 T3

Tabla 3 – Secuencia y posición de segmentos diana preferentes identificados en apolipoproteína C-III.

SITIO ID	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	ASOCIADO INVERSO DE SEC ID	ACTIVO EN	SEC ID N.º
82975	4	414	cctagaggcagctgctccag	19	<i>H. sapiens</i>	118
82980	4	1292	ctctcagctcatgcagg	20	<i>H. sapiens</i>	119
82981	18	141	tgagggttacatgaagcac	21	<i>H. sapiens</i>	120
82985	4	1369	ccagggtggcccagcaggcca	22	<i>H. sapiens</i>	121
82987	4	3278	cctgaaagactactggagca	23	<i>H. sapiens</i>	122
220510	4	401	tgctcagttcatccctagag	25	<i>H. sapiens</i>	123
220512	18	17	agaggcagctgctccaggaa	27	<i>H. sapiens</i>	124
220513	18	24	gctgctccaggaaacagaggt	28	<i>H. sapiens</i>	125
220514	18	29	tccaggaaacagaggtgccat	29	<i>H. sapiens</i>	126
220515	4	1065	acagaggtgccatgcagccc	30	<i>H. sapiens</i>	127
220516	4	1086	gggtactcctgtgtgtgcc	31	<i>H. sapiens</i>	128
220517	4	1090	actcctgtgtgtgccctcc	32	<i>H. sapiens</i>	129
220518	18	87	tcctggcctctgcccagct	33	<i>H. sapiens</i>	130
220519	18	92	gcctctgcccagcttcaga	34	<i>H. sapiens</i>	131
220521	4	1267	agcttcagaggccgaggatg	36	<i>H. sapiens</i>	132
220522	4	1273	agaggccgaggatgcctccc	37	<i>H. sapiens</i>	133
220523	4	1278	ccgaggatgcctccctctc	38	<i>H. sapiens</i>	134
220524	4	1281	aggatgcctccctctcagc	39	<i>H. sapiens</i>	135
220525	4	1289	tcctctcagctcatgca	40	<i>H. sapiens</i>	136
220526	18	143	cagggttacatgaagcacgc	41	<i>H. sapiens</i>	137
220527	4	1313	tacatgaagcacgccaccaa	42	<i>H. sapiens</i>	138
220528	4	1328	accaagaccgccaaggatgc	43	<i>H. sapiens</i>	139
220529	4	1334	accgccaaggatgcactgag	44	<i>H. sapiens</i>	140
220530	4	1336	cgccaaggatgcactgagca	45	<i>H. sapiens</i>	141
220531	4	1347	cactgagcagcgtgcaggag	46	<i>H. sapiens</i>	142
220532	4	1349	ctgagcagcgtgcaggatc	47	<i>H. sapiens</i>	143
220533	4	1358	gtcaggagtcccagggtggc	48	<i>H. sapiens</i>	144
220534	18	210	tggcccagcaggccaggggc	49	<i>H. sapiens</i>	145
220535	18	211	ggcccagcaggccaggggct	50	<i>H. sapiens</i>	146
220536	4	3253	gctgggtgaccgatggcttc	51	<i>H. sapiens</i>	147
220537	4	3255	tgggtgaccgatggcttcag	52	<i>H. sapiens</i>	148
220538	4	3265	atggctcagttccctgaaa	53	<i>H. sapiens</i>	149
220540	4	3283	aagactactggagcaccgtt	55	<i>H. sapiens</i>	150
220541	4	3287	ctactggagcaccgtaagg	56	<i>H. sapiens</i>	151
220542	4	3295	gcaccgtaaggacaagttc	57	<i>H. sapiens</i>	152



ES 2 373 101 T3

(continuación)

SITIO ID	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	ASOCIADO INVERSO DE SEC ID	ACTIVO EN	SEC ID N.º
220543	4	3301	ttaaggacaagttctctgag	58	<i>H. sapiens</i>	153
220544	4	3305	ggacaagttctctgagttct	59	<i>H. sapiens</i>	154
220546	4	3320	gttctgggattggaccctg	61	<i>H. sapiens</i>	155
220547	4	3332	ggaccctgaggtcagaccaa	62	<i>H. sapiens</i>	156
220548	4	3333	gaccctgaggtcagaccaac	63	<i>H. sapiens</i>	157
220549	4	3339	gaggtcagaccaactcagc	64	<i>H. sapiens</i>	158
220550	4	3347	accaactcagccgtggctg	65	<i>H. sapiens</i>	159
220551	4	3351	acttcagccgtggctgcctg	66	<i>H. sapiens</i>	160
220552	4	3361	tggtgcctgagacctcaat	67	<i>H. sapiens</i>	161
220553	4	3385	caagccacctgcctatcca	68	<i>H. sapiens</i>	162
220554	18	369	ctgcctatccatcctgcgag	69	<i>H. sapiens</i>	163
220555	18	374	tatccatcctgcgagctcct	70	<i>H. sapiens</i>	164
220556	18	380	tcctgcgagctcctgggtc	71	<i>H. sapiens</i>	165
220557	18	385	cgagctcctgggtcctgca	72	<i>H. sapiens</i>	166
220558	4	3417	ctgggtcctgcaatctcca	73	<i>H. sapiens</i>	167
220559	4	3422	gtctgcaatctccagggt	74	<i>H. sapiens</i>	168
220560	4	3425	ctgcaatctccagggtgcc	75	<i>H. sapiens</i>	169
220561	4	3445	cctgtaggtgtctaaaagg	76	<i>H. sapiens</i>	170
220562	4	3450	aggttgcttaaaaggacag	77	<i>H. sapiens</i>	171
220563	4	3456	cttaaaaggacagtattct	78	<i>H. sapiens</i>	172
220564	4	3461	aagggacagtattctcagtg	79	<i>H. sapiens</i>	173
220565	4	3469	gtattctcagtgctctcta	80	<i>H. sapiens</i>	174
220566	4	3472	ttctcagtgctctcctacc	81	<i>H. sapiens</i>	175
220567	4	3509	ccctccaggcatgctggcct	82	<i>H. sapiens</i>	176
220568	4	3514	caqqcatgctggcctcccaa	83	<i>H. sapiens</i>	177
220569	4	3521	gctggcctccaataaagct	84	<i>H. sapiens</i>	178
220570	4	3526	cctccaataaagctggaca	85	<i>H. sapiens</i>	179
220571	4	3528	tccaataaagctggacaag	86	<i>H. sapiens</i>	180
220572	4	3533	ataaagctggacaagaagct	87	<i>H. sapiens</i>	181
220573	4	3539	ctggacaagaagctgctatg	88	<i>H. sapiens</i>	182
220574	4	416	tagaggcagctgctccaggt	89	<i>H. sapiens</i>	183
220575	4	424	gctgctccaggtaatgcct	90	<i>H. sapiens</i>	184
220576	4	1053	ttccttgaggaacagaggt	91	<i>H. sapiens</i>	185
220577	4	1121	gcctctgcccgttaagcactt	92	<i>H. sapiens</i>	186
220578	4	1380	agcaggccaggtacacccgc	93	<i>H. sapiens</i>	187
220579	4	2337	gtgcagttcacaacaggggt	94	<i>H. sapiens</i>	188
220580	4	2405	ctcaggcggtatttqctcact	95	<i>H. sapiens</i>	189

(continuación)

SITIO ID	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	ASOCIADO INVERSO DE SEC ID	ACTIVO EN	SEC ID N.º
220581	4	2542	cctgacctaattcaagcccg	96	<i>H. sapiens</i>	190
82997	11	1	cctgctcagtttatcccta	97	<i>M. musculus</i>	191
82999	11	41	gtacgtaggtgcatgcagc	99	<i>M. musculus</i>	192
83000	11	62	ccggacgctcctcactgtgg	100	<i>M. musculus</i>	193
83001	11	88	tggtctcctggcatctgcc	101	<i>M. musculus</i>	194
83002	11	104	tgcccgagctgaagaggtag	102	<i>M. musculus</i>	195
83003	11	121	tagaggatccttctgtctg	103	<i>M. musculus</i>	196
83004	11	131	cttgctgctgggctctgtgc	104	<i>M. musculus</i>	197
83006	11	215	tatagctgcggtggccaggg	105	<i>M. musculus</i>	198
83008	11	254	cagattctgaaaggctact	107	<i>M. musculus</i>	199
83009	11	274	ggagcaagtttactgacaag	108	<i>M. musculus</i>	200
83010	11	286	ctgacaagttcaccggcttc	109	<i>M. musculus</i>	201
83012	11	299	cggcttctgggattctaacc	111	<i>M. musculus</i>	202
83013	11	319	ctgaggaccaaccaactcca	112	<i>M. musculus</i>	203
83014	11	334	ctccagctattgagtcgtga	113	<i>M. musculus</i>	204
83016	11	421	cctgaaggtgctttaagg	114	<i>M. musculus</i>	205
83017	11	441	gaaagtatgttctcatgtct	115	<i>M. musculus</i>	206
83018	11	471	ctagatctcacctaaacatg	116	<i>M. musculus</i>	207
83019	11	496	cctaataaagctggataaga	117	<i>M. musculus</i>	208

Debido a que se ha encontrado por experimentación que estos "segmentos diana preferentes" están abiertos a, y accesibles a, hibridación con los compuestos antisentido de la presente divulgación, un experto en la técnica reconocerá o será capaz de determinar, usando nada más que experimentación de rutina, otras realizaciones que abarcan otros compuestos que se hibridan específicamente con estos segmentos diana preferentes y, en consecuencia, inhiben la expresión de la apolipoproteína C-III.

De acuerdo con la presente divulgación, los compuestos antisentido incluyen compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), empalmadores alternativos, cebadores, sondas y otros compuestos oligoméricos cortos que se hibridan con al menos una porción del ácido nucleico diana.

**Ejemplo 17: Inhibición antisentido de la expresión de apolipoproteína C-III humana mediante oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi. Compuestos antisentido adicionales**

Se diseñó una serie adicional de compuestos antisentido para dirigirlos a regiones diferentes de ARN de apolipoproteína C-III humana, usando secuencias publicadas (nucleótidos 6238608 a 6242565 de número de acceso del GenBank NT\_035088.1, que representa una secuencia genómica que se incorpora al presente documento como SEC ID N°: 4, y el número de acceso del GenBank NM\_000040.1, que se incorpora al presente documento como SEC ID N°: 18). Los compuestos se muestran en la tabla 4. "Sitio diana" indica el primer nucleótido (extremo 5') numerado en la secuencia diana particular al que se une el compuesto. Todos los compuestos de la tabla 4 son oligonucleótidos quiméricos ("gapmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos por una región "hueco" que consta de diez 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada por ambos lados (direcciones 5' y 3') por "flancos" de cinco nucleótidos. Los flancos están compuestos por 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, también conocidos como (2'-MOE) nucleótidos. Las uniones entre nucleósidos (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los restos de citidina son 5-metilcitidinas. Los compuestos se analizan para determinar su efecto sobre niveles de ARNm de apolipoproteína C-III mediante PCR cuantitativa en tiempo real tal como se describe en otros ejemplos en el presente documento. Los datos son datos promedios de tres experimentos en los que se trataron células HepG2 con los oligonucleótidos antisentido.

**Tabla 4 - Inhibición de niveles de ARNm de apolipoproteína C-III humana mediante oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi**

ISIS N°	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	% DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º
167826	4	1063	gctgcatggcacctctgttc	0	209
167828	4	1110	ggcagaggccaggagcgcca	0	210
167830	18	91	ctgaagctcgggcagaggcc	9	211
167832	18	101	tcctcggcctctgaagctcg	0	212
167840	4	1315	tcttggtggcgtgctcatg	0	213
167842	4	1335	gctcagtgcaccttggcgg	38	214
167844	4	1345	cctgcacgctgctcagtca	28	215
167847	4	3256	actgaagccatcggtcaccc	0	216
167850	4	3306	cagaactcagagaactgtc	0	217
167852	4	3336	gaagttggtctgacctcagg	0	218
167853	4	3420	ccctggagattgcaggaccc	0	219
167854	4	3426	gggcagccctggagattgca	22	220
167855	4	3446	ccctttaagcaacctacag	27	221

**5 Ejemplo 18: Inhibición antisentido de la expresión de apolipoproteína C-III humana mediante oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi. Estudio de respuesta a la dosis en células HepG2**

10 Un subconjunto de los oligonucleótidos antisentido de los ejemplos 15 y 17 se analizó adicionalmente en un estudio de respuesta a la dosis. Las dosis de tratamiento de ISIS 167842 (SEC ID N°: 214), ISIS 167844 (SEC ID N°: 215), ISIS 167846 (SEC ID N°: 22), ISIS 167837 (SEC ID N°: 21), ISIS 304789 (SEC ID N°: 75), ISIS 304799 (SEC ID N°: 85) e ISIS 304800 (SEC ID N°: 86) fueron 50, 150 y 300 nM. Los compuestos se analizaron para determinar su efecto sobre niveles de ARNm de apolipoproteína C-III en células HepG2 mediante PCR cuantitativa en tiempo real tal como se describe en otros ejemplos en el presente documento. Los datos son datos promedio de dos experimentos y se muestran en la tabla 5.

**15 Tabla 5 - Inhibición de niveles de ARNm de apolipoproteína C-III humana mediante oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi**

		Dosis de oligonucleótidos		
ISIS N°	SEC ID N.º	50 nm	150 nM	300 nM
		Porcentaje de inhibición		
167842	214	88	77	92
167844	215	86	86	84
167846	22	79	80	79
167837	21	83	86	84
304789	75	81	91	92
304799	85	82	93	88
304800	86	80	86	91

Estos datos demuestran que la expresión de apolipoproteína C-III está inhibida de un modo dependiente de la dosis después del tratamiento de células con compuestos antisentido dirigidos a apolipoproteína C-III. Estos compuestos se

analizaron adicionalmente en células Hep3B para determinar su capacidad para reducir los niveles de ARNm en células Hep3B y se determinó que ISIS 167842 y 167837 inhibieron la expresión de apolipoproteína C-III de un modo dependiente de la dosis en esta línea celular también.

5 **Ejemplo 19: Inhibición antisentido de la expresión de apolipoproteína C-III de ratón mediante oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi. Estudio de respuesta a la dosis en hepatocitos de ratón primarios**

10 Un subconjunto de los oligonucleótidos antisentido del **ejemplo 16** se analizó adicionalmente en un estudio de respuesta a la dosis. Las dosis de tratamiento con ISIS 167861 (SEC ID N°: 100), ISIS 167870 (SEC ID N°: 108), ISIS 167879 (SEC ID N°: 116) e ISIS 167880 (SEC ID N°: 117) fueron 40, 120 y 240 nM. Los compuestos se analizaron para determinar su efecto sobre niveles de ARNm de apolipoproteína C-III en células de hepatocitos primarios mediante PCR cuantitativa en tiempo real tal como se describe en otros ejemplos en el presente documento. Los datos son datos promedio de dos experimentos y se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6 - Inhibición de niveles de ARNm de apolipoproteína C-III de ratón mediante oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi – estudio de respuesta a la dosis**

ISIS N°	SEC ID N.º	Dosis de oligonucleótidos		
		40 nM	120 nM	240 nM
		Porcentaje de inhibición		
167861	100	48	49	61
167870	108	16	16	46
167879	116	25	54	81
167880	117	76	81	93

15 Estos datos demuestran que la expresión de apolipoproteína C-III de ratón puede inhibirse de un modo dependiente de la dosis mediante tratamiento con compuestos antisentido.

**Ejemplo 20: Análisis de inmunotransferencia (Northern) de niveles proteicos de lipoproteína C-III**

20 Los análisis de inmunotransferencia (Western) se realizaron usando procedimientos estándar. Las células se recogieron 16-20 h después del tratamiento con oligonucleótido y se lavaron una vez con PBS, suspendido en tampón Laemmli (100 µl/pocillo), se hirieron durante 5 minutos y se cargaron en un gel SDS-PAGE al 16 %. El gel se somete a 150 V durante 1,5 horas y se transfiere a membranas para el análisis de inmunotransferencia (Western). Se usa un anticuerpo primario apropiado dirigido a la apolipoproteína C-III, con un anticuerpo secundario radioetiquetado o etiquetado fluorescentemente dirigido contra las especies de anticuerpo primario. Las bandas se visualizaron usando un instrumento PHOSPHORIMAGER™ (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA, Estados Unidos).

**Ejemplo 21: Efectos de inhibición antisentido de apolipoproteína C-III (ISIS 167880) en niveles de colesterol y triglicéridos en suero**

30 Se usaron ratones C57BL/6, una cepa de la que se ha informado que es susceptible a la formación inducida por hiperlipidemia de placas ateroscleróticas, en los estudios siguientes para evaluar oligonucleótidos antisentido de apolipoproteína C-III como agentes potenciales para reducir los niveles de colesterol y triglicéridos.

35 Se evaluaron ratones C57BL/6 machos (n=8) que recibieron una dieta rica en grasas (60 % kcal de grasa) en el transcurso de 6 semanas para determinar los efectos de ISIS 167880 (SEC ID N°: 117) sobre los niveles de colesterol y triglicéridos en suero. Los animales control recibieron tratamiento salino. Se dosificó intraperitonealmente a los ratones cada tres días (dos veces a la semana), después de ayunar durante la noche, 50 mg/kg de ISIS 167880 o solución salina durante seis semanas.

Se tuvo en ayuno durante la noche a ratones C57BL/6 macho alimentados con una dieta de roedor normal y después se dosificó intraperitonealmente cada tres días solución salina (control), 50 mg/kg de ISIS 167880 (SEC ID N°: 117) o 50 mg/kg de ISIS 167879 (SEC ID N°: 116) durante dos semanas.

40 A la conclusión del estudio, cuarenta y ocho horas después de las inyecciones finales, los animales se sacrificaron y se evaluaron los niveles en suero de colesterol y triglicéridos y se compararon con el control salino. Las mediciones de los niveles de colesterol y triglicéridos en suero se obtuvieron mediante un análisis clínico rutinario.

Los ratones alimentados con dieta rica en grasas con ISIS 167880 mostraron una reducción tanto en colesterol (196

mg/dl para animales control y 137 mg/dl para ISIS 167880) como en triglicéridos (151 mg/dl para animales control y 58 mg/dl para ISIS 167880) en suero al finalizar el estudio.

5 No se observó ningún efecto en los niveles de colesterol en suero para ratones magros tratados con ISIS 167880 (91 mg/dl para animales control y 91 mg/dl para ISIS 167880), no obstante, los triglicéridos se redujeron (91 mg/dl para animales control y 59 mg/dl para ISIS 167880) al finalizar el estudio.

Los ratones magros tratados con ISIS 167879 mostraron un aumento en el colesterol (91 mg/dl para animales control y 116 mg/dl para ISIS 167879) pero una reducción de triglicéridos (91 mg/dl para animales control y 65 mg/dl para ISIS 167879) en suero al finalizar el estudio.

10 Estos resultados indican que en ratones alimentados con una dieta rica en grasas, ISIS 167880 reduce el colesterol y los triglicéridos a niveles que son comparables a miembros de la misma camada magros mientras que no tiene efectos perjudiciales sobre los animales magros. (Véase la tabla 7 para un resumen de los datos *in vivo*.)

**Ejemplo 22: Efectos de inhibición antisentido de apolipoproteína C-III (ISIS 167880) en niveles de AST y ALT en suero**

15 Se usaron ratones C57BL/6 en los estudio siguientes para evaluar la toxicidad en hígado de oligonucleótidos antisentido de apolipoproteína C-III.

20 Se evaluaron ratones C57BL/6 machos (n=8) recibieron una dieta rica en grasas (60 % kcal de grasa) en el transcurso de 6 semanas para determinar los efectos de ISIS 167880 (SEC ID N°: 117) sobre los niveles de enzimas hepáticas (AST y ALT). Los animales control recibieron tratamiento salino. Se dosificó intraperitonealmente a los ratones cada tres días (dos veces a la semana), después de ayunar durante la noche, 50 mg/kg de ISIS 167880 o solución salina durante seis semanas.

Se tuvo en ayuno durante la noche a ratones C57BL/6 macho alimentados con una dieta de roedor normal y después se les dosificó intraperitonealmente cada tres días solución salina (control), 50 mg/kg de ISIS 167880 (SEC ID N°: 117) o 50 mg/kg de ISIS 167879 (SEC ID N°: 116) durante dos semanas.

25 Al concluir el estudio y cuarenta y ocho horas después de las inyecciones finales, los animales se sacrificaron y se evaluaron los niveles de AST y ALT en suero, que se midieron usando procedimientos clínicos rutinarios. El aumento en los niveles de las enzimas hepáticas ALT y AST puede indicar toxicidad y daño en el hígado.

Los ratones alimentados con la dieta rica en grasas tratados con ISIS 167880 mostraron un aumento en los niveles de AST durante la duración del estudio, en comparación con los controles salinos, (157 UI/l para ISIS 167880, en comparación con 92 UI/l para el control salino).

30 Los niveles de ALT en ratones alimentados con la dieta rica en grasas aumentaron con el tratamiento con ISIS 167880 durante la duración del estudio, en comparación con los controles salinos, (64 UI/l para ISIS 167880, en comparación con 40 UI/l para el control salino).

35 Los ratones magros tratados con ISIS 167880 no mostraron un aumento significativo ni en los niveles de AST ni en los de ALT durante la duración del estudio, en comparación con los controles salinos (niveles de AST de 51 UI/l para control en comparación con 58 UI/l para ISIS 167880; niveles de ALT de 26 UI/l para control en comparación con 27 UI/l para ISIS 167880).

40 Los ratones magros tratados con ISIS 167879 no mostraron ningún cambio en los niveles de AST y mostraron un aumento en los niveles de ALT durante la duración del estudio, en comparación con los controles salinos (niveles de AST de 51 UI/l para control en comparación con 51 UI/l para ISIS 167879; niveles de ALT de 26 UI/l para control en comparación con 21 UI/l para ISIS 167879).

Estos resultados sugieren un efecto de toxicidad en hígado secundario para ISIS 167880 en ratones alimentados con una dieta rica en grasas pero ninguna toxicidad para ISIS 167880 o 167879 en ratones alimentados con una dieta de roedor normal. (Véase la tabla 7 para un resumen de los datos *in vivo*.)

45 **Ejemplo 23: Efectos de inhibición antisentido de apolipoproteína C-III (ISIS 167880) en niveles de glucosa en suero**

50 Se evaluaron ratones C57BL/6 machos (n=8) que recibieron una dieta rica en grasas (60 % kcal de grasa) en el transcurso de 6 semanas para determinar los efectos de ISIS 167880 (SEC ID N°: 117) sobre los niveles de glucosa en suero. Los animales control recibieron tratamiento salino. Se dosificó intraperitonealmente a los ratones cada tres días (dos veces a la semana), después de ayunar durante la noche, 50 mg/kg de ISIS 167880 o solución salina durante seis semanas.

Se tuvo en ayuno durante la noche a ratones C57BL/6 macho alimentados con una dieta de roedor normal y después se dosificó intraperitonealmente cada tres días solución salina (control), 50 mg/kg de ISIS 167880 (SEC ID N°: 117) o 50 mg/kg de ISIS 167879 (SEC ID N°: 116) durante dos semanas.

Al concluir el estudio y cuarenta y ocho horas después de las inyecciones finales, los animales se sacrificaron y se evaluaron los niveles de glucosa en suero, que se midieron mediante procedimientos clínicos rutinarios.

5 En los ratones alimentados con la dieta rica en grasas, ISIS 167880 redujo los niveles de glucosa en suero a 183 mg/dl, en comparación con el control salino de 213 mg/dl. En ratones magros, ISIS 167880 no tuvo ningún efecto significativo sobre los niveles de glucosa en suero con mediciones de 203 mg/dl, en comparación con el control salino con 204 mg/dl; mientras que ISIS 167879 sólo aumentó ligeramente los niveles de glucosa en suero a 216 mg/dl.

10 Estos resultados indican que en ratones alimentados con una dieta rica en grasas, ISIS 167880 es capaz de reducir la glucosa en suero a niveles comparables a miembros de la misma camada magros, mientras que no tiene efectos perjudiciales sobre los animales magros. (Véase la tabla 7 para un resumen de los datos *in vivo*.)

**Ejemplo 24: Efectos de la inhibición antisentido de apolipoproteína C-III (ISIS 167880) sobre niveles de ARNm de apolipoproteína C-III en ratones C57BL/6**

15 Se tuvo en ayuno durante la noche a ratones C57BL/6 macho alimentados con una dieta rica en grasas y después se les dosificó intraperitonealmente cada tres días solución salina o 50 mg/kg de ISIS 167880 (SEC ID N°: 117) durante seis semanas.

Se tuvo en ayuno durante la noche a ratones C57BL/6 macho alimentados con una dieta de roedor normal y después se les dosificó intraperitonealmente cada tres días solución salina (control) o 50 mg/kg de ISIS 167880 (SEC ID N°: 117) o 50 mg/kg de ISIS 167879 (SEC ID N°: 116) durante dos semanas.

20 Al terminar el estudio, cuarenta y ocho horas después de las inyecciones finales, los animales se sacrificaron y se evaluaron los niveles de ARNm de apolipoproteína C-III en el hígado. Los ratones alimentados con la dieta rica en grasas a los que se dosificó ISIS 167880 tenían niveles de ARNm de apolipoproteína C-III del 8 % de la los ratones tratados con solución salina. Los ratones magros mostraron disminución del ARNm de apolipoproteína C-III después del tratamiento con bien ISIS 167880 o bien ISIS 167879. Los ratones magros a los que se dosificó ISIS 167880 tenían niveles de ARNm de apolipoproteína C-III del 21 % de la los ratones tratados con solución salina y los tratados con ISIS 167879 tenían niveles de ARNm de apolipoproteína C-III del 27 % de la los ratones tratados con solución salina.

Estos resultados indican que tanto en ratones alimentados con una dieta rica en grasas como en ratones magros, los oligonucleótidos antisentido dirigidos contra apolipoproteína C-III son capaces de disminuir los niveles de ARNm de apolipoproteína C-III *in vivo* en una medida similar. (Véase la tabla 7 para un resumen de los datos *in vivo*.)

30 **Tabla 7 - Efectos del tratamiento con ISIS 167880 o 167879 sobre el colesterol, los triglicéridos, la glucosa, la enzima hepática y el ARNm de apolipoproteína C-III en hígado en ratones C57BL/6 magros y alimentados con una dieta rica en grasas**

	Unidades medidas del biológico	marcador	ISIS N°	Dieta, duración del experimento	
				Rica en grasas, 6 semanas	Magra, 2 semanas
	Colesterol mg/dl		control	196	91
			167880	137	91
			167879	N.D.	116
	Triglicéridos mg/dl		control	151	91
			167880	58	59
			167879	N.D.	65
	Glucosa mg/dl		control	213	204
			167880	183	203
			167879	N.D.	216
Enzimas hepáticas	AST UI/l	control	92	51	
		167880	157	58	
		167879	N.D.	51	

(continuación)

	Unidades medidas del marcador	ISIS Nº	Dieta, duración del experimento	
	ALT UI/l	control	40	26
		167880	64	27
		167879	N.D.	21
	ARNm de polipoproteína C-III % de control	167880	8 %	21 %
		167879	N.D.	27 %

- En resumen, estos resultados indican que en ratones alimentados con una dieta rica en grasas, ISIS 167880 es capaz de reducir la glucosa, el colesterol y los triglicéridos en suero a niveles comparables a miembros de la misma camada magros, mientras que no tiene efectos perjudiciales sobre los animales magros. Además, los oligonucleótidos antisentido dirigidos contra apolipoproteína C-III son capaces de disminuir los niveles de ARNm de apolipoproteína C-III *in vivo* en una medida similar en ratones alimentados con una dieta rica en grasas y ratones magros. Estos resultados sugieren un efecto de toxicidad en hígado secundario para ISIS 167880 en ratones alimentados con una dieta rica en grasas pero ninguna toxicidad para ISIS 167880 o 167879 en ratones alimentados con una dieta de roedor normal.

#### Ejemplo 25: Inhibición antisentido de ARNm de apolipoproteína C-III *in vivo*

- 10 Se usaron ratones C57BL/6, una cepa de la que se ha informado que es susceptible a la formación inducida por hiperlipidemia de placas ateroscleróticas, en los estudios siguientes para evaluar oligonucleótidos antisentido de apolipoproteína C-III como agentes potenciales para reducir los niveles de colesterol y triglicéridos. En consecuencia, en una realización adicional, los ratones C57BL/6 con una dieta rica en grasas se trataron con oligonucleótidos dirigidos a apolipoproteína C-III.
- 15 Se analizaron ratones C57BL/6 machos (n=8; 7 a 8 semanas que edad) que recibieron una dieta rica en grasas (60 % kcal de grasas) para evaluar la expresión de ARNm de apolipoproteína C-III en hígado 6 semanas después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos a apolipoproteína C-III. Los ratones recibieron dos veces a la semana inyecciones intraperitoneales a una dosis de 25 mg/kg de ISIS 167880 (SEC ID Nº: 117), ISIS 167875 (SEC ID Nº: 113), ISIS 167878 (SEC ID Nº: 115) o ISIS 167879 (SEC ID Nº: 116). Los animales control recibieron tratamiento de solución salina dos veces a la semana durante un periodo de 6 semanas.

- 20 Al terminar el estudio, cuarenta y ocho horas después de las inyecciones finales, los animales se sacrificaron y se evaluaron para determinar la expresión de ARNm de apolipoproteína C-III en el hígado. El ARN se aisló del hígado y el ARNm se cuantificó tal como se describe en el presente documento. Se hizo la media de los niveles de ARNm de apolipoproteína C-III de cada grupo de tratamiento (n=8). Con relación a los animales tratados con solución salina, el tratamiento con ISIS 167875, ISIS 167878, ISIS 167879 e ISIS 167880 dieron como resultado una reducción del 24 %, 56 %, 50 % y 77 % de los niveles de ARNm de apolipoproteína C-III, respectivamente, lo que demuestra que estos compuestos reducen significativamente la expresión de ARNm de apolipoproteína C-III en el hígado.

#### Ejemplo 26: Efectos de la inhibición antisentido de apolipoproteína C-III en colesterol, triglicéridos, glucosa en suero y transaminasas en suero

- 30 En una realización posterior, los ratones tratados con solución salina o una dosis de 25 mg/kg de ISIS 167880 (SEC ID Nº: 117), ISIS 167875 (SEC ID Nº: 113), ISIS 167878 (SEC ID Nº: 115) o ISIS 167879 (SEC ID Nº: 116) tal como se describe en el **ejemplo 25** se analizaron para determinar los niveles de colesterol y triglicéridos en suero después de 6 semanas de tratamiento.

- 35 Al finalizar el estudio, cuarenta y ocho horas después de la dosis de solución salina o compuestos antisentido, los animales se sacrificaron y se analizaron para determinar los niveles de colesterol, triglicéridos y glucosa en suero mediante análisis rutinarios usando un analizador clínico Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY, Estados Unidos). Las transaminasas ALT y AST en suero, aumentos en los que pueden indicar hepatotoxicidad, también se midieron usando un analizador clínico Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY, Estados Unidos). Los niveles de colesterol, triglicéridos y glucosa en suero se presentan en la tabla 8 como resultado promedio de cada grupo de tratamiento (n=8) en mg/dl. ALT y AST, que también se muestran en la tabla 8, también se muestran como resultado promedio para cada grupo de tratamiento (n=8), en unidades internacionales/l (UI/l).

**Tabla 8 - Efectos de la inhibición antisentido de apolipoproteína C-III en colesterol, triglicéridos, glucosa y transaminasas en suero**

Marcador en suero	Tratamiento				
	Solución Salina	ISIS 167875	ISIS 167878	ISIS 167879	ISIS 167880
Colesterol total mg/dl	172	197	180	132	155
Colesterol HDL mg/dl	149	162	157	117	137
Colesterol LDL mg/dl	25	37	28	24	21
Triglicéridos en suero mg/dl	126	99	75	60	52
ALT U/l	24	555	32	45	66
AST U/l	56	489	76	117	132
Glucosa mg/dl	273	234	251	189	255

- 5 Se observó una reducción significativa de los niveles de triglicéridos en suero después del tratamiento con ISIS 167875, ISIS 167878, ISIS 167879 e ISIS 167880, que redujeron los niveles de triglicéridos el 22 %, 40 %, 52 % y 58 %, respectivamente. Esta reducción de triglicéridos en suero se correlaciona con la reducción de la expresión de ARNm de apolipoproteína C-III en hígado. Además, las reducciones de triglicéridos en diana y en suero siguiendo al tratamiento con ISIS 167878, ISIS 167879 e ISIS 167880 no fueron acompañadas por hepatotoxicidad, tal como indica la falta de aumentos significativos en los niveles de ALT y AST. Los niveles de glucosa se redujeron significativamente siguiendo el tratamiento con ISIS 167879.

**Ejemplo 27: Efectos de la inhibición antisentido de apolipoproteína C-III en el peso corporal y en el peso de los órganos**

- 15 Los ratones tratados con solución salina o una dosis de 25 mg/kg de ISIS 167880 (SEC ID N°: 117), ISIS 167875 (SEC ID N°: 113), ISIS 167878 (SEC ID N°: 115) o ISIS 167879 (SEC ID N°: 116) tal como se describe en el **ejemplo 25** se analizaron para determinar cambios en el peso corporal y en el peso de almohadilla grasa, hígado y bazo. En la conclusión del estudio, cuarenta y ocho horas después de la dosis final de solución salina o de compuesto antisentido, los animales se sacrificaron y se midieron los pesos corporales y de los órganos. Los datos mostrados en la tabla 9 representan pesos promedio de todos los animales de cada grupo de tratamiento (n=8). El peso corporal se presenta en gramos (g), mientras que los pesos de bazo, hígado y almohadilla grasa se presentan en miligramos (mg).

20 **Tabla 9 - Efectos de la inhibición antisentido de apolipoproteína C-III en el peso corporal y de los órganos**

	Tratamiento				
	Solución salina	ISIS 167875	ISIS 167878	ISIS 167879	ISIS 167880
Peso corporal (g)	33	30	32	28	30
Peso del hígado (mg)	126	190	141	133	146
Peso de la almohadilla grasa (mg)	182	125	125	61	62
Peso del bazo (mg)	8	12	12	12	14

Tal como resulta evidente en la tabla 9, el tratamiento con compuestos antisentido dirigidos a apolipoproteína C-III



de ratón dio como resultado reducciones significativas en el peso de la almohadilla grasa. ISIS 167875 e ISIS 167878 produjeron ambos una reducción del 31 % en el peso de la almohadilla grasa, mientras que ISIS 167879 e ISIS 167880 produjeron ambos una reducción del 66 % en el peso de la almohadilla grasa. Los pesos corporales no cambiaron significativamente y el peso de los bazo aumentaron ligeramente siguiendo el tratamiento del compuesto antisentido.

5 Con la excepción de los hígados de los animales tratados con ISIS 167875, los pesos de los hígados no cambiaron significativamente.

#### **Ejemplo 28: Efectos de la inhibición antisentido de apolipoproteína C-III en niveles de triglicéridos en hígado**

La esteatosis hepática se refiere a la acumulación de lípidos en el hígado, o "hígado graso", que está causada frecuentemente por el consumo de alcohol, diabetes e hiperlipidemia y puede progresar hasta el estado final del daño hepático. Dadas las consecuencias perjudiciales de un trastorno de hígado graso, es necesario identificar compuestos que previenen o mejoran la esteatosis hepática. La esteatosis hepática se evalúa tanto mediante mediciones del contenido de triglicéridos en tejidos como mediante el examen de tejidos hepáticos.

10 El contenido de triglicéridos en el tejido hepático se evaluó en los animales tratados con solución salina o una dosis de 25 mg/kg de ISIS 167880 (SEC ID N°: 117), ISIS 167875 (SEC ID N°: 113), ISIS 167878 (SEC ID N°: 115) o ISIS 167879 (SEC ID N°: 116) tal como se describe en el ejemplo 25. El contenido de triglicéridos en el tejido hepático se midió usando el ensayo para triglicéridos GPO (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, Estados Unidos). Los análisis histológicos se realizaron usando procedimientos rutinarios, mediante los que se fijó el tejido hepático en formalina tamponada a pH neutro, embebida en parafina, se seccionaron y subsiguientemente se tizaron con hematoxilina y eosina, para visualizar núcleos y citoplasma, respectivamente. Alternativamente, el tejido hepático se procuró después de estar recién congelado, seccionado y subsiguientemente tizado con colorante Oil red O para visualizar los depósitos de lípidos y se contrató con eosina para marcar el citoplasma. Las muestras preparadas se evaluaron mediante microscopía de luz.

15 Con relación a los ratones tratados con solución salina, los niveles de triglicéridos en tejido hepático se redujeron significativamente en un 25 %, 35 %, 40 % y 64 % siguiendo el tratamiento con ISIS 167875, ISIS 167878, ISIS 167879 e ISIS 167880, respectivamente. Los análisis histológicos de secciones de hígado tintadas revelaron de forma similar una reducción de triglicéridos en el tejido hepático. De este modo, tal como se demuestra mediante mediciones de triglicéridos en tejido y análisis histológicos de secciones de tejido hepático, el tratamiento con compuestos antisentido dirigidos a apolipoproteína C-III redujeron el contenido de triglicéridos. Como tales, los compuestos antisentido dirigidos a apolipoproteína C-III son agentes terapéuticos candidatos para la prevención o mejora de esteatosis hepática.

#### **Ejemplo 29: Inhibición antisentido de apolipoproteína C-III en hepatocitos primario de macacos cangrejeros**

Los compuestos antisentido dirigidos a apolipoproteína C-III se analizaron para evaluar sus efectos sobre la expresión de apolipoproteína C-III en hepatocitos de macaco cangrejero primarios. Los hepatocitos de macaco cangrejero primarios preplaqueados se adquirieron de InVitro Technologies (Baltimore, MD, Estados Unidos). Las células se cultivaron en DMEM de alta glucosa (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 100 unidades/ml y 100 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

Las células, a una densidad de 80.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos se trataron con 10, 50, 150 y 300 nM de ISIS 304789 (SEQ ID N°: 75), ISIS 304799 (SEC ID N°: 85) o ISIS 304800 (SEC ID N°: 86). ISIS 113529 (CTCTTACT-GTGCTGTGGACA, SEC ID N°: 222) sirvió como oligonucleótido control. ISIS 113529 es un oligonucleótido quimérico ("*gapmer*") de 20 nucleótidos de longitud, compuesto por una región "hueco" que consta de diez 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada a ambos lados (direcciones 5' y 3') por "flancos" de cinco nucleótidos. Los flancos están compuestos por 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, también conocidos como (2'-MOE)nucleótidos. Las uniones entre nucleósidos (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los restos de citidina son 5-metilcitidinas.

Después de 24 horas de tratamiento como oligonucleótidos antisentido, se midió el ARNm de apolipoproteína C-III por PCR en tiempo real tal como se describe en otros ejemplos del presente documento, usando los cebadores y la sonda diseñados para la secuencia de apolipoproteína C-III humana (SEC ID N° 5, 6 y 7) para medir el ARNm de apolipoproteína C-III de macaco cangrejero. Se usaron cebadores y sonda diseñados para GAPDH humana (SEC ID N° 8, 9 y 10) para medir la expresión de ARNm de GAPDH de macaco cangrejero, con el fin de normalizar las cantidades de diana génica obtenidas por PCR en tiempo real. Las células no tratadas sirvieron como control con respecto al cual se normalizaron los datos. Los datos son la media de tres experimentos y se presentan en la tabla 10.

55

**Tabla 10 - inhibición antisentido de apolipoproteína C-III en hepatocitos primarios de macacos cangrejeros**

ISIS N°	SEC ID N.º	Dosis de oligonucleótidos			
		10 nM	50 nM	150 nM	300 nM
		% de inhibición			
304789	75	0	7	1	55
304799	85	34	60	66	48
304800	86	9	53	59	57
113529	222	N.D.	N.D.	0	0

**Ejemplo 30: Secuencia de apolipoproteína C-III de macaco cangrejero**

Se secuenció una porción del gen de apolipoproteína C-III de macaco cangrejero. Las posiciones 8 a 476 de la secuencia de ARNm de apolipoproteína C-III (que se incorpora en su totalidad al presente documento como SEC ID N°: 18) contiene el segmento diana al que se hibrida ISIS 304789. Se secuenció la región correspondiente de ARNm de apolipoproteína C-III de macaco cangrejero. El ARN se aisló y purificó a partir de hepatocitos de macaco cangrejero (InVitro Technologies, Gaithersburg, MD, Estados Unidos) y se sometió a una reacción de transcriptasa inversa (kit de Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). El ADN resultante fue el sustrato para 40 ciclos de amplificación por PCR, usando cebadores 5' y 3' diseñados para las posiciones 8 y 476, respectivamente, del ARNm de apolipoproteína C-III humana (Amplitaq PCR kit, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Siguiendo a la purificación en gel del fragmento de 468 pb resultante, las reacciones de secuenciación directa e inversa de cada producto se realizaron por Retrogen (San Diego, CA, Estados Unidos). La secuencia de macaco cangrejero se incorpora al presente documento como SEC ID N°: 223 y es en el 92 % idéntica a las posiciones 8 a 476 del ARNm de apolipoproteína C-III humana.

**Ejemplo 31: Oligonucleótidos de fosforoditioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi, dirigidos a apolipoproteína C-III de macaco cangrejero**

Se usó la secuencia de apolipoproteína C-III de macaco cangrejero, incorporada al presente documento como SEC ID N°: 223, para diseñar un oligonucleótido antisentido que tiene el 100 % de complementariedad con el ARNm de apolipoproteína C-III de macaco cangrejero. ISIS 340340 (GGCAGCCCTGGAGGCTGCAG; incorporada al presente documento como SEC ID N°: 224) está dirigida al nucleótido 397 de SEC ID N°: 223, dentro de una región que corresponde a la 3' UTR de la apolipoproteína C-III humana con la que se hibrida ISIS 304789. ISIS 340340 es un oligonucleótido quimérico ("gapmer") de 20 nucleótidos de longitud, compuesto por una región "hueco" central que consta de diez 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada a ambos lados (direcciones 5' y 3') por "flancos" de cinco nucleótidos. Los flancos están compuestos por 2'-metoxietil (2'-MOE) nucleótidos. Las uniones entre nucleósidos (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los restos de citidina son 5-metilcitidinas.

**Ejemplo 32: Inhibición antisentido de la expresión de apolipoproteína C-III de rata mediante oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi**

Con el fin de diseñar oligonucleótidos antisentido para las regiones codificantes y no traducidas de ARNm de apolipoproteína C-III de rata, se secuenció un segmento de ARNm de apolipoproteína C-III de rata para proporcionar la secuencia 3' UTR, ya que la secuencia de ARNm de apolipoproteína C-III de rata publicada está restringida a la región codificante. El ARN se aisló y purificó a partir de hepatocitos de rata (InVitro Technologies, Gaithersburg, MD, Estados Unidos) y se sometió a una reacción de transcriptasa inversa (kit de Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). El ADN resultante fue el sustrato para 40 ciclos de amplificación por PCR (Amplitaq PCR kit, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), usando cebadores directos e inversos para alinearse a los extremos 5' y 3', respectivamente, de ARNm de apolipoproteína C-III de ratón. Siguiendo a la purificación en gel del fragmento de 427 pb resultante, las reacciones de secuenciación directa e inversa de cada producto se realizaron por Retrogen (San Diego, CA, Estados Unidos). La secuencia de rata se incorpora al presente documento como SEC ID N°: 225 e incluye 121 pb adicionales en la dirección 3' desde el codón de detención de la apolipoproteína C-III con respecto a la secuencia publicada (número de acceso al GenBank NM\_012501.1, que se incorpora al presente documento como SEC ID N°: 226).

Se diseñó una serie de compuestos antisentido para diferentes regiones diana del ARNm de apolipoproteína C-III de rata usando la secuencia SEC ID N°: 225. Los compuestos se muestran en la tabla 11. "Sitio diana" indica el primer nucleótido (extremo 5') numerado en la secuencia diana particular al que se une el compuesto. Todos los compuestos de la tabla 11 son oligonucleótidos quiméricos ("gapmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos por una región "hueco" central que consta de diez 2'-desoxinucleótidos, que están flanqueados por ambos lados (direcciones 5' y 3') por "flancos" de cinco nucleótidos. Los flancos están compuestos por 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, también

conocidos como (2'-MOE)nucleótidos. Las uniones entre nucleósidos (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los restos de citidina son 5-metilcitidinas.

5 Los compuestos se analizan para determinar su efecto sobre niveles de ARNm de apolipoproteína C-III mediante PCR cuantitativa en tiempo real tal como se describe en otros ejemplos del presente documento. Las sondas y los cebadores de apolipoproteína C-III de ratón se diseñaron para que se hibridaran con una secuencia de apolipoproteína C-III de rata usando información de secuencias publicada (número de acceso del GenBank NM\_012501.1, que se incorpora al presente documento como SEC ID N°: 226). Para la apolipoproteína C-III de rata los cebadores de PCR fueron:

cebador directo: GAGGGAGAGGGATCCTTGCT (SEC ID N°: 227)

10 cebador inverso: GGACCGTCTTGGAGGCTTG (SEC ID N°: 228)

y la sonda PCR fue: FAM-CTGGGCTCTATGCAGGGCTACATGGA-TAMRA, SEC ID N°: 229) en la que FAM es el colorante fluorescente y TAMRA es el colorante inactivador. Para GAPDH de rata los cebadores PCR fueron:

cebador directo: TGTCTAGAGACAGCCGCATCTT (SEC ID N°: 230)

cebador inverso: CACCGACCTTACCATCTTGT (SEC ID N°: 231)

15 y la sonda PCR fue JOE-TTGTGCAGTGCCAGCCTCGTCTCA-TAMRA (SEC ID N°: 232) en la que JOE es el colorante fluorescente informador y TAMRA es el colorante inactivador.

Los datos son de un experimento en el que se trataron hepatocitos de rata primarios con una concentración 150 nM de oligonucleótidos antisentido. Los resultados, que se muestran en la tabla 11, se expresan como porcentaje de inhibición con respecto a células control no tratadas. Si está presente, "N.D." indica "sin datos".

20 **Tabla 11 - Inhibición de niveles de ARNm de apolipoproteína C-III de rata mediante oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi**

ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	% DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º
340982	Codificante	225	213	TGAACTTATCAGTGAAGTTG	0	233
340987	Codificante	225	238	TCAGGGCCAGACTCCCAGAG	7	234
340988	Codificante	225	258	TTGGTGTTGTTAGTTGGTCC	0	235
340991	Codificante	225	258	TTGGTGTTGTTAGTTGGTCC	0	236
353932	Codificante	225	10	AGAGCCACGAGGGCCACGA T	0	237
353933	Codificante	225	20	AGAGGCCAGGAGAGCCACG A	15	238
353934	Codificante	225	30	CAGCTCGGGCAGAGGCCAG G	2	239
353935	Codificante	225	40	TCTCCCTCATCAGCTCGGGC	0	240
353936	Codificante	225	59	GCCCAGCAGCAAGGATCCCT	73	241
353937	Codificante	225	69	CCTGCATAGAGCCCAGCAGC	0	242
353938	Codificante	225	79	TCCATGTAGCCCTGCATAGA	90	243
353940	Codificante	225	99	GGACCGTCTTGGAGGCTTGT	76	244
353941	Codificante	225	109	AGTGCATCCTGGACCGTCTT	61	245
353942	Codificante	225	119	CATGCTGCTTAGTGCATCCT	0	246
353943	Codificante	225	129	CAGACTCCTGCATGCTGCTT	57	247
353944	Codificante	225	139	ACAGCTATATCAGACTCCTG	0	248
353945	Codificante	225	148	CTGGCCACCACAGCTATATC	0	249

ES 2 373 101 T3

(continuación)

ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	% DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º
353946	Codificante	225	169	AAGCGATTGTCCATCCAGCC	0	250
353949	Codificante	225	195	TGCTCCAGTAGCCTTTCAGG	0	251
353950	Codificante	225	200	GAACTTGCTCCAGTAGCCTT	35	252
353951	Codificante	225	204	CAGTGAACCTTGCTCCAGTAG	0	253
353952	Codificante	225	209	CTTATCAGTGAACCTTGCTCC	0	254
353953	Codificante	225	217	CCAGTGAACCTTATCAGTGAA	0	255
353954	Codificante	225	221	GAGGCCAGTGAACCTTATCAG	0	256
353955	Codificante	225	224	CCAGAGGCCAGTGAACCTTAT	31	257
353956	Codificante	225	229	GACTCCCAGAGGCCAGTGAA	0	258
353957	Codificante	225	234	GGCCAGACTCCCAGAGGCC A	0	259
353958	Codificante	225	247	AGTTGGTCCTCAGGGCCAGA	0	260
353959	Codificante	225	250	GTTAGTTGGTCCTCAGGGCC	0	261
353960	Codificante	225	254	TGTTGTTAGTTGGTCCTCAG	0	262
353961	Codificante	225	262	AGAGTTGGTGTGTTAGTTG	0	263
353962	Codificante	225	267	GCTCAAGAGTTGGTGTGTT	0	264
353963	Codificante	225	271	CACGGCTCAAGAGTTGGTGT	0	265
353964	Codón de detención	225	275	GTCTCACGGCTCAAGAGTTG	0	266
353966	Codón de detención	225	285	GAACATGGAGGTCTCACGGC	55	267
353967	Codón de detención	225	289	TCTGGAACATGGAGGTCTCA	0	268
353968	3'UTR	225	293	CACATCTGGAACATGGAGGT	0	269
353969	3'UTR	225	297	CAGACACATCTGGAACATGG	0	270
353970	3'UTR	225	301	TGGCCAGACACATCTGGAAC	49	271
353972	3'UTR	225	309	AGGATAGATGGCCAGACACA	47	272
353973	3'UTR	225	313	CAGCAGGATAGATGGCCAGA	0	273
353974	3'UTR	225	317	GAGGCAGCAGGATAGATGG C	38	274
353975	3'UTR	225	321	TTCGGAGGCAGCAGGATAGA	0	275
353976	3'UTR	225	325	AACCTTCGGAGGCAGCAGGA	19	276
353977	3'UTR	225	329	GAGCAACCTTCGGAGGCAGC	88	277
353978	3' UTR	225	333	CTTAGAGCAACCTTCGGAGG	77	278
353979	3'UTR	225	337	TCCCCTTAGAGCAACCTTCG	0	279
353980	3'UTR	225	341	ACTTTCCCCTTAGAGCAACC	45	280
353981	3'UTR	225	345	ATATACTTTCCCCTTAGAGC	28	281
353982	3'UTR	225	349	GAGAATATACTTTCCCCTTA	96	282
353983	3'UTR	225	353	GCATGAGAATATACTTTCCC	69	283

(continuación)

ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	% DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º
353984	3'UTR	225	357	AAAGGCATGAGAATATACTT	47	284
353985	3'UTR	225	361	GGATAAAGGCATGAGAATAT	0	285
353986	3'UTR	225	365	GGAGGGATAAAGGCATGAGA	0	286
353987	3'UTR	225	386	GCATGTTTAGGTGAGGTCTG	100	287
353988	3'UTR	225	390	GACAGCATGTTTAGGTGAGG	0	288
353990	3'UTR	225	398	TTATTTGGGACAGCATGTTT	0	289
353991	3'UTR	225	402	GCTTTTATTTGGGACAGCAT	0	290
353992	3'UTR	225	407	TCCCAGCTTTTATTTGGGAC	22	291

Se diseñó una serie adicional de compuestos antisentido para diferentes regiones diana del ARNm de apolipoproteína C-III de rata usando secuencias descritas en el presente documento (SEC ID N°: 225 y la secuencia con el número de acceso del Genbank NM\_ 012501.1, incorporada al presente documento como SEC ID N°: 226). Los compuestos se muestran en la tabla 12. "Sitio diana" indica el primer nucleótido (extremo 5') numerado en la secuencia diana particular al que se une el compuesto. Todos los compuestos de la tabla 12 son oligonucleótidos quiméricos ("gapmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos por una región "hueco" que consta de diez 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada por ambos lados (direcciones 5' y 3') por "flancos" de cinco nucleótidos. Los flancos están compuestos por 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, también conocidos como (2'-MOE) nucleótidos. Las uniones entre nucleósidos (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los restos de citidina son 5-metilcitidinas.

**Tabla 12 - Oligonucleótidos de fosforoditioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi, dirigidos a apolipoproteína C-III de rata**

ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	SEC ID N.º
340937	Codificante	226	8	CACGATGAGGAGCATTCGGG	292
340938	Codificante	226	13	AGGGCCACGATGAGGAGCAT	293
340939	Codificante	225	6	CCACGAGGGCCACGATGAGG	294
340940	Codificante	225	11	GAGAGCCACGAGGGCCACGA	295
340941	Codificante	225	16	GCCAGGAGAGCCACGAGGGC	296
340942	Codificante	225	21	CAGAGGCCAGGAGAGCCACG	297
340943	Codificante	225	26	TCGGGCAGAGGCCAGGAGAG	298
340944	Codificante	225	31	TCAGCTCGGGCAGAGGCCAG	299
340945	Codificante	225	36	CCTCATCAGCTCGGGCAGAG	300
340946	Codificante	225	41	CTCTCCCTCATCAGCTCGGG	301
340947	Codificante	225	46	GATCCCTCTCCCTCATCAGC	302
340948	Codificante	225	51	GCAAGGATCCCTCTCCCTCA	303
340949	Codificante	225	56	CAGCAGCAAGGATCCCTCTC	304
340950	Codificante	225	61	GAGCCCAGCAGCAAGGATCC	305
340951	Codificante	225	66	GCATAGAGCCCAGCAGCAAG	306
340952	Codificante	225	71	GCCCTGCATAGAGCCCAGCA	307
340953	Codificante	225	76	ATGTAGCCCTGCATAGAGCC	308
340954	Codificante	225	81	GTTCCATGTAGCCCTGCATA	309

ES 2 373 101 T3

(continuación)

ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	SEC ID N.º
340955	Codificante	225	86	GGCTTGTTCCATGTAGCCCT	310
340956	Codificante	225	91	TTGGAGGCTTGTTCCATGTA	311
340957	Codificante	225	96	CCGTCTTGAGGCTTGTTCC	312
340958	Codificante	225	101	CTGGACCGTCTTGAGGCTT	313
340959	Codificante	225	106	GCATCCTGGACCGTCTTGGA	314
340960	Codificante	225	111	TTAGTGCATCCTGGACCGTC	315
340961	Codificante	225	116	GCTGCTTAGTGCATCCTGGA	316
340962	Codificante	225	121	TGCATGCTGCTTAGTGCATC	317
340963	Codificante	225	126	ACTCCTGCATGCTGCTTAGT	318
340964	Codificante	225	131	ATCAGACTCCTGCATGCTGC	319
340965	Codificante	225	136	GCTATATCAGACTCCTGCAT	320
340966	Codificante	225	141	CCACAGCTATATCAGACTCC	321
340967	Codificante	225	146	GGCCACCACAGCTATATCAG	322
340968	Codificante	226	163	CTGCTGGCCACCACAGCTAT	323
340969	Codificante	226	168	AGCCCCTGCTGGCCACCACA	324
340970	Codificante	226	173	CATCCAGCCCCTGCTGGCCA	325
340971	Codificante	226	178	TTGTCCATCCAGCCCCTGCT	326
340972	Codificante	226	179	ATTGTCCATCCAGCCCCTGC	327
340973	Codificante	225	168	AGCGATTGTCCATCCAGCCC	328
340974	Codificante	225	173	TTTGAAGCGATTGTCCATCC	329
340975	Codificante	225	178	AGGGATTTGAAGCGATTGTC	330
340976	Codificante	225	183	CTTTCAGGGATTTGAAGCGA	331
340977	Codificante	225	188	GTAGCCTTTCAGGGATTTGA	332
340978	Codificante	225	193	CTCCAGTAGCCTTTCAGGGA	333
340979	Codificante	225	198	ACTTGCTCCAGTAGCCTTTC	334
34980	Codificante	225	203	AGTGAACTTGCTCCAGTAGC	335
340981	Codificante	225	208	TTATCAGTGAACTTGCTCCA	336
34983	Codificante	225	218	GCCAGTGAACTTATCAGTGA	337
340984	Codificante	225	223	CAGAGGCCAGTGAACTTATC	338
340985	Codificante	225	228	ACTCCCAGAGGCCAGTGAAC	339
340986	Codificante	225	233	GCCAGACTCCCAGAGGCCAG	340
340989	Codificante	225	248	TAGTTGGTCCTCAGGGCCAG	341
340990	Codificante	225	253	GTTGTTAGTTGGTCCTCAGG	342
340992	Codificante	225	263	AAGAGTTGGTGTGTTAGTT	343
340993	Codificante	225	268	GGCTCAAGAGTTGGTGTGTT	344
340994	Codón de detención	225	272	TCACGGCTCAAGAGTTGGTG	345
353939	Codificante	225	89	GGAGGCTTGTTCCATGTAGC	346

(continuación)

ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	SEC ID N.º
353947	Codificante	225	180	TCAGGGATTTGAAGCGATTG	347
353948	Codificante	225	190	CAGTAGCCTTTCAGGGATTT	348
353965	Codón de detención	225	281	ATGGAGGTCTCACGGCTCAA	349
353971	3' UTR	225	305	TAGATGGCCAGACACATCTG	350
353989	3' UTR	225	394	TTGGGACAGCATGTTTAGGT	351

**Ejemplo 33: Inhibición antisentido de la expresión de apolipoproteína C-III de rata mediante oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi. Estudio de respuesta a la dosis en hepatocitos de rata primarios**

- 5 Se seleccionaron cuatro oligonucleótidos para los estudios de respuesta a la dosis adicionales. Los hepatocitos de rata primarios se trataron con 10, 50, 150 y 300 nM de ISIS 167878 (SEC ID N°: 115), ISIS 167880 (SEC ID N°: 117), ISIS 340982 (SEC ID N°: 233), o el control oligo mezclado ISIS 113529 (SEC ID N°: 222) y se midieron los niveles de ARNm 24 horas después del tratamiento con oligonucleótidos tal como se describe en otros ejemplos del presente documento. Las células no tratadas sirvieron como control con respecto al que se normalizaron los datos.
- 10 Los resultados de estos estudios se muestran en la tabla 13. Los datos se promediaron a partir de tres experimentos y se expresaron como porcentaje de inhibición con relación a los controles no tratados. Si está presente, "N.D." indica "sin datos".

**Tabla 13 – Inhibición antisentido de la expresión de ARNm de apolipoproteína C-III en hepatocitos de rata primaria 24 horas después del tratamiento con oligonucleótidos**

ISIS N°	SEC ID N.º	Dosis de oligonucleótidos			
		10 nM	50 nM	150 nM	300 nM
		% de inhibición			
167878	115	0	0	0	4
167880	117	21	19	20	33
340982	233	15	70	83	91
113529	222	N.D.	N.D.	N.D.	9

- 15 Tal como se muestra en la tabla 13, ISIS 340982 fue eficaz en reducir los niveles de ARNm de apolipoproteína C-III de un modo dependiente de la dosis.

**Ejemplo 34: Inhibición antisentido de la expresión de apolipoproteína C-III de rata mediante oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi Estudio adicional de respuesta a la dosis en hepatocitos de rata primarios**

- 20 Se seleccionó un grupo adicional de oligonucleótidos antisentido dirigidos a apolipoproteína C-III de rata para los estudios de respuesta a la dosis. Los hepatocitos de rata primarios se trataron con una concentración 10, 50, 150 y 300 nM de ISIS 353977 (SEC ID N°: 277), ISIS 353978 (SEC ID N°: 278), ISIS 353982 (SEC ID N°: 282), ISIS 353983 (SEC ID N°: 283) o ISIS 353987 (SEC ID N°: 287) durante un periodo de 24 horas. Los niveles de expresión diana se cuantificaron por PCR en tiempo real tal como se describe en el presente documento. Las células no tratadas sirvieron como control con respecto al que se normalizaron los datos. Los resultados, que se muestran en la tabla 14, son la media de tres experimentos y se presentan como porcentaje de inhibición de ARNm de apolipoproteína relativos a las células control no tratadas.
- 25

**Tabla 14 – Inhibición dependiente de la dosis de la expresión de ARNm de apolipoproteína C-III en hepatocitos de rata primarios 24 horas después del tratamiento con oligonucleótidos**

ISIS Nº	SEC ID N.º	Dosis de oligonucleótidos			
		10 nM	50 nM	150 nM	300 nM
		% de inhibición			
353977	277	26	10	3	2
353978	278	46	23	8	5
353982	282	35	21	10	2
353983	283	46	23	12	2
353987	287	38	25	12	4

5 Estos datos muestran que ISIS 353977, ISIS 353978, ISIS 353982, ISIS 353983 e ISIS 353987 reducen eficazmente el ARNm de apolipoproteína C-III de un modo dependiente de la dosis.

**Ejemplo 35: Inhibición antisentido de niveles de ARNm de apolipoproteína C-III *in vivo***

10 Se evaluaron los efectos de la inhibición antisentido de apolipoproteína C-III en ratas. Se alimentaron ratas Sprague-Dawley macho de 6 semanas de edad (Charles River Labs, Wilmington, MA, Estados Unidos) con una dieta de roedor normal. Los animales recibieron inyecciones intraperitoneales de ISIS 340982 (SEC ID Nº: 233) dos veces a la semana durante dos semanas. Un grupo de animales (n= 4) recibieron 75 mg/kg de ISIS 340982 y un grupo de animales (n= 4) recibieron 100 mg/kg de ISIS 340982. Los animales tratados con solución salina (n = 4) sirvieron como grupo control.

15 Al finalizar el periodo de tratamiento, los animales se sacrificaron y se aisló ARN del hígado. Se midió el ARNm de apolipoproteína C-III tal como se describe para otros ejemplos del presente documento. Los resultados para cada grupo de tratamiento se promediaron y los niveles de ARNm en hígado de ratones tratados con ISIS 340982 se normalizaron con los niveles de ARNm en hígado de los ratones tratados con solución salina. El tratamiento con 75 mg/kg o 100 mg/kg de ISIS 340982 dieron como resultado una reducción del 69 % y una reducción del 84 % en hígado de ARNm de apolipoproteína C-III, respectivamente, lo que demuestra que ISIS 340982 inhibe eficazmente la expresión de ARNm diana *in vivo*.

20 **Ejemplo 36: Efectos de la inhibición antisentido de apolipoproteína C-III de rata *in vivo* sobre pesos corporales, de hígado y de bazo**

25 Las ratas tratadas con ISIS 340782 (SEC ID Nº: 233) tal como se describe en el ejemplo 35 se analizaron para determinar cambios en el peso corporal y en el peso del hígado y del bazo. Los pesos corporales se registraron al comienzo del estudio (semana 0). Siguiendo al tratamiento de dos semanas con inyecciones dos veces a la semana de solución salina o ISIS 340782 a una concentración de 75 o 100 mg/kg, los animales se sacrificaron, cuarenta y ocho horas después de la inyección cuarta y última, los animales se sacrificaron. Se registraron los pesos corporales, de hígado y de bazo a la conclusión del estudio.

**Tabla 15 – Pesos corporales, de hígado y de bazo de ratas tratadas con oligonucleótido antisentido dirigido a apolipoproteína C-III**

Medida	Solución Salina		Tratamiento con ISIS 340892			
	Semana 0	Semana 2	75 mg/kg		100 mg/kg	
			Semana 0	Semana 2	Semana 0	Semana 2
Peso corporal (g)	529	536	485	448	478	425
Peso del hígado (g)	N.D.	19	N.D.	14	N.D.	16
Peso del bazo (mg)	N.D.	1,1	N.D.	1,6	N.D.	1,6

30 Estos datos demuestran que la inhibición antisentido de de ARNm de apolipoproteína C-III no estaba asociada con cambios en el peso corporal, del hígado o del bazo.



**Ejemplo 37: Efectos de la inhibición antisentido de apolipoproteína C-III de rata *in vivo* niveles de lípidos y glucosa en sangre**

Se analizaron las ratas tratadas tal como se ha descrito en el ejemplo 35 para evaluar los cambios en el colesterol total, los triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL, ácidos grasos libres y glucosa en sangre. Las muestras de sangre se recogieron justo antes de los tratamientos (semana 0) y se siguió con el tratamiento de dos semanas con inyecciones dos veces a la semana de solución salina o ISIS 340982 (SEC ID N°: 233) a una concentración de 75 o 100 mg/kg. Los niveles de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos, ácidos grasos libres y glucosa se midieron usando un analizador clínico Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY, Estados Unidos). Los datos de los cuatro animales de cada grupo de tratamiento se promediaron. Los resultados se muestran en la tabla 16.

**10 Tabla 16 - Efectos de la inhibición antisentido de apolipoproteína C-III de rata en lípidos y glucosa en sangre**

Marcador biológico medido	Tratamiento					
	Solución salina		75 mg/kg ISIS 340982		100 mg/kg ISIS 340982	
	Semana 0	Semana 2	Semana 0	Semana 2	Semana 0	Semana 2
Triglicéridos mg/dl	162	162	111	24	139	17
Colesterol total mg/dl	112	102	106	40	107	31
Colesterol HDL mg/dl	66	63	83	23	96	17
Colesterol LDL mg/dl	29	32	35	13	37	10
Ácidos grasos libres mg/l	0,48	0,46	0,72	0,70	0,57	0,53
Glucosa mg/dl	153	151	147	127	164	166

A partir de los datos mostrados en la tabla 16 se evidencia que el tratamiento con ISIS 340982, a ambas dosis administradas, reduce significativamente los triglicéridos, el colesterol total, el colesterol HDL y el colesterol LDL en circulación en ratas. Además, estos animales muestran una expresión reducida de ARNm de apolipoproteína C-III en hígado después del tratamiento con ISIS 340982.

**Ejemplo 38: Efectos de la inhibición antisentido de apolipoproteína C-III de rata *in vivo* Transaminasas en suero**

Las ratas tratadas tal como se ha descrito en el ejemplo 35 se analizaron para evaluar la toxicidad en el hígado después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido. Después del tratamiento de dos semanas con inyecciones dos veces a la semana de 75 mg/kg y 100 mg/kg de ISIS 340982 (SEC ID N°: 233), los animales se sacrificaron y su sangre se recogió y se procesó para realizar análisis clínicos rutinarios. Los aumentos de transaminasas ALT y AST en suero, que pueden indicar hepatotoxicidad, también se midieron usando un analizador clínico Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY, Estados Unidos). Los niveles de ALT y AST, que se muestran en la tabla 17, también se muestran como resultado promedio para cada grupo de tratamiento de 4 animales, en unidades internacionales/litro (UI/l).

**Tabla 17 – Efectos del tratamiento con ISIS 340982 sobre los niveles de transaminasas en suero en ratas**

transaminasas en suero	Tratamiento		
	Solución Salina	75 mg/kg de ISIS 340982	100 mg/kg de ISIS 340982
ALT UI/l	70	49	59
AST UI/l	93	127	147

Los niveles de ALT o AST que son el doble que en el control salino se consideran indicativos de hepatotoxicidad.

Estos datos muestran que el tratamiento con ISIS 340982 en ratas, tanto a una dosis de 75 mg/kg como de 100 mg/kg, no dio como resultado una hepatotoxicidad significativa.

**Ejemplo 39: Inhibición antisentido de la expresión de apolipoproteína C-III de hámster mediante oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi**

5 Con el fin de diseñar oligonucleótidos antisentido para regiones diferentes de ARNm de apolipoproteína C-III de hámster, se secuenció un segmento de ARNm de apolipoproteína C-III de hámster *Mesocricetus auratus* para proporcionar un segmento de secuencia de región codificante y 3' UTR, debido a que no estaba disponible ninguna secuencia de ARNm de apolipoproteína C-III de hámster. El ARN se aisló y purificó a partir de hepatocitos de hámster primarios (InVitro Technologies, Gaithersburg, MD, Estados Unidos) y se sometió a una reacción de transcriptasa inversa (kit de Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). El ADNc resultante fue el sustrato para 10 40 ciclos de amplificación por PCR (Amplitaq PCR kit, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), usando cebadores directos e inversos para alinearse a los extremos 5' y 3', respectivamente, de ARNm de apolipoproteína C-III de hámster. Siguiendo a la purificación en gel del fragmento de 435 pb resultante, las reacciones de secuenciación directa e inversa de cada producto se realizaron por Retrogen (San Diego, CA, Estados Unidos). 15 La secuencia de hámster se incorpora al presente documento como SEC ID N°: 352.

Se diseñó una serie de compuestos antisentido para diferentes regiones diana del ARNm de apolipoproteína C-III de hámster (SEC ID N°: 352). Los compuestos se muestran en la tabla 18. "Sitio diana" indica el primer nucleótido (extremo 5') numerado en la secuencia diana particular al que se une el compuesto. Todos los compuestos de la tabla 18 son oligonucleótidos quiméricos ("gapmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos por una región "hueco" que 20 consta de diez 2'-desoxinucleótidos, que están flanqueados por ambos lados (direcciones 5' y 3') por "flancos" de cinco nucleótidos. Los flancos están compuestos por 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, también conocidos como (2'-MOE) nucleótidos. Las uniones entre nucleósidos (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los restos de citidina son 5-metilcitidinas.

Los compuestos se analizaron para determinar su efecto sobre niveles de apolipoproteína C-III hepatocitos primarios de hámster mediante PCR cuantitativa en tiempo real tal como se describe en otros ejemplos en el presente documento. Las sondas y cebadores de apolipoproteína C-III de hámster se diseñaron para que se hibridaran con una secuencia de apolipoproteína C-III de hámster, usando la secuencia de ARNm de hámster que se describe en el presente documento (SEC ID N°: 352). Para apolipoproteína C-III de hámster, los cebadores fueron:

cebador directo: CGCTAACCAGCATGCAAAAG (SEC ID N°: 353)

30 cebador inverso: CACCGTCCATCCAGTCCC (SEC ID N°: 354) y la

sonda PCR fue: FAM-CTGAGGTGGCTGTGCGGGCC-TAMRA (SEC ID N°: 355) en la que FAM es el colorante fluorescente y TAMRA es el colorante inactivador.

Para GAPDH de hámster, los cebadores PCR fueron:

cebador directo: CCAGCCTCGCTCCGG (SEC ID N°: 356)

35 cebador inverso: CCAATACGGCCAAATCCG (SEC ID N°: 357)

y la sonda PCR fue JOE-ACGCAATGGTGAAGGTGGCG-TAMRA (SEC ID N°: 358) en la que JOE es el colorante fluorescente informador y TAMRA es el colorante inactivador.

Los datos son de un experimento en el que se trataron hepatocitos de hámster primarios con una concentración 150 nM de los oligonucleótidos. Los datos, mostrados en la tabla 18, están normalizados para células control no tratadas. Si está presente, "N.D." indica "sin datos". 40

**Tabla 18 - Inhibición de niveles de ARNm de apolipoproteína C-III de hámster mediante oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi**

ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	% DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º
352929	Codificante	352	5	TGCCAAGAGGGCAACAATAG	17	359
352930	Codificante	352	10	AGGAGTGCCAAGAGGGCAAC	62	360
352931	Codificante	352	16	GATGCCAGGAGTGCCAAGAG	50	361
352932	Codificante	352	20	GGCAGATGCCAGGAGTGCCA	51	362
352933	Codificante	352	39	CTCTACCTCATTAGCTTCGG	0	363
352934	Codificante	352	41	CCCTCTACCTCATTAGCTTC	47	364

ES 2 373 101 T3

(continuación)

ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	% DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º
352935	Codificante	352	44	GACCCCTCTACCTCATTAGC	0	365
352936	Codificante	352	49	GCAAGGACCCCTCTACCTCA	15	366
352937	Codificante	352	54	CAGCAGCAAGGACCCCTCTA	45	367
352938	Codificante	352	59	GAGCCCAGCAGCAAGGACCC	0	368
352939	Codificante	352	65	TGCACAGAGCCCAGCAGCAA	84	369
352940	Codificante	352	70	AGCCCTGCACAGAGCCCAGC	0	370
352941	Codificante	352	75	CATGTAGCCCTGCACAGAGC	0	371
352942	Codificante	352	80	TGTTCCATGTAGCCCTGCAC	49	372
352943	Codificante	352	85	TGGCCTGTTCCATGTAGCCC	55	373
352945	Codificante	352	95	ACCTTCTTGGTGGCCTGTTC	62	374
352946	Codificante	352	106	GCGCATCCTGGACCTTCTTG	0	375
352948	Codificante	352	115	TGCTGGTTAGCGCATCCTGG	0	376
352949	Codificante	352	120	TTGCATGCTGGTTAGCGCAT	3	377
352950	Codificante	352	125	GACTTTTGCATGCTGGTTAG	59	378
352951	Codificante	352	130	CCTCAGACTTTTGCATGCTG	72	379
352952	Codificante	352	135	AGCCACCTCAGACTTTTGCA	75	380
352953	Codificante	352	140	CGCACAGCCACCTCAGACTT	64	381
352955	Codificante	352	153	CCAGTCCCTGGCCCGCACAG	66	382
352956	Codificante	352	159	GTCCATCCAGTCCCTGGCCC	73	383
352957	Codificante	352	161	CCGTCCATCCAGTCCCTGGC	0	384
352958	Codificante	352	165	GCCACCGTCCATCCAGTCCC	0	385
352959	Codificante	352	170	GTGAAGCCACCGTCCATCCA	12	386
352960	Codificante	352	174	GGAGGTGAAGCCACCGTCCA	0	387
352961	Codificante	352	193	TGCTCCAGTAGCTTTTCAGG	59	388
352962	Codificante	352	200	GTAAATGTGCTCCAGTAGCT	66	389
352963	Codificante	352	205	TGTCAGTAAATGTGCTCCAG	78	390
352965	Codificante	352	214	TGGAGACCGTGTGAGTAAAT	38	391
352966	Codificante	352	217	GGCTGGAGACCGTGTGAGTA	66	392
352967	Codificante	352	221	CAGAGGCTGGAGACCGTGTC	13	393
352968	Codificante	352	225	ATCCCAGAGGCTGGAGACCG	0	394
352969	Codificante	352	230	GAAGAATCCCAGAGGCTGGA	54	395
352970	Codificante	352	269	TCTCAAGGCTCAGTAGCTGG	0	396
352971	Codificante	352	275	TAGAGGTCTCAAGGCTCAGT	70	397
352972	Codón de detención	352	280	GAACGTAGAGGTCTCAAGGC	61	398
352973	Codón de detención	352	286	CATTTGGAACGTAGAGGTCT	64	399
352974	3' UTR	352	292	CAAGCACATTTGGAACGTAG	0	400
352975	3' UTR	352	300	TGGACACACAAGCACATTTG	0	401

(continuación)

ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	% DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º
352976	3' UTR	352	305	CAGGATGGACACACAAGCAC	43	402
352977	3' UTR	352	311	GGCCAGCAGGATGGACACAC	81	403
352978	3' UTR	352	318	GCCCAGAGGCCAGCAGGATG	60	404
352979	3' UTR	352	348	CCTTTCAAACAACCTTCAGG	56	405
352980	3' UTR	352	402	GGACAGCATGTTTAGGTGAC	67	406

Se diseñó una serie adicional de oligonucleótidos para diferentes regiones diana del ARNm de apolipoproteína C-III de hámster usando secuencias descritas en el presente documento (SEC ID N°: 352). Los oligonucleótidos se muestran en la tabla 19. "Sitio diana" indica el primer nucleótido (extremo 5') numerado en la secuencia diana particular al que se une el compuesto. Todos los compuestos de la tabla 19 son oligonucleótidos quiméricos ("gapmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos por una región "hueco" que consta de diez 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada por ambos lados (direcciones 5' y 3') por "flancos" de cinco nucleótidos. Los flancos están compuestos por 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, también conocidos como (2'-MOE) nucleótidos. Las uniones entre nucleósidos (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los restos de citidina son 5-metilcitidinas.

5

10 **Tabla 19 - Oligonucleótidos de fosforoditioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi dirigidos a ARNm de apolipoproteína C-III de hámster**

ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	SEC ID N.º
352944	Codificante	352	90	CTTGGTGGCCTGTTCCATGT	407
352947	Codificante	352	110	GTTAGCGCATCCTGGACCTT	408
352954	Codificante	352	145	TGGCCCGCACAGCCACCTCA	409
352964	Codificante	352	210	GACCGTGTCAATAATGTGC	410
356295	Codificante	352	1	AAGAGGGCAACAATAGGAGT	411
356296	Codificante	352	6	GTGCCAAGAGGGCAACAATA	412
356297	Codificante	352	15	ATGCCAGGAGTGCCAAGAGG	413
356298	Codificante	352	25	CTTCGGGCAGATGCCAGGAG	414
356299	Codificante	352	31	CATTAGCTTCGGGCAGATGC	415
356300	Codificante	352	60	AGAGCCCAGCAGCAAGGACC	416
356301	Codificante	352	86	GTGGCCTGTTCCATGTAGCC	417
356302	Codificante	352	91	TCTTGGTGGCCTGTTCCATG	418
356303	Codificante	352	96	GACCTTCTTGGTGGCCTGTT	419
356304	Codificante	352	101	TCCTGGACCTTCTTGGTGCC	420
356305	Codificante	352	111	GGTTAGCGCATCCTGGACCT	421
356306	Codificante	352	116	ATGCTGGTTAGCGCATCCTG	422
356307	Codificante	352	121	TTTGCATGCTGGTTAGCGCA	423
356308	Codificante	352	126	AGACTTTTGCATGCTGGTTA	424
356309	Codificante	352	131	ACCTCAGACTTTTGCATGCT	425
356310	Codificante	352	136	CAGCCACCTCAGACTTTTGC	426
356311	Codificante	352	141	CCGCACAGCCACCTCAGACT	427
356312	Codificante	352	146	CTGGCCCGCACAGCCACCTC	428
356313	Codificante	352	151	AGTCCCTGGCCCGCACAGCC	429

ES 2 373 101 T3

(continuación)

ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	SEC ID N.º
356314	Codificante	352	156	CATCCAGTCCCTGGCCCGCA	430
356315	Codificante	352	166	AGCCACCGTCCATCCAGTCC	431
356316	Codificante	352	171	GGTGAAGCCACCGTCCATCC	432
356317	Codificante	352	176	AGGGAGGTGAAGCCACCGTC	433
356318	Codificante	352	181	TTTTCAGGGAGGTGAAGCCA	434
356319	Codificante	352	187	AGTAGCTTTTCAGGGAGGTG	435
356320	Codificante	352	198	AAATGTGCTCCAGTAGCTTT	436
356321	Codificante	352	203	TCAGTAAATGTGCTCCAGTA	437
356322	Codificante	352	208	CCGTGTCAGTAAATGTGCTC	438
356323	Codificante	352	213	GGAGACCGTGTGTCAGTAAATG	439
356324	Codificante	352	218	AGGCTGGAGACCGTGTGTCAGT	440
356325	Codificante	352	223	CCCAGAGGCTGGAGACCGTG	441
356326	Codificante	352	228	AGAATCCCAGAGGCTGGAGA	442
356327	Codón de detención	352	274	AGAGGTCTCAAGGCTCAGTA	443
356328	Codón de detención	352	279	AACGTAGAGGTCTCAAGGCT	444
356329	Codón de detención	352	284	TTTGAACGTAGAGGTCTCA	445
356330	3' UTR	352	289	GCACATTTGGAACGTAGAGG	446
356331	3' UTR	352	294	CACAAGCACATTTGGAACGT	447
356332	3' UTR	352	299	GGACACACAAGCACATTTGG	448
356333	3' UTR	352	304	AGGATGGACACACAAGCACA	449
356334	3' UTR	352	309	CCAGCAGGATGGACACACAA	450
356335	3' UTR	352	314	AGAGGCCAGCAGGATGGACA	451
356336	3' UTR	352	319	GGCCCAGAGGCCAGCAGGAT	452
356337	3' UTR	352	324	ACCCAGGCCAGAGGCCAGC	453
356338	3' UTR	352	329	GGGCCACCCAGGCCAGAGG	454
356339	3' UTR	352	353	CTTCCCTTTCAAACAACCT	455
356340	3' UTR	352	358	CAATARTTCCCTTTCAAAC	456
356341	3' UTR	352	363	CATGACAATACTTTCCCTTT	457
356342	3' UTR	352	368	GAAAACATGACAATACTTTC	458
356343	3' UTR	352	373	GGGATGAAAACATGACAATA	459
356344	3' UTR	352	396	CATGTTTAGGTGACTTCTGG	460
356345	3' UTR	352	401	GACAGCATGTTTAGGTGACT	461
356346	3' UTR	352	406	TTTAGGACAGCATGTTTAGG	462
356347	3' UTR	352	411	CTTTATTTAGGACAGCATGT	463
356348	3' UTR	352	416	TCCAGCTTTATTTAGGACAG	464

**Ejemplo 40: Inhibición antisentido de apolipoproteína C-III de hámster mediante oligonucleótidos de fosforotioato quiméricos que tienen flancos 2'-MOE y un hueco desoxi. Estudios de respuesta a la dosis en hepatocitos de hámster primarios**

- 5 Se seleccionaron seis oligonucleótidos dirigidos a apolipoproteína C-III de hámster para los estudios de respuesta a la dosis adicionales. Los hepatocitos de hámster primarios se trataron con una concentración 50, 150 y 300 nM de ISIS 352939 (SEC ID N°: 369), ISIS 352952 (SEC ID N°: 380), ISIS 352962 (SEC ID N°: 389), ISIS 352963 (SEC ID N°: 390), ISIS 352971 (SEC ID N°: 397) o ISIS 352977 (SEC ID N°: 403) y se midieron los niveles de ARNm 24 horas después del tratamiento con oligonucleótidos tal como se describe en otros ejemplos del presente documento. Las células no tratadas sirvieron como control con respecto al que se normalizaron los datos.
- 10 Los resultados de estos estudios se muestran en la tabla 20. Los datos se promediaron a partir de tres experimentos y se expresaron como porcentaje de inhibición con relación a los controles no tratados.

**Tabla 20 – Inhibición antisentido de la expresión de ARNm de apolipoproteína C-III en hepatocitos de hámster primarios 24 horas después del tratamiento con oligonucleótidos**

ISIS N°	SEC ID N.º	Dosis de oligonucleótidos		
		50 nM	150 nM	300 nM
		% de inhibición		
352939	369	46	64	82
352952	380	59	68	60
352962	389	84	0	22
352963	390	0	0	42
352971	397	0	27	0
352977	403	48	72	56

- 15 Tal como se muestra en la tabla 20, ISIS 352939 fue eficaz en reducir los niveles de ARNm de apolipoproteína C-III de hámster de un modo dependiente de la dosis.

**Ejemplo 41: Oligonucleótidos antisentido dirigidos a apolipoproteína C-III de ratón**

- 20 Se diseñaron oligonucleótidos antisentido dirigidos a apolipoproteína C-III de ratón usando información de secuencia publicada (número de acceso del GenBank L04150.1, incorporada al presente documento como SEC ID N°: 11). Ambos están dirigidos a la posición del nucleótido 496 de SEC ID N°: 11, tal como hace ISIS 167880 (SEC ID N°: 117), pero varían en la composición química con relación a ISIS 167880. ISIS 340995 tiene 20 nucleótidos de longitud, está compuesto por una región hueco central de 10 nucleótidos de longitud, mientras que el hueco contiene tanto 2' desoxinucleótidos como 2'-MOE (MOE) nucleótidos. La composición de los nucleótidos se muestra en el tabla 21, en la
- 25 que los 2'-MOE nucleótidos se indican en negrita y los 2' desoxinucleótidos están subrayados. El hueco está flanqueado por ambos lados (extremos 5' y 3') por "flancos" de 5 nucleótidos compuestos por 2'-MOE nucleótidos. ISIS 340997 (SEC ID N°: 117) tiene 20 nucleótidos de longitud y está compuesto uniformemente por 2'-MOE nucleótidos. A lo largo de ISIS 340995 y de ISIS 340997, las uniones entre nucleósidos (esqueleto) son fosforotioato y todos los restos de citidinas son citidinas no modificadas.

30 **Tabla 21 - Oligonucleótidos antisentido dirigidos a apolipoproteína C-III de ratón**

ISISNO	Región	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	Sitio diana	SECUENCIA	SEC ID N.º
340995	3' UTR	11	496	TCTTATCCAGCTTTATTAGG	117
340997	3' UTR	11	496	TCTTATCCAGCTTTATTAGG	117

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Isis Pharmaceuticals Inc.  
 Rosanne M. Crooke  
 Mark J. Graham  
 5 Kristina M. Lemonidis  
 Kenneth W. Dobie  
  
 <120> MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE APOLIPOPROTEÍNA C-III  
 <130> BIOL0004WO  
 <150>  
 10 US 10/418,780  
 <151> 2003-04-16  
 <160> 468  
  
 <210> 1  
 <211> 20  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido  
  
 <400> 1  
 20 tccgtcatcg ctctcaggg 20  
  
 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido  
  
 <400> 2  
 gtgcgcgcga gcccgaaatc 20  
  
 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido  
  
 <400> 3  
 35 atgcattctg cccccaagga 20  
  
 <210> 4  
 <211> 3958  
 <212> ADN  
 40 <213> H. sapiens  
  
 <220>  
 <400> 4

ES 2 373 101 T3

ctactccagg ctgtgttcag ggcttggggc tggaggagg aggggcctga aattccagtg 60  
 tgaaaggctg agatgggccc gagggccctg gcctatgtcc aagccatttc ccctctcacc 120  
 agcctctccc tggggagcca gtcagctagg aaggaatgag ggctccccag gccaccccc 180  
 agttcctgag ctcatctggg ctgcagggct ggggggacag cagcgtggac tcagtctcct 240  
 agggatttcc caactctccc gcccgcttgc tgcattctgga caccctgect caggccctca 300  
 tctccactgg tcagcaggtg acctttgccc agcgccctgg gtccctcagtg cctgctgccc 360  
 tggagatgat ataaaacagg tcagaaccct cctgcctgtc tgctcagttc atccctagag 420  
 gcagctgctc caggtaatgc cctctgggga ggggaaagag gaggggagga ggatgaagag 480  
 gggcaagagg agctccctgc ccagcccagc cagcaagcct ggagaagcac ttgctagagc 540  
 taaggaagcc tcggagctgg acgggtgccc cccacccctc atcataacct gaagaacatg 600  
 gagggccggg aggggtgtca cttgccaaa gctacatagg ggggtgggct ggaagtggct 660  
 ccaagtgcag gttccccct cattcttcag gcttagggct ggaggaagcc ttagacagcc 720  
 cagtccacc ccagacaggg aaactgaggc ctggagaggg ccagaaatca ccaaagaca 780  
 cacagcatgt tggctggact ggacggagat cagtccagac cgcaggtgcc ttgatgttca 840  
 gtctgggtggg ttttctgctc catcccacc acctcccttt gggcctcgat ccctcgcccc 900  
 tcaccagtcc cccttctgag agcccgtatt agcagggagc cggcccctac tccttctggc 960  
 agaccagct aaggttctac cttaggggcc acgccacctc cccagggagg ggtccagagg 1020  
 catggggacc tgggggtgccc ctcacaggac acttccttgc aggaacagag gtgccatgca 1080  
 gccccgggta ctcttgttg ttgccctcct ggcgctcctg gcctctgccc gtaagcactt 1140  
 ggtgggactg ggctgggggc aggggtggagg caacttgggg atcccagtcc caatgggtgg 1200  
 tcaagcagga gccagggct cgtccatagg ccgatccacc cactcagcc ctgctcttcc 1260  
 ctcaggagct tcagaggccg aggatgcctc ccttctcagc ttcattgcagg gctacatgaa 1320  
 gcacgccacc aagaccgcca aggatgcact gagcagcgtg caggagtccc aggtggccca 1380  
 gcaggccagg tacaccgct ggcctccctc cccatcccc ctgccagctg cctccattcc 1440  
 ccccccccc tgcctggtg agatcccaac aatggaatgg aggtgctcca gcctccctg 1500  
 ggcctgtgce tcttcagcct cctcttctcct cacagggcct ttgtcaggct gctgctggag 1560  
 agatgacaga gttgagactg cattcctccc aggtccctcc tttctcccc gagcagtcct 1620  
 agggcgcgcc gttttagccc tcatttccat tttcttctcc tttcccttcc tttcccttcc 1680  
 tatttcttcc tttcttctct tcttcttctc tttcttctct tcttcttctc tttcttctct 1740  
 tcttcttctc ctttcttctc ttcttctctc ctttcttctc ttcttctctc tcttcttctc 1800



ES 2 373 101 T3

tctttctttc tttccttttt ctttctttcc ctctcttctt ttctctcttt ctttcttctt 1860  
 cttttttttt taatggagtc tccctctgtc acccaggctg gagtgcagtg gtgccatctc 1920  
 ggctcactgc aacctccgtc tcccgggttc aaccattct cctgcctcag cctcccaagt 1980  
 agctgggatt acaggcacgc gccaccacac ccagctaatt tttgtatfff tagcagagat 2040  
 ggggtttcac catgttggcc aggttggctt tgaattcctg acctcagggg atcctcctgc 2100  
 ctggcctcc caaagcgtg ggattacagg catgagccac tgcgcctggc cccattttcc 2160  
 ttttctgaag gtctggctag agcagtggtc ctccagcttt ttggcaccag ggaccagtff 2220  
 tgtggtggac aatffffcca tgggccagcg gggatggfff tgggatgaag ctgttccacc 2280  
 tcagatcadc aggcattaga ttctcataag gagccctcca cctagatccc tggcatgtgc 2340  
 agttcacaac agggttcaca ctctatgag aatgtaaggc cacttgatct gacaggaggc 2400  
 ggagctcagg cggatttgc cactcaccca ccaactcact cgtgctgtgc agcccggctc 2460  
 ctaacagtcc atggaccagt acctatctat gacttggggg ttggggacc cttgggctagg 2520  
 ggtttgcctt gggaggcccc acctgaccta attcaagccc gtgagtgett ctgctttgff 2580  
 ctaagacctg gggccagtgt gagcagaagt gtgtccttcc tctcccatcc tgcccctgcc 2640  
 catcagtaact ctctctccc ctactccctt ctccacctca ccctgactgg cattagctgg 2700  
 catagcagag gtgttcataa acattcttag tccccagaac cggctttggg gtaggtgffa 2760  
 ttttctcact ttgcagatga gaaaattgag gctcagagcg attaggtgac ctgccccaga 2820  
 tcacacaact aatcaatcct ccaatgactt tccaaatgag aggctgcctc cctctgtcct 2880  
 acctgctca gagccaccag gttgtgcaac tccaggcggg gctgtttgca cagaaaacaa 2940  
 tgacagcctt gacctttcac atctccccac cctgtcactt tgtgcctcag gcccaggggc 3000  
 ataaacatct gaggtgacct ggagatggca gggtttgact tgtgctgggg ttcttgaag 3060  
 gatatacttt ctcccagggt ggcagctgtg ggggattcct gcctgaggtc tcagggctgt 3120  
 cgtccagtga agttgagagg gtggtgtggt cctgactggg gtcgtccagt ggggacatgg 3180  
 gtgtgggtcc catggttgc tacagaggag ttctcatgcc ctgctctgff gcttcccctg 3240  
 actgatttag gggctgggtg accgatggct tcagttccct gaaagactac tggagcaccg 3300  
 ttaaggacaa gttctctgag ttctgggatt tggaccctga ggtcagacca acttcagccg 3360  
 tggtgcctg agacctcaat accccaagtc cacctgccta tccatcctgc cagctccttg 3420  
 ggtcctgcaa tctccagggc tgcccctgta ggttgcttaa aagggacagt attctcagtg 3480  
 ctctcctacc ccacctcatg cctggcccc ctccaggcat gctggcctcc caataaagct 3540  
 ggacaagaag ctgctatgag tgggccgtcg caagtgtgcc atctgtgtct gggcatggga 3600

ES 2 373 101 T3

aagggccgag gctgttctgt gggggtggcac tggacagact ccaggtcagg caggcatgga 3660  
 gggcagcgct ctatccacct tctggtagct gggcagtcctc tgggcctcag tttcttcatc 3720  
 tctaaggtag gaatcacctt ccgtaccctg ccttccttga cagctttgtg cggaagggtca 3780  
 aacaggacaa taagtttgct gatactttga taaactgtta ggtgctgcac aacatgactt 3840  
 gagtgtgtgc cccatgccag ccactatgcc tggcacttaa gttgtcatca gagttgagac 3900  
 tgtgtgtgtt tactcaaaac tgtggagctg acctccccta tccaggccac ctagecct 3958

5 <210> 5  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 5  
 tcagcttcat gcagggttac at 22

10 <210> 6  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 6  
 acgctgctca gtgcatcct 19

20 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de PCR  
 <400> 7  
 aagcacgccca ccaagaccgc c 21

30 <210> 8  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 8  
 gaaggtgaag gtcggagtc 19

35 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 9  
 gaagatggtg atgggatttc 20

ES 2 373 101 T3

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

5 <220>  
 <223> Sonda de PCR

<400> 10  
 caagctccc gttctcagcc 20

10 <210> 11  
 <211> 518  
 <212> ADN  
 <213> M. musculus

<220>  
 <400> 11

cctgctcagt tttatcccta gaagcagcta gctactccag gtacgtaggt gccatgcagc 60  
 cccggacgct cctcactgtg gcctcttgg ctctcctggc atctgcccga gctgaagagg 120  
 tagagggatc cttgctgctg ggctctgtgc agggctacat ggaacaagcc tccaagacgg 180  
 tccaggatgc gctaagtagc gtgcaggagt ccgatatagc tgcggtggcc aggggctgga 240  
 tggacaatca cttcagattc ctgaaaggct actggagcaa gtttactgac aagttcacccg 300  
 gcttctggga ttctaaccct gaggaccaac caactccagc tattgagtcg tgagacttct 360  
 gtgttgacaga tgtgcctgtt cctccatcct gctgcccccc tccaggcctg ccagggtggcc 420  
 cctgaagggtt gctttaaggg gaaagtatgt tctcatgtct tcaccctcc ctagatctca 480  
 cctaaacatg ctgtccctaa taaagctgga taagaagc 518

15

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

20 <220>  
 <223> Cebador de PCR

<400> 12  
 tgcagggcta catggaacaa 20

25 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador de PCR

30 <400> 13  
 cggactcctg cacgctactt 20

35 <210> 14  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sonda de PCR

ES 2 373 101 T3

```

<400> 14
ctccaagacg gtccaggatg cgc                23

<210> 15
<211> 20
5 <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 15
10 ggcaaattca acggcacagt                20

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
   <223> Cebador de PCR

<400> 16
20 gggctcgcct cctggaagat                20

<210> 17
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda de PCR

25 <400> 17
   aaggccgaga atgggaagct tgtcatc                27

<210> 18
<211> 533
30 <212> ADN
   <213> H. sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (47)...(346)

<400> 18

   tgctcagttc atccctagag gcagctgctc caggaacaga ggtgcc atg cag ccc    55
                                     Met Gln Pro
                                     1

   cgg gta ctc ctt gtt gtt gcc ctc ctg gcg ctc ctg gcc tct gcc cga    103
   Arg Val Leu Leu Val Val Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser Ala Arg
       5                10                15

   gct tca gag gcc gag gat gcc tcc ctt ctc agc ttc atg cag ggt tac    151
   Ala Ser Glu Ala Glu Asp Ala Ser Leu Leu Ser Phe Met Gln Gly Tyr
       20                25                30                35

   atg aag cac gcc acc aag acc gcc aag gat gca ctg agc agc gtg cag    199
   Met Lys His Ala Thr Lys Thr Ala Lys Asp Ala Leu Ser Ser Val Gln
               40                45                50
35

```

ES 2 373 101 T3

gag tcc cag gtg gcc cag cag gcc agg ggc tgg gtg acc gat ggc ttc	247
Glu Ser Gln Val Ala Gln Gln Ala Arg Gly Trp Val Thr Asp Gly Phe	
55 60 65	
agt tcc ctg aaa gac tac tgg agc acc gtt aag gac aag ttc tct gag	295
Ser Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val Lys Asp Lys Phe Ser Glu	
70 75 80	
ttc tgg gat ttg gac cct gag gtc aga cca act tca gcc gtg gct gcc	343
Phe Trp Asp Leu Asp Pro Glu Val Arg Pro Thr Ser Ala Val Ala Ala	
85 90 95	
tga gacctaata cccaagtcc acctgcctat ccatactgag agctccttgg	396
gtcctgcaat ctccagggct gccctgtag gttgcttaaa agggacagta ttctcagtgc	456
tctcctaccc cacctcatgc ctggcccccc tccagggcatg ctggcctccc aataaagctg	516
gacaagaagc tgctatg	533

- 5 <210> 19
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Oligonucleótido antisentido
  
- <400> 19
- ctggagcagc tgctctagg 20
  
- 10 <210> 20
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- 15 <220>
- <223> Oligonucleótido antisentido
  
- <400> 20
- ccctgcatga agctgagaag 20
  
- 20 <210> 21
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Oligonucleótido antisentido
  
- 25 <400> 21
- gtgctcatg taacctgca 20
  
- <210> 22
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- 30 <220>
- <223> Oligonucleótido antisentido
  
- <400> 22
- tgacctgctg ggccacctgg 20
  
- 35 <210> 23
- <211> 20
- <212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
5	<400> 23 tgctccagta gtcttcagg	20
	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 24 tgacctcagg gtccaaatcc	20
	<210> 25	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
20	<400> 25 ctctagggat gaactgagca	20
	<210> 26	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 26 cagctgcctc tagggatgaa	20
30	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 27 ttcctggagc agctgcctct	20
	<210> 28	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
45	<400> 28 acctctgttc ctggagcagc	20
	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 29	
	atggcacctc tgttcctgga	20
5	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
10	<400> 30	
	gggctgcatg gcacctctgt	20
	<210> 31	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 31	
	ggcaacaaca aggagtacc	20
20	<210> 32	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 32	
	ggagggcaac aacaaggagt	20
	<210> 33	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 33	
35	agctcgggca gaggccagga	20
	<210> 34	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 34	
	tctgaagctc gggcagaggc	20
	<210> 35	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 35	

	cggcctctga agctcgggca	20
	<210> 36	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 36	
	catcctcggc ctctgaagct	20
10	<210> 37	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 37	
	gggaggcatc ctcggcctct	20
	<210> 38	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 38	
25	gagaaggag gcatcctcgg	20
	<210> 39	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 39	
	gctgagaagg gagcatcct	20
	<210> 40	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
40	<400> 40	
	tgcatgaagc tgagaaggga	20
	<210> 41	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 41	
	gcgtgctca tgtaaccctg	20
50	<210> 42	



	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 42	
	ttggtggcgt gcttcgatga	20
10	<210> 43	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
15	<400> 43	
	gcatccttgg cggctcttgg	20
	<210> 44	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido.	
	<400> 44	
	ctcagtgcac ccttggcgg	20
25	<210> 45	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
30	<400> 45	
	tgctcagtc atccttggcg	20
	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 46	
	ctcctgcacg ctgctcagtg	20
40	<210> 47	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 47	
	gactcctgca cgctgctcag	20
	<210> 48	
	<211> 20	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 48 gccacctggg actcctgcac	20
5	<210> 49 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 49 gccctggcc tgctggcca	20
15	<210> 50 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 50 agcccctggc ctgctggcc	20
25	<210> 51 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 51 gaagccatcg gtcaccagc	20
35	<210> 52 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 52 ctgaagccat cggcaccca	20
45	<210> 53 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 53 ttcaggga ctgaagccat	20
55	<210> 54 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	

	<400> 54 cagtagtctt tcaggggaact	20
5	<210> 55 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
10	<400> 55 aacggtgctc cagtagtctt	20
	<210> 56 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 56 ccttaacggt gctccagtag	20
20	<210> 57 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
25	<400> 57 gaactgtcc ttaacggtgc	20
	<210> 58 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 58 ctcagagaac ttgtccttaa	20
35	<210> 59 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 59 agaactcaga gaactgtcc	20
45	<210> 60 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 60 atcccagaac tcagagaact	20

<210> 61  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 61  
 caggtccaa atcccagaac 20

10

<210> 62  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido

15

<400> 62  
 ttggtctgac ctcaggtcc 20

20

<210> 63  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 63  
 gttggtctga cctcaggtc 20

25

<210> 64  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 64  
 gctgaagtg gtctgacctc 20

35

<210> 65  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido

40

<400> 65  
 cagccacggc tgaagttgt 20

<210> 66  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 66  
 caggcagcca cggtgaagt 20

50

<210> 67  
 <211> 20  
 <212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
5	<400> 67 attgaggtct caggcagcca	20
	<210> 68	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 68 tggataggca ggtggactg	20
	<210> 69	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
20	<400> 69 ctcgcaggat ggataggcag	20
	<210> 70	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 70 aggagctcgc aggatggata	20
30	<210> 71	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 71 gaccaagga gctcgcagga	20
	<210> 72	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
45	<400> 72 tgcaggaccc aaggagctcg	20
	<210> 73	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 73	
	tggagattgc aggaccaag	20
5	<210> 74	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
10	<400> 74	
	agccctggag attgcaggac	20
	<210> 75	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 75	
	ggcagccctg gagattgcag	20
20	<210> 76	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 76	
	cctttaagc aacctacagg	20
	<210> 77	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 77	
35	ctgtcccttt taagcaacct	20
	<210> 78	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 78	
	agaatactgt ccctttaag	20
	<210> 79	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 79	

	cactgagaat actgtccctt	20
	<210> 80	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 80	
10	taggagagca ctgagaatac	20
	<210> 81	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 81	
	gggtaggaga gcactgagaa	20
	<210> 82	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 82	
25	aggccagcat gcctggaggg	20
	<210> 83	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 83	
	ttgggaggcc agcatgcctg	20
	<210> 84	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 84	
40	agctttattg ggaggccagc	20
	<210> 85	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 85	
	tgtccagctt tattgggagg	20
50	<210> 86	

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 86	
	ctgtccagc ttattggga	20
10	<210> 87	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
15	<400> 87	
	agcttctgt ccagcttat	20
20	<210> 88	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 88	
	catagcagct tctgtccag	20
25	<210> 89	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
30	<400> 89	
	acctggagca gctgcctcta	20
35	<210> 90	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 90	
	agggcattac ctggagcagc	20
40	<210> 91	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 91	
	acctctgttc ctgcaaggaa	20
50	<210> 92	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	



	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 92 aagtgcttac gggcagaggc	20
5	<210> 93 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
10	<400> 93 gcgggtgtac ctggcctgct	20
	<210> 94 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 94 aaccctgttg tgaactgcac	20
20	<210> 95 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 95 agtgagcaat accgcctgag	20
30	<210> 96 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
35	<400> 96 cgggctgaa ttaggtcagg	20
	<210> 97 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 97 tagggataaaa actgagcagg	20
45	<210> 98 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
50	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	

	<400> 98 ctggagtagc tagctgctc	20
5	<210> 99 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
10	<400> 99 gctgcatggc acctacgtac	20
	<210> 100 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 100 ccacagtgag gagcgtccgg	20
20	<210> 101 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
25	<400> 101 ggcagatgcc aggagagcca	20
	<210> 102 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 102 ctaccttc agctcgggca	20
35	<210> 103 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 103 cagcagcaag gatccctcta	20
45	<210> 104 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 104 gcacagagcc cagcagcaag	20

	<210> 105	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 105	
	ccctggccac cgcagctata	20
10	<210> 106	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
15	<400> 106	
	atctgaagtg attgtccatc	20
20	<210> 107	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 107	
	agtagccttt caggaatctg	20
25	<210> 108	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 108	
	ctgtcagta aactgtctcc	20
35	<210> 109	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
40	<400> 109	
	gaagccggtg aactgtcag	20
45	<210> 110	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 110	
	gaatcccaga agccggtgaa	20
50	<210> 111	
	<211> 20	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
5	<400> 111 ggttagaatc ccagaagccg	20
	<210> 112	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 112 tggagtgggt tggcctcag	20
	<210> 113	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
20	<400> 113 tcacgactca atagctggag	20
	<210> 114	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 114 cccttaaagc aaccttcagg	20
30	<210> 115	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 115 agacatgaga acatacttc	20
	<210> 116	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
45	<400> 116 catggttagg tgaatctag	20
	<210> 117	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	

ES 2 373 101 T3

	<400> 117 tcttatccag ctttattagg	20
5	<210> 118 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
10	<400> 118 ccuagaggca gcugcuccag	20
	<210> 119 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
15	<400> 119 cuucucagcu ucaugcaggg	20
20	<210> 120 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
25	<400> 120 ugcaggguaa caugaagcac	20
	<210> 121 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
30	<400> 121 ccagguggcc cagcaggcca	20
35	<210> 122 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
40	<400> 122 ccugaaagac uacuggagca	20
	<210> 123 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
45	<400> 123 ugcucaguuc aucccuagag	20
	<210> 124 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	

ES 2 373 101 T3

	<400> 124 agaggcagcu gcuccagga	20
5	<210> 125 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
10	<400> 125 gcugcuccag gaacagaggu	20
	<210> 126 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
15	<400> 126 uccaggaaca gaggugccau	20
20	<210> 127 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
25	<400> 127 acagaggugc caugcagccc	20
	<210> 128 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
30	<400> 128 ggguacuccu uguuguugcc	20
35	<210> 129 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
40	<400> 129 acuccuuguu guugcccucc	20
	<210> 130 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
45	<400> 130 uccuggccuc ugcccagcu	20
	<210> 131 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	

# ES 2 373 101 T3

	<400> 131 gccucugccc gagcuucaga	20
5	<210> 132 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
10	<400> 132 agcuucagag gccgaggaug	20
	<210> 133 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
15	<400> 133 agaggccgag gaugccuccc	20
20	<210> 134 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
25	<400> 134 ccgaggaugc cucccuucuc	20
	<210> 135 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
30	<400> 135 aggauccuc ccuucucagc	20
35	<210> 136 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
	<400> 136 ucccuuca gcuucaugca	20
40	<210> 137 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
45	<400> 137 caggguuaca ugaagcacgc	20
	<210> 138 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	

# ES 2 373 101 T3

	<400> 138 uacaugaagc acgccaccaa	20
5	<210> 139 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
10	<400> 139 accaagaccg ccaaggaugc	20
	<210> 140 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
15	<400> 140 accgccaagg augcacugag	20
20	<210> 141 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
	<400> 141 cgccaaggau gcacugagca	20
25	<210> 142 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
30	<400> 142 cacugagcag cgugcaggag	20
	<210> 143 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens <220>	
35	<400> 143 cugagcagcg ugcaggaguc	20
40	<210> 144 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
	<400> 144 gugcaggagu cccagguggc	20
45	<210> 145 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
50	<400> 145 uggcccagca ggcaggggc	20



<210> 146  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 5 <220>  
 <400> 146  
 ggcccagcag gccaggggcu 20  
 <210> 147  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <220>  
 <400> 147  
 gcugggugac cgauggcuuc 20  
 15 <210> 148  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <220>  
 20 <400> 148  
 ugggugaccg auggcuucag 20  
 <210> 149  
 <211> 20  
 25 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <220>  
 <400> 149  
 auggcuucag uucccugaaa 20  
 30 <210> 150  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <220>  
 35 <400> 150  
 aagacuacug gagcaccguu 20  
 <210> 151  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 40 <220>  
 <400> 151  
 cuacuggagc accguuaagg 20  
 <210> 152  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <220>  
 <400> 152  
 gcaccguuaa ggacaaguuc 20

ES 2 373 101 T3

	<210> 153 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
5	<220>  <400> 153 uuaaggacaa guucucugag	20
10	<210> 154 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>  <400> 154 ggacaaguuc ucugaguucu	20
15	<210> 155 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<220> <400> 155 guucugggau uuggaccug	20
25	<210> 156 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>  <400> 156 ggaccugag gucagaccaa	20
30	<210> 157 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>  <400> 157 gaccugagg ucagaccaac	20
35	<210> 158 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>	
40	<400> 158 gaggucagac caacuucagc	20
45	<210> 159 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <220>  <400> 159 accaacuca gccguggcug	20
50	<210> 160 <211> 20	

ES 2 373 101 T3

	<212> ADN <213> H. sapiens	
	<220>	
5	<400> 160 acuucagccg uggcugccug	20
	<210> 161 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<220>	
	<400> 161 uggcugccug agaccucaau	20
	<210> 162 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
15	<220>	
	<400> 162 caaguccacc ugccuaucca	20
20	<210> 163 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<220>	
25	<400> 163 cugccuaucc auccugcgag	20
	<210> 164 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
30	<220>	
	<400> 164 uauccauccu gcgaguccu	20
35	<210> 165 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<220>	
40	<400> 165 uccugcgagc uccuuggguc	20
	<210> 166 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
45	<220>	
	<400> 166 cgagcuccuu ggguccugca	20
	<210> 167 <211> 20	

ES 2 373 101 T3

	<212> ADN <213> H. sapiens	
	<220>	
5	<400> 167 cuuggguccu gcaaucucca	20
	<210> 168 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<220>	
	<400> 168 guccugcaau cuccagggcu	20
	<210> 169 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
15	<220>	
	<400> 169 cugcaaucuc cagggcugcc	20
20	<210> 170 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<220>	
25	<400> 170 ccuguagguu gcuuaaaagg	20
	<210> 171 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
30	<220>	
	<400> 171 agguugcuua aaaggacag	20
	<210> 172 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
35	<220>	
	<400> 172 cuuaaaaggg acaguauucu	20
	<210> 173 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
40	<220>	
	<400> 173 aaggacagu auucucagug	20
45	<210> 174 <211> 20	

ES 2 373 101 T3

<212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <220>  
 5 <400> 174  
 guauucucag ugcucuccua 20  
 <210> 175  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 10 <220>  
 <400> 175  
 uucucagugc ucuccuaccc 20  
 <210> 176  
 <211> 20  
 15 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <220>  
 <400> 176  
 cccuccaggc augcuggccu 20  
 20 <210> 177  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <220>  
 25 <400> 177  
 caggcaugcu ggccucccaa 20  
 <210> 178  
 <211> 20  
 30 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <220>  
 <400> 178  
 gcuggccucc caauaaagcu 20  
 35 <210> 179  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <220>  
 40 <400> 179  
 ccucccauaa aagcuggaca 20  
 <210> 180  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 45 <220>  
 <400> 180  
 uccaauaaa gcuggacaag 20  
 <210> 181  
 <211> 20

# ES 2 373 101 T3

	<212> ADN <213> H. sapiens	
	<220>	
5	<400> 181 auaaagcugg acaagaagcu	20
	<210> 182 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<220>	
	<400> 182 cuggacaaga agcugcuau	20
	<210> 183 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
15	<220>	
	<400> 183 uagaggcagc ugcuccaggu	20
20	<210> 184 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<220>	
25	<400> 184 gcugcuccag gaaugcccu	20
	<210> 185 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
30	<220>	
	<400> 185 uuccuugcag gaacagaggu	20
35	<210> 186 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<220>	
40	<400> 186 gccucugccc guaagcacuu	20
	<210> 187 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
45	<220>	
	<400> 187 agcaggccag guacaccgc	20
	<210> 188 <211> 20	

	<212> ADN <213> H. sapiens	
	<220>	
5	<400> 188 gugcaguuca caacaggguu	20
	<210> 189 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<220>	
	<400> 189 cucaggcggu auugcucacu	20
	<210> 190 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
15	<220>	
	<400> 190 ccugaccuaa uucaagcccg	20
20	<210> 191 <211> 20 <212> ADN <213> M. musculus	
	<220>	
25	<400> 191 ccugcucagu uuuauccua	20
	<210> 192 <211> 20 <212> ADN <213> M. musculus	
30	<220>	
	<400> 192 guacguaggu gccaugcagc	20
35	<210> 193 <211> 20 <212> ADN <213> M. musculus	
	<220>	
40	<400> 193 ccggacgcuc cucacugugg	20
	<210> 194 <211> 20 <212> ADN <213> M. musculus	
45	<220>	
	<400> 194 uggcucuccu ggcaucugcc	20
	<210> 195 <211> 20	

# ES 2 373 101 T3

	<212> ADN <213> M. musculus	
	<220>	
5	<400> 195 ugcccgagcu gaagagguag	20
	<210> 196 <211> 20 <212> ADN <213> M. musculus	
10	<220>	
	<400> 196 uagagggauc cuugcugcug	20
	<210> 197 <211> 20 <212> ADN <213> M. musculus	
15	<220>	
	<400> 197 cuugcugcug ggcucugugc	20
20	<210> 198 <211> 20 <212> ADN <213> M. musculus	
	<220>	
25	<400> 198 uauagcugcg guggccaggg	20
	<210> 199 <211> 20 <212> ADN <213> M. musculus	
30	<220>	
	<400> 199 cagauuccug aaagguacu	20
35	<210> 200 <211> 20 <212> ADN <213> M. musculus	
	<220>	
40	<400> 200 ggagcaaguu uacugacaag	20
	<210> 201 <211> 20 <212> ADN <213> M. musculus	
45	<220>	
	<400> 201 cugacaaguu caccggcuuc	20
	<210> 202 <211> 20 <212> ADN	
50		



ES 2 373 101 T3

	<213> M. musculus	
	<220>	
	<400> 202	
	cggc <u>uucugg</u> gauucuaacc	20
5	<210> 203	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> M. musculus	
	<220>	
10	<400> 203	
	cugaggacca accaacucca	20
	<210> 204	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> M. musculus	
	<220>	
	<400> 204	
	cuccagcuau ugagucguga	20
	<210> 205	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> M. musculus	
	<220>	
	<400> 205	
25	ccugaagguu gcuuuagg	20
	<210> 206	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> M. musculus	
30	<220>	
	<400> 206	
	gaaaguaugu ucuaugucu	20
	<210> 207	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> M. musculus	
	<220>	
	<400> 207	
	cuagaucuca ccuaaacaug	20
40	<210> 208	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> M. musculus	
	<220>	
45	<400> 208	
	ccuaauaaag cuggauaaga	20
	<210> 209	
	<211> 20	
	<212> ADN	

ES 2 373 101 T3

	<213> H. sapiens	
	<220>	
	<400> 209	
	gcugcauggc accucuguuc	20
5	<210> 210	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<220>	
10	<400> 210	
	ggcagaggc caggagcgcca	20
	<210> 211	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> H. sapiens	
	<220>	
	<400> 211	
	cugaagcucg ggcagaggcc	20
	<210> 212	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<220>	
	<400> 212	
25	uccucggccu cugaagcucg	20
	<210> 213	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
30	<220>	
	<400> 213	
	ucuugguggc gugcucaug	20
	<210> 214	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<220>	
	<400> 214	
	gcucagugca uccuuggcgg	20
40	<210> 215	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<220>	
45	<400> 215	
	ccugcacgcu gcucagugca	20
	<210> 216	
	<211> 20	
	<212> ADN	

ES 2 373 101 T3

	<213> H. sapiens	
	<220>	
	<400> 216	
	acugaagcca ucggucaccc	20
5	<210> 217	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<220>	
10	<400> 217	
	cagaacucag agaacuuguc	20
	<210> 218	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<220>	
	<400> 218	
	gaaguugguc ugaccucagg	20
	<210> 219	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<220>	
25	<400> 219	
	cccuggagau ugcaggaccc	20
	<210> 220	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
30	<220>	
	<400> 220	
	gggcagcccu ggagauugca	20
	<210> 221	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<220>	
	<400> 221	
	ccuuuuuaa gcaaccuacag	20
40	<210> 222	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 222	
	ctcttactgt gctgtggaca	20
	<210> 223	
	<211> 479	

ES 2 373 101 T3

<212> ADN  
 <213> M. fascicularis  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> 53, 63  
 <223> n = A,T,C or G  
  
 <400> 223  
  
 ttcattcccta gaggcagctg ctccaggaac agaggogcca tgcagccccg ggntactcct 60  
 tgnttgctgc cctgctgtca ctctggcct ctgccagtag cttcagaggc cgaggacacc 120  
 tcccttcttg gcattcatgc agggctacat gcagcatgcc accaagaccg ccaaggatgc 180  
 actgaccagc gtccaggagt cccaggtggc ccagcaggcc agaggctggg tgaccgatgg 240  
 cttcagttcc ctgaaagact actggagcac cgtaaaggac aagttatctg ggttctggga 300  
 tttgaaccct gaggccaaac ccactctggc tgaggctgcc tgagacctca atacccaag 360  
 tccacctgcc tgtccatcct gccagctcct tgggtcctgc agcctccagg gctgcccctg 420  
 taggttgctt aaaagggaca gtattctcag tgcctccta ccgcacctca tgctggcct 479  
  
 <210> 224  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Compuesto antisentido  
  
 15 <400> 224  
 ggcagccctg gaggctgcag 20  
  
 <210> 225  
 <211> 427  
 20 <212> ADN  
 <213> R. norvegicus  
  
 <400> 225  
  
 aagctcctca tegtggcct cgtggctctc ctggcctctg cccgagctga tgagggagag 60  
 ggatccttgc tgctgggctc tatgcagggc tacatggaac aagcctccaa gacggtccag 120  
 gatgcactaa gcagcatgca ggagtctgat atagctgtgg tggccagggg ctggatggac 180  
  
 aatcgcttca aatccctgaa aggctactgg agcaagttca ctgataagtt cactggcctc 240  
 tgggagtctg gccctgagga ccaactaaca acaccaactc ttgagccgtg agacctccat 300  
 gttccagatg tgtctggcca tctatcctgc tgctccgaa ggttgctcta aggggaaagt 360  
 atattctcat gcctttatcc ctccccagac ctcacctaaa catgctgtcc caaataaaag 420  
 ctgggaa 427  
  
 <210> 226  
 <211> 306  
 25 <212> ADN  
 <213> R. norvegicus

# ES 2 373 101 T3

<400> 226

```

atgcagcccc gaatgctcct catcgtggcc ctcgtggctc tcttggcctc tgcccagact 60
gatgaggagg agggatcctt gctgctgggc tctatgcagg gctacatgga acaagcctcc 120
aagacgggcc aggatgcaact aagcagcatg caggagtctg atatagctgt ggtggccagc 180
aggggctgga tggacaatcg cttcaaatac ctgaaaggct actggagcaa gttcactgat 240
aagttcactg gcctctggga gtctggcctt gaggaccaac taacaacacc aactcttgag 300.
ccgtga 306

```

<210> 227

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 227

10 gagggagagg gatccttgct 20

<210> 228

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 228

ggaccgtctt ggaggctg 19

<210> 229

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> PCR probe

<400> 229

ctgggctcta tgcagggcta catgga 26

<210> 230

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 230

tgtctagag acagccgcat ctt 23

<210> 231

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 231

caccgacctt caccatctg t 21

40

	<210> 232	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> PCR probe	
	<400> 232	
	ttgtgcagtg ccagcctcgt ctca	24
10	<210> 233	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
15	<400> 233	
	tgaactatc agtgaactg	20
	<210> 234	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 234	
	tcagggccag actcccagag	20
25	<210> 235	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 235	
	ttggtgtgt tagttgtcc	20
	<210> 236	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 236	
40	ttggtgtgt tagttgtcc	20
	<210> 237	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 237	
	agagccacga gggccacgat	20
50	<210> 238	
	<211> 20	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
5	<400> 238 agaggccagg agagccacga	20
	<210> 239	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 239 cagctcgggc agaggccagg	20
	<210> 240	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
20	<400> 240 tctccctcat cagctcgggc	20
	<210> 241	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 241 gcccagcagc aaggatccct	20
30	<210> 242	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 242 cctgcataga gcccagcagc	20
	<210> 243	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
45	<400> 243 tccatgtagc cctgcataga	20
	<210> 244	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 244	
	ggaccgtctt ggaggctgt	20
5	<210> 245 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
10	<400> 245	
	agtgcacctt ggaccgtctt	20
	<210> 246 <211> 20 <212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 246	
	catgctgctt agtgcacctt	20
20	<210> 247 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 247	
	cagactcctg catgctgctt	20
	<210> 248 <211> 20 <212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 248	
35	acagctatat cagactcctg	20
	<210> 249 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 249	
	ctggccacca cagctatatc	20
45	<210> 250 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
50	<400> 250	



ES 2 373 101 T3

	aagcgattgt ccatccagcc	20
	<210> 251	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 251	
10	tgctccagta gccttcagg	20
	<210> 252	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 252	
	gaactgctc cagtagcctt	20
	<210> 253	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 253	
25	cagtgaact gctccagtag	20
	<210> 254	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 254	
	cttatcagtg aacttgctcc	20
	<210> 255	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
40	<400> 255	
	ccagtgaact tatcagtgaa	20
	<210> 256	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 256	
	gaggccagtg aacttatcag	20
50	<210> 257	

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 257	
	ccagaggcca gtgaacttat	20
10	<210> 258	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
15	<400> 258	
	gactcccaga ggccagtgaa	20
	<210> 259	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 259	
	ggccagactc ccagaggcca	20
25	<210> 260	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
30	<400> 260	
	agttggtcct caggccaga	20
	<210> 261	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 261	
	gttagttggt cctcagggcc	20
40	<210> 262	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 262	
	tgttgtagt tggcctcag	20
50	<210> 263	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 263	
	agagttggtg ttgtagtg	20
5	<210> 264	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 264	
	gctcaagagt tgggtgtt	20
	<210> 265	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 265	
20	cacggctcaa gagtgggtg	20
	<210> 266	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 266	
	gtctcacggc tcaagagtg	20
	<210> 267	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 267	
35	gaacatggag gtctcacggc	20
	<210> 268	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 268	
	tctggaacat ggaggtctca	20
45	<210> 269	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Compuesto antisentido	

	<400> 269 cacatctgga acatggaggt	20
5	<210> 270 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Compuesto antisentido	
10	<400> 270 cagacacatc tggaacatgg	20
	<210> 271 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Compuesto antisentido	
	<400> 271 tgccagaca catctggaac	20
20	<210> 272 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Compuesto antisentido	
25	<400> 272 aggatagatg gccagacaca	20
	<210> 273 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Compuesto antisentido	
	<400> 273 cagcaggata gatggccaga	20
35	<210> 274 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Compuesto antisentido	
40	<400> 274 gaggcagcag gatagatggc	20
	<210> 275 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Compuesto antisentido	
	<400> 275 ttcggaggca gcaggataga	20
50		

	<210> 276	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 276	
	aaccttcgga ggcagcagga	20
10	<210> 277	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
15	<400> 277	
	gagcaacctt cggaggcagc	20
	<210> 278	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 278	
	cttagagcaa ccttcggagg	20
25	<210> 279	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 279	
	tccccttaga gcaaccttcg	20
	<210> 280	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 280	
40	actttcccct tagagcaacc	20
	<210> 281	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 281	
	atatacttc cccttagagc	20
50	<210> 282	
	<211> 20	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
5	<400> 282 gagaatatac ttcccctta	20
	<210> 283	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 283 gcatgagaat atacttccc	20
	<210> 284	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
20	<400> 284 aaaggcatga gaataactt	20
	<210> 285	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 285 ggataaaggc atgagaatat	20
30	<210> 286	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 286 ggagggataa aggcattgaga	20
	<210> 287	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
45	<400> 287 gcatgttttag gtaggtctg	20
	<210> 288	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 288	
	gacagcatgt ttaggtgagg	20
5	<210> 289	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
10	<400> 289	
	ttatttgga cagcatgtt	20
	<210> 290	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 290	
	gcttttattt gggacagcat	20
20	<210> 291	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 291	
	tcccagcttt tatttgggac	20
	<210> 292	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 292	
35	cacgatgagg agcattcggg	20
	<210> 293	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 293	
	agggccacga tgaggagcat	20
	<210> 294	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
50	<400> 294	

ES 2 373 101 T3

	ccacgagggc cacgatgagg	20
	<210> 295	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 295	
	gagagccacg agggccacga	20
10	<210> 296	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 296	
	gccaggagag ccacgagggc	20
	<210> 297	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 297	
25	cagaggccag gagagccacg	20
	<210> 298	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 298	
	tcgggcagag gccaggagag	20
	<210> 299	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
40	<400> 299	
	tcagctcggg cagaggccag	20
	<210> 300	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 300	
	cctcatcagc tcgggcagag	20
50	<210> 301	



	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 301	
	ctctccctca tcagctcggg	20
10	<210> 302	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
15	<400> 302	
	gatccctctc cctcatcagc	20
	<210> 303	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 303	
	gcaaggatcc ctctccctca	20
25	<210> 304	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
30	<400> 304	
	cagcagcaag gatccctctc	20
	<210> 305	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 305	
	gagcccagca gcaaggatcc	20
40	<210> 306	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 306	
	gcatagagcc cagcagcaag	20
50	<210> 307	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 307	
	gccctgcata gagcccagca	20
5	<210> 308	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 308	
	atgtagccct gcatagagcc	20
	<210> 309	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 309	
20	gttccatgta gccctgcata	20
	<210> 310	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 310	
	ggcttgtcc atgtagccct	20
	<210> 311	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 311	
35	tggaggctt gttccatgta	20
	<210> 312	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 312	
	ccgtcttga ggcttgtcc	20
45	<210> 313	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Compuesto antisentido	

ES 2 373 101 T3

	<400> 313 ctggaccgtc ttggaggctt	20
5	<210> 314 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Compuesto antisentido	
10	<400> 314 gcatcctgga cgtcttga	20
	<210> 315 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Compuesto antisentido	
	<400> 315 ttagtgcac ctggaccgtc	20
20	<210> 316 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Compuesto antisentido	
25	<400> 316 gctgcttagt gcatcctgga	20
	<210> 317 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Compuesto antisentido	
	<400> 317 tgcacgctgc ttagtgcac	20
35	<210> 318 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Compuesto antisentido	
	<400> 318 actcctgcat gctgcttagt	20
45	<210> 319 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Compuesto antisentido	
50	<400> 319 atcagactcc tgcatgctgc	20

	<210> 320	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 320	
	gctatatcag actcctgcat	20
10	<210> 321	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
15	<400> 321	
	ccacagctat atcagactcc	20
	<210> 322	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 322	
	ggccaccaca gctatatcag	20
25	<210> 323	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 323	
	ctgctggcca ccacagctat	20
	<210> 324	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 324	
40	agcccctgct ggccaccaca	20
	<210> 325	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 325	
	catccagccc ctgctggcca	20
50	<210> 326	
	<211> 20	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
5	<400> 326 ttgtccatcc agcccctgct	20
	<210> 327	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 327 attgtccatc cagcccctgc	20
	<210> 328	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
20	<400> 328 agcgattgct catccagccc	20
	<210> 329	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 329 tttgaagcga ttgtccatcc	20
30	<210> 330	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 330 agggattga agcgattgct	20
	<210> 331	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
45	<400> 331 cttcagggga tttgaagcga	20
	<210> 332	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 332	
	gtagccttc agggattga	20
5	<210> 333 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
10	<400> 333	
	ctccagtagc ctttcagga	20
	<210> 334 <211> 20 <212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 334	
	acttgctcca gtagccttc	20
20	<210> 335 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 335	
	agtgaactg ctccagtagc	20
	<210> 336 <211> 20 <212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 336	
35	ttatcagtga acttgctcca	20
	<210> 337 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 337	
	gccagtgaac ttatcagtga	20
45	<210> 338 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
50	<400> 338	

ES 2 373 101 T3

	cagaggccag tgaacttat	20
	<210> 339	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 339	
10	actcccagag gccagtgaac	20
	<210> 340	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 340	
	gccagactcc cagaggccag	20
	<210> 341	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 341	
25	tagttgtcc tcagggccag	20
	<210> 342	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 342	
	gttgtagtt ggtcctcagg	20
35	<210> 343	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
40	<400> 343	
	aagagttggt gttgtagtt	20
	<210> 344	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 344	
	ggctcaagag ttggtgtgt	20
50	<210> 345	

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 345	
	tcacggctca agagttggtg	20
10	<210> 346	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
15	<400> 346	
	ggaggctgt tccatgtagc	20
20	<210> 347	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 347	
	tcagggattt gaagcgattg	20
25	<210> 348	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
30	<400> 348	
	cagtagcctt tcagggattt	20
35	<210> 349	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 349	
	atggaggctc cacggctcaa	20
40	<210> 350	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 350	
	tagatggcca gacacatctg	20
50	<210> 351	
	<211> 20 -	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	



ES 2 373 101 T3

<220>  
 <223> Compuesto antisentido

<400> 351  
 ttgggacagc atgttaggt 20

5 <210> 352  
 <211> 435  
 <212> ADN  
 <213> M. auratus

<400> 352

actcctattg ttgccctctt ggcactcctg gcatctgccc gaagctaattg aggttagaggg 60  
 gtccttgctg ctgggctctg tgcagggcta catggaacag gccaccaaga aggtccagga 120  
 tgcgctaacc agcatgcaaa agtctgaggt ggctgtgctg gccagggact ggatggacgg 180  
 tggcttcacc tccctgaaaa gctactggag cacatttact gacacggctt ccagcctctg 240  
 ggattcttcc cccaaggccc taccagcccc agctactgag ccttgagacc tctacgttcc 300  
 aaatgtgctt gtgtgtccat cctgctggcc tctgggcctg ggtggcccct gaaggttgtt 360  
 tgaaagggaa agtattgtca tgttttcatc cctccccaga agtcacctaa acatgctgtc 420  
 ctaaataaag ctgga 435

10

<210> 353  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Cebador de PCR

<400> 353  
 cgctaaccag catgcaaaag 20

20 <210> 354  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador de PCR

25 <400> 354  
 caccgtccat ccagtccc 18

<210> 355  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> PCR probe

<400> 355  
 ctgaggtggc tgtcgggcc 20

35 <210> 356  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 356 ccagcctcgc tccgg	15
5	<210> 357 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 357 ccaatacggc caaatccg	18
15	<210> 358 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> PCR probe	
20	<400> 358 acgcaatggt gaaggtcggc g	21
	<210> 359 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Compuesto antisentido	
	<400> 359 tgccaagagg gcaacaatag	20
30	<210> 360 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Compuesto antisentido	
35	<400> 360 aggagtgccca agagggaac	20
	<210> 361 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Compuesto antisentido	
	<400> 361 gatgccagga gtgccaagag	20
45	<210> 362 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Compuesto antisentido	
50	<220> <223> Compuesto antisentido	

# ES 2 373 101 T3

	<400> 362 ggcagatgcc aggagtgcca	20
5	<210> 363 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Compuesto antisentido	
10	<400> 363 ctctaccta ttagctcgg	20
	<210> 364 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Compuesto antisentido	
	<400> 364 ccctctacct cattagcttc	20
20	<210> 365 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Compuesto antisentido	
25	<400> 365 gacccctcta cctcattagc	20
	<210> 366 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Compuesto antisentido	
	<400> 366 gcaaggaccc ctctaccta	20
35	<210> 367 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Compuesto antisentido	
40	<400> 367 cagcagcaag gacccctcta	20
	<210> 368 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Compuesto antisentido	
	<400> 368 gagcccagca gcaaggaccc	20
50		

ES 2 373 101 T3

	<210> 369	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 369	
	tgcacagagc ccagcagcaa	20
10	<210> 370	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
15	<400> 370	
	agccctgcac agagcccagc	20
	<210> 371	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 371	
	catgtagccc tgcacagagc	20
25	<210> 372	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 372	
	tgttccatgt agccctgcac	20
	<210> 373	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 373	
40	tgccctgttc catgtagccc	20
	<210> 374	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 374	
	accttctgg tggcctgttc	20
50	<210> 375	
	<211> 20	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
5	<400> 375 gcgcatcctg gaccttcttg	20
	<210> 376	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 376 tgctggttag cgcacccctg	20
	<210> 377	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
20	<400> 377 ttgcatgctg gttagcgcac	20
	<210> 378	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 378 gacttttgca tgctggttag	20
30	<210> 379	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 379 cctcagacctt ttgcatgctg	20
	<210> 380	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
45	<400> 380 agccacctca gacttttgca	20
	<210> 381	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 381	
	cgcacagcca cctcagact	20
5	<210> 382	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
10	<400> 382	
	ccagtccctg gcccgcacag	20
	<210> 383	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 383	
	gtccatccag tccctggccc	20
20	<210> 384	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 384	
	ccgtccatcc agtccctggc	20
	<210> 385	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 385	
35	gccaccgtcc atccagtccc	20
	<210> 386	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 386	
	gtgaagccac cgtccatcca	20
	<210> 387	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
50	<400> 387	

	ggaggtgaag ccaccgtcca	20
	<210> 388	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 388	
10	tgctccagta gcttttcagg	20
	<210> 389	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 389	
	gtaaatgtgc tccagtagct	20
	<210> 390	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 390	
25	tgtcagtaaa tggctccag	20
	<210> 391	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 391	
	tgagaccgt gtcagtaaat	20
	<210> 392	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
40	<400> 392	
	ggctggagac cgtgtcagta	20
	<210> 393	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 393	
	cagaggctgg agaccgtgc	20
50	<210> 394	

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 394	
	atcccagagg ctggagaccg	20
10	<210> 395	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
15	<400> 395	
	gaagaatccc agaggctgga	20
	<210> 396	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 396	
	tctcaaggct cagtagctgg	20
25	<210> 397	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
30	<400> 397	
	tagaggcttc aaggctcagt	20
	<210> 398	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 398	
	gaacgtagag gtctcaaggc	20
40	<210> 399	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial Sequence	
45	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 399	
	catttgaac gtagaggctc	20
50	<210> 400	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	



	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 400	
	caagcacatt tgaacgtag	20
5	<210> 401	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 401	
	tggacacaca agcacattg	20
	<210> 402	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 402	
20	caggatggac acacaagcac	20
	<210> 403	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 403	
	ggccagcagg atggacacac	20
	<210> 404	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
35	<400> 404	
	gcccagaggc cagcaggatg	20
	<210> 405	
	<211> 20	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 405	
	ccttcaaac aaccttcagg	20
45	<210> 406	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 406	

	ggacagcatg ttaggtgac	20
	<210> 407	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 407	
	ctggtggcc tgtccatgt	20
10	<210> 408	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 408	
	gtagcgcac cctggacctt	20
	<210> 409	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 409	
25	tggcccgcac agccaccta	20
	<210> 410	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 410	
	gaccgtgtca gtaaagtgc	20
	<210> 411	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
40	<400> 411	
	aagagggcaa caataggagt	20
	<210> 412	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 412	
	gtgccaagag ggcaacaata	20
50	<210> 413	

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 413	
	atgccaggag tgccaagagg	20
10	<210> 414	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
15	<400> 414	
	cttcgggcag atgccaggag	20
	<210> 415	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 415	
	cattagcttc gggcagatgc	20
25	<210> 416	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
30	<400> 416	
	agagcccagc agcaaggacc	20
	<210> 417	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 417	
	gtggcctgtt ccatgtagcc	20
40	<210> 418	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 418	
	tcttgggtggc ctgttccatg	20
	<210> 419	
	<211> 20	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Compuesto antisentido	
	<400> 419 gacctcttg gtgcctgtt	20
5	<210> 420 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Compuesto antisentido	
10	<400> 420 tcctggacct tcttggtggc	20
	<210> 421 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Compuesto antisentido	
	<400> 421 ggttagcgca tctggacct	20
20	<210> 422 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Compuesto antisentido	
25	<400> 422 atgctggta gcgcatcctg	20
	<210> 423 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Compuesto antisentido	
	<400> 423 ttgcatgct ggttagcgca	20
35	<210> 424 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Compuesto antisentido	
40	<400> 424 agactttgc atgctggta	20
	<210> 425 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Compuesto antisentido	
	<400> 424 agactttgc atgctggta	20
50	<210> 425 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Compuesto antisentido	

	<400> 425 acctcagact ttgcatgct	20
5	<210> 426 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Compuesto antisentido	
10	<400> 426 cagccacctc agactttgct	20
15	<210> 427 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Compuesto antisentido	
20	<400> 427 20 ccgcacagcc acctcagact	20
25	<210> 428 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Compuesto antisentido	
30	<400> 428 20 ctggcccgca cagccacctc	20
35	<210> 429 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Compuesto antisentido	
40	<400> 429 20 agtccctggc ccgcacagcc	20
45	<210> 430 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Compuesto antisentido	
50	<400> 430 20 catccagtcc ctggcccgca	20
	<210> 431 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Compuesto antisentido	
	<400> 431 20 agccaccgtc catccagtcc	20

<210> 432  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Compuesto antisentido  
 <400> 432  
 ggtgaagcca ccgccatcc 20  
 10 <210> 433  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Compuesto antisentido  
 15 <400> 433  
 agggaggtga agccaccgtc 20  
 <210> 434  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Compuesto antisentido  
 <400> 434  
 ttttcagga ggtgaagcca 20  
 25 <210> 435  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Compuesto antisentido  
 <400> 435  
 agtagcttt caggaggtg 20  
 <210> 436  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Compuesto antisentido  
 <400> 436  
 40 aaatgtgctc cagtagctt 20  
 <210> 437  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Compuesto antisentido  
 <400> 437  
 tcagtaaatg tgctccagta 20  
 <210> 438  
 50 <211> 20  
 <212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
5	<400> 438 ccgtgtcagt aaatgtgctc	20
	<210> 439	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 439 ggagaccgtg tcagtaaag	20
	<210> 440	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
20	<400> 440 aggctggaga ccgtgtcagt	20
	<210> 441	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 441 cccagaggct ggagaccgtg	20
30	<210> 442	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 442 agaatcccag aggctggaga	20
	<210> 443	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
45	<400> 443 agaggtctca aggctcagta	20
	<210> 444	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 444	
	aacgtagagg tctcaaggct	20
5	<210> 445	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
10	<400> 445	
	tttgaacgt agaggctca	20
	<210> 446	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 446	
	gcacattgg aacgtagagg	20
20	<210> 447	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 447	
	cacaagcaca tttggaacgt	20
	<210> 448	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 448	
35	ggacacaca gcacattgg	20
	<210> 449	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 449	
	aggatggaca cacaagcaca	20
	<210> 450	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
50	<400> 450	



ES 2 373 101 T3

	ccagcaggat ggacacacaa	20
	<210> 451	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 451	
	agaggccagc aggatggaca	20
10	<210> 452	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 452	
	ggcccagagg ccagcaggat	20
	<210> 453	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 453	
25	accaggccc agaggccagc	20
	<210> 454	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 454	
	gggccaccca ggcccagagg	20
	<210> 455	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
40	<400> 455	
	ctttccctt caaacacct	20
	<210> 456	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 456	
	caatacttc ctttcaaac	20
50	<210> 457	

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 457	
	catgacaata cttccctt	20
10	<210> 458	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
15	<400> 458	
	gaaaacatga caactctt	20
	<210> 459	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 459	
	gggatgaaaa catgacaata	20
25	<210> 460	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
30	<400> 460	
	catgttagg tgactctgg	20
	<210> 461	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 461	
	gacagcatgt ttagtgact	20
40	<210> 462	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 462	
	ttaggacag catgttagg	20
50	<210> 463	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 463	
	ctttatttag gacagcatgt	20
5	<210> 464	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Compuesto antisentido	
	<400> 464	
	tccagcttta ttaggacag	20
	<210> 465	
	<211> 19	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> antisense Oligonucleotide	
20	<400> 465	
	cgagaggcgg acgggaccg	19
	<210> 466	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> antisense Oligonucleotide	
	<400> 466	
	cgagaggcgg acgggaccgt t	21
	<210> 467	
30	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> complement Oligonucleotide	
35	<400> 467	
	ttgctctccg cctgccctgg c	21
	<210> 468	
	<211> 19	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> complement Oligonucleotide	
	<400> 468	
	gctctccgcc tgccctggc	19
45		

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un oligonucleótido antisentido de 20 a 30 nucleobases de longitud dirigido a una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III, en el que dicho oligonucleótido se hibrida específicamente con dicha molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III e inhibe la expresión de la apolipoproteína C-III y en el que dicho oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID N°: 69, 71, 72, 73, 75, 78, 81, 84, 85, 86, 87 y 88 y tiene una secuencia que es al menos en el 90 % complementaria a dicha molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III.
2. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1, en el que el oligonucleido tiene una secuencia que es al menos el 95 % complementaria a la molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III.
- 10 3. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1, en el que el oligonucleido tiene una secuencia que es al menos el 100 % complementaria a la molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III.
4. El oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III humana que tiene la secuencia de la SEC ID N°:4 o la SEC ID N°:18.
- 15 5. El oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho oligonucleótido es un oligonucleótido de ADN.
6. El oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho oligonucleótido es un oligonucleótido de ARN.
- 20 7. El oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que tiene al menos una unión entre nucleósidos, resto de azúcar o base nitrogenada modificada.
8. El nucleótido antisentido de la reivindicación 7, que tiene al menos un resto de azúcar 2'-O-metoxietílico.
9. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 7, que tiene al menos una unión entre nucleósidos de fosforotioato.
10. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 7, que tiene al menos una 5-metilcitosina.
- 25 11. El oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho oligonucleótido es un oligonucleótido quimérico.
12. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 11, en el que dicho oligonucleótido quimérico es de 20 nucleótidos de longitud, comprendiendo diez 2'-desoxinucleótidos flanqueados en cada lado por cinco 2'-metoxietilnucleótidos, en el que los enlaces entre nucleósidos son fosforotioato y todos los restos de citosina son 5-metilcitosinas.
- 30 13. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 12, en el que dicho oligonucleótido quimérico consta de una secuencia seleccionada de entre las SEC ID N°: 69, 71, 72, 73, 75, 78, 81, 84, 85, 86, 87 y 88.
14. Un procedimiento de inhibición de la expresión de la apolipoproteína C-III en células o tejidos *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con el oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 de tal modo que se inhiba la expresión de apolipoproteína C-III.
- 35 15. Un oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en terapia.
16. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 15 para su uso en el tratamiento de una afección metabólica anormal.
- 40 17. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 15, para su uso en el tratamiento de hipertrigliceridemia, metabolismo de lípidos anormal, metabolismo de colesterol anormal, aterosclerosis, hiperlipidemia, diabetes, obesidad, enfermedad cardiovascular o enfermedad arterial coronaria.
18. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 17, en el que dicha diabetes es diabetes de tipo 2.