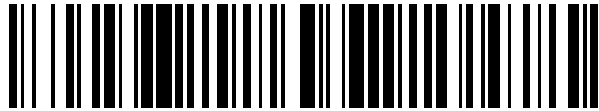


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 471 978**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/712 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2007 E 07811873 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 2015758**

54 Título: **Compuestos y procedimientos para modular la expresión de ApoB**

30 Prioridad:

05.05.2006 US 746631 P
11.05.2006 US 747059 P
23.06.2006 US 805660 P
06.11.2006 US 864554 P
27.01.2007 WO PCT/US2007/061183

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.06.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BHANOT, SANJAY;
GEARY, RICHARD S.;
MCKAY, ROBERT;
MONIA, BRETT P.;
SETH, PUNIT P.;
SIWKOWSKI, ANDREW M.;
SWAYZE, ERIC E. y
WANCEWICZ, EDWARD

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 471 978 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

Compuestos y procedimientos para modular la expresión de ApoB

ANTECEDENTES

5 La elección como diana de secuencias de genes causantes de enfermedad se sugirió por primera vez hace casi 40 años (Belikova et al., Tet. Lett., 1967, 37, 3557-3562), y la actividad antisentido se demostró en cultivo celular una década después (Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1978, 75, 280-284). Una ventaja de la tecnología antisentido en el tratamiento de una enfermedad o afección que procede de un gen causante de enfermedad es que es un enfoque genético directo que tiene la capacidad para modular la expresión de genes causantes de enfermedad específicos.

10 En general, el principio detrás de la tecnología antisentido es que un compuesto antisentido se hibrida con un ácido nucleico diana y afecta la modulación de la actividad o función de la expresión génica, tal como transcripción, traducción o corte y empalme. La modulación de la expresión génica puede lograrse, por ejemplo, por degradación de diana o inhibición basada en la ocupación. Un ejemplo de la modulación de la función diana del ARN por degradación es la degradación basada en RNasa H del ARN diana tras la hibridación con un compuesto antisentido similar a ADN. Otro ejemplo de la modulación de la expresión génica por degradación diana es ARN interferente (ARNi). El ARNi es una forma de silenciamiento de genes mediado por antisentido que implica la introducción de ARNbc que conduce a la reducción específica de secuencia de niveles de ARNm endógeno elegido como diana. La especificidad de secuencia hace que los compuestos antisentido sean extremadamente atractivos como herramientas para elegir como diana la validación y la funcionalización génica, además de herramientas de investigación para identificar y caracterizar nucleasas y como agentes terapéuticos para modular selectivamente la expresión de genes que participan en la patogénesis de una cualquiera de una variedad de enfermedades.

15 La tecnología antisentido es un medio eficaz para reducir la expresión de uno o más productos génicos específicos y, por tanto, se puede demostrar que son útiles únicamente en una serie de aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de investigación. Los nucleósidos químicamente modificados se usan rutinariamente para la incorporación en compuestos antisentido para potenciar una o más propiedades tales como resistencia a nucleasas, farmacocinética o afinidad por un ARN diana.

20 A pesar de la expansión del conocimiento desde el descubrimiento de la tecnología antisentido, queda sin satisfacer una necesidad de compuestos antisentido con mayor eficacia, toxicidad reducida y menor coste. Hasta la presente descripción no se han empleado modificaciones de alta afinidad en el diseño de compuestos antisentido cortos para reducir ARN diana in vivo. Esto es debido a asuntos referentes al grado de especificidad diana que tendría una secuencia de 15 nucleótidos o más corta cuando se empleara para reducir la diana en un sistema vivo. Estudios previos han descrito que se logra mayor especificidad y, por tanto, mayores posibilidades de potencia, por compuestos antisentido de entre 16 y 20 bases nucleotídicas de longitud.

25 El documento WO 2004/044181 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) describe compuestos antisentido, composiciones y métodos para modular la expresión de la apolipoproteína B.

30 La presente descripción describe que la incorporación de nucleótidos de alta afinidad químicamente modificados en compuestos antisentido permite que compuestos antisentido cortos de aproximadamente 8-16 bases nucleotídicas de longitud sean útiles en la reducción de ARN diana en animales con aumento de la potencia y mejora del índice terapéutico. Por tanto, se proporcionan aquí compuestos antisentido cortos que comprenden modificaciones de nucleótidos de alta afinidad útiles para reducir un ARN diana in vivo. Tales compuestos antisentido cortos son eficaces a dosis inferiores a las de los compuestos antisentido previamente descritos, permitiendo una reducción en la toxicidad y el coste del tratamiento.

SUMARIO DE LA INVENCION

35 La invención proporciona un compuesto antisentido corto de 10 a 14 monómeros de longitud, que comprende una región de salto en 2'-desoxirribonucleótido flanqueada por cada lado por un ala, en la que cada ala comprende independientemente de 1 a 3 monómeros modificados de alta afinidad que son nucleótidos modificados con azúcar que comprenden un puente entre la posición 4' y 2' del azúcar, y en el que el compuesto antisentido está dirigido a un ácido nucleico que codifica ApoB para uso en terapia.

40 La invención también proporciona un método *ex vivo* de modular la expresión de ApoB poniendo en contacto un ácido nucleico que codifica ApoB con un compuesto antisentido corto tal como se ha descrito anteriormente.

La invención también proporciona un compuesto antisentido corto tal como se ha descrito anteriormente para uso en la reducción de la expresión de ApoB ARN en un animal.

La invención también proporciona un compuesto antisentido corto tal como se ha descrito anteriormente para uso en el tratamiento de un trastorno cardiovascular en un animal.

La invención también proporciona el uso del compuesto antisentido corto tal como se ha descrito anteriormente para la preparación de un medicamento para la reducción de la expresión de ApoB ARN en un animal.

5 La invención también proporciona el uso del compuesto antisentido corto tal como se ha descrito anteriormente para la preparación de un medicamento para tratar un trastorno cardiovascular en un animal.

Otros aspectos de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

SUMARIO DE LA DESCRIPCIÓN

10 Se describen aquí compuestos antisentido cortos y métodos de uso de dichos compuestos para reducir la expresión del ARN diana en células o tejidos. En ciertas realizaciones, se describe aquí un método de reducir la expresión de una diana en un animal, que comprende administrar al animal un compuesto antisentido corto dirigido al ácido nucleico de dicha diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos son compuestos oligonucleotídicos. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido cortos tienen una longitud de alrededor de 8 a 16, preferiblemente de 9 a 15, más preferiblemente de 9 a 14, más preferiblemente de 10 a 14, y comprenden una región de salto flanqueada por cada lado por un ala, en la que cada ala consiste independientemente de 1 a 3 nucleótidos. Entre los motivos preferidos se incluyen, pero no se limitan a, motivos ala-salto desoxi-ala seleccionados de 3-10-3, 2-10-3, 2-10-2, 1-10-1, 2-8-2, 1-8-1, 3-6-3 ó 1-6-1. En una realización preferida, el oligonucleótido antisentido corto comprende al menos una modificación de alta afinidad. En una realización adicional, la modificación de alta afinidad incluye nucleótidos de alta afinidad químicamente modificados. En una realización preferida, cada ala consiste independientemente de 1 a 3 nucleótidos modificados de alta afinidad. En una realidad, los nucleótidos modificados de alta afinidad son nucleótidos modificados con azúcar.

15 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos exhiben mayor captación en el intestino en comparación con los compuestos antisentido de mayor longitud. Por tanto, también se describen aquí métodos de reducir una diana en un animal, que comprenden administrar por vía oral los compuestos antisentido cortos de la presente descripción.

25 También se describen métodos de tratamiento de un trastorno metabólico en un animal, que comprenden administrar a un animal que necesite dicha terapia un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico implicado en la regulación del metabolismo o aclaramiento de la glucosa, el metabolismo de los lípidos, el metabolismo del colesterol o la señalización de la insulina.

30 También se describen métodos de incremento de la sensibilidad a la insulina, disminución de la glucosa en sangre o disminución de HbA_{1c} en un animal, que comprenden administrar a dicho animal un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico que codifica una diana implicada en la regulación del metabolismo o aclaramiento de la glucosa, el metabolismo de los lípidos, el metabolismo del colesterol o la señalización de la insulina.

35 Se describen métodos adicionales de disminución del colesterol total en suero, LDL sérica, VLDL sérica, HDL sérica, triglicéridos séricos, apolipoproteína(a) sérica o ácidos grasos libres en un animal, que comprenden administrar a dicho animal un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico que codifica una diana implicada en la regulación del metabolismo o aclaramiento de la glucosa, el metabolismo de los lípidos, el metabolismo del colesterol o la señalización de la insulina, en el que dicho compuesto antisentido corto tiene una longitud de 8 a 16 nucleótidos y comprende una región de salto flanqueada por cada lado por un ala, en la que cada ala consiste independientemente de 1 a 3 nucleótidos modificados de alta afinidad.

40 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden además un grupo conjugado. Entre los grupos conjugados se incluyen, C₁₆ y colesterol.

45 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden al menos una base nucleotídica modificada, un enlace internucleosídico o un resto de azúcar. En ciertas realizaciones, dicho enlace internucleosídico modificado es un enlace internucleosídico fosfortioato. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico fosfortioato.

50 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden al menos una modificación de alta afinidad. En ciertas de tales realizaciones, la modificación de alta afinidad es un nucleótido de alta afinidad químicamente modificado. En ciertas realizaciones, los nucleótidos de alta afinidad químicamente modificados son nucleótidos modificados con azúcar. En ciertas realizaciones, al menos uno de los nucleótidos modificados con azúcar comprende un puente entre la posición 4' y la posición 2' del azúcar. Cada uno de los nucleótidos modificados con azúcar está, independientemente, en la conformación del azúcar β-D o α-L. En ciertas realizaciones, cada uno de dichos nucleótidos modificados confiere una T_m de al menos 1 a 4 grados por nucleótido. En ciertas realizaciones, cada uno de dichos nucleótidos modificados con azúcar comprende un grupo sustituyente en 2' que es distinto a H o a OH. Dichos nucleótidos modificados con azúcar incluyen aquellos que tienen un resto de azúcar bicíclico con puente en las posiciones 4' a 2'. En ciertas realizaciones, cada uno de los grupos sustituyentes en 2' es, independientemente, alcoxi, alcoxi sustituido o halógeno. En ciertas realizaciones, cada uno de los grupos sustituyentes en 2' es OCH₂CH₂OCH₃ (2'-MOE).

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen uno o más nucleótidos modificados con azúcar, que comprenden un puente entre la posición 4' y 2' del azúcar, en los que cada uno de dichos puentes comprende independientemente de 2 a 4 grupos de unión seleccionados independientemente de $-[C(R_1)(R_2)]_n-$, $C(R_1)=C(R_2)-$, $-C(R_1)=N-$, $-C(=NR_1)-$, $-C(=O)-$, $-C(=S)-$, $-O-$, $-Si(R_1)_2-$, $-S(=O)_x-$ y $-N(R_1)-$;

5 en los que

x es 0, 1, ó 2;

n es 1, 2, 3 ó 4;

10 cada R_1 y R_2 es, independientemente, H, un grupo protector, hidroxilo, alquilo C_1-C_{12} , alquilo C_1-C_{12} sustituido, alquenoilo C_2-C_{12} , alquenoilo C_2-C_{12} sustituido, alquinoilo C_2-C_{12} , alquinoilo C_2-C_{12} sustituido, arilo C_5-C_{20} , arilo C_5-C_{20} sustituido, radical heterociclo, radical heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical alicíclico C_5-C_7 , radical alicíclico C_5-C_7 sustituido, halógeno, OJ_1 , NJ_1J_2 , SJ_1 , N_J , $COOJ_1$, acilo $(C(=O)-H)$, acilo sustituido, CN, sulfonilo $(S(=O)_2-J_1)$ o sulfoxilo $(S(=O)-J_1)$; y

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

20 En un aspecto, cada uno de dichos puentes es, independientemente, $-[C(R_1)(R_2)]_n-$, $-[C(R_1)(R_2)]_n-O-$, $-C(R_1R_2)-N(R_1)-O-$ o $-C(R_1R_2)-O-N(R_1)-$. En otro aspecto, cada uno de dichos puentes es, independientemente, $4'-(CH_2)_3-2'$, $4'-(CH_2)_2-2'$, $4'-CH_2O-2'$, $4'-(CH_2)_2-O-2'$, $4'-CH_2-O-N(R_1)-2'$ y $4'-CH_2-N(R_1)-O-2'$, en el que cada R_1 es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C_1-C_{12} .

25 En ciertas realizaciones, se describen aquí compuestos antisentido cortos útiles en la reducción de dianas y/o ARN dianas asociados con estados de enfermedad en animales. En ciertas realizaciones se describen métodos de uso de compuestos antisentido cortos para reducir la expresión de un ARN diana en un animal. En ciertas realizaciones, se describe aquí el uso de un compuesto antisentido corto en la descripción de un medicamento para el tratamiento de un trastorno metabólico en un animal. En ciertas realizaciones se describe aquí el uso de un compuesto antisentido corto en la preparación de un medicamento para incrementar la sensibilidad a la insulina, disminuir la glucosa en sangre o disminuir el HbA_{1c} en un animal. También se describe el uso de un compuesto antisentido corto en la preparación de un medicamento para disminuir el colesterol sérico total, los niveles de LDL en suero, los niveles de VLDL en suero, los niveles de HDL en suero, triglicéridos en suero, apolipoproteína(a) sérica o ácidos grasos libres en un animal.

30 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos descritos aquí exhiben una potencia igual o mayor con respecto al silenciamiento del ARN diana en comparación con el oligonucleótido antisentido parental más largo, de al menos 20 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos exhiben un inicio de la acción más rápido (reducción del ARN diana) en comparación con el oligonucleótido antisentido parental. En ciertas realizaciones, el incremento de la potencia se produce en el riñón. En ciertas realizaciones, el ARN diana se expresa predominantemente en los riñones. En ciertas realizaciones, el incremento de la potencia se produce en el hígado. En ciertas realizaciones, el ARN diana se expresa predominantemente en el hígado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

40 Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada siguiente son ejemplos y explicaciones únicamente y no son restrictivas de la invención reivindicada. Aquí, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. Como se usa aquí, "o" significa "y/o", a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido" no es limitante. Asimismo, términos tales como "elemento" o "componentes" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

45 Los encabezados de sección usados aquí son únicamente con motivos organizativos y no deben interpretarse como limitantes de la materia objeto descrita.

A. Definiciones

50 A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura usada en relación con la química analítica, la química orgánica sintética y la química medicinal y farmacéutica descritas aquí y los procedimientos y técnicas de las mismas descritos aquí son bien conocidos y usados habitualmente en la técnica. Se pueden usar técnicas estándar para síntesis química, análisis químico, preparación farmacéutica, formulación y liberación, y tratamiento de sujetos. Algunas de estas técnicas y procedimientos se pueden encontrar en, por ejemplo, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research" Editado por Sangvi y Cook, American Chemical Society, Washington D.C., 1994; y "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., 18ª edición, 1990.

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

Como se usa aquí, el término “nucleósido” quiere decir una glucosilamina que comprende una base nucleotídica y un azúcar. Los nucleósidos incluyen, pero no se limitan a, nucleósidos naturales, nucleósidos abásicos, nucleósidos modificados y nucleósidos que tienen bases miméticas y/o grupos de azúcar.

- 5 Como se usa aquí, el término “nucleótido” se refiere a una glucosilamina que comprende una base nucleotídica y un azúcar que tiene un grupo fosfato unido covalentemente al azúcar. Los nucleótidos pueden estar modificados con cualquiera de diversos sustituyentes.

10 Como se usa aquí, el término “base nucleotídica” se refiere a una porción de base de un nucleósido o nucleótido. Una base nucleotídica puede comprender cualquier átomo o grupo de átomos capaces de unir el hidrógeno con una base de otro ácido nucleico.

Como se usa aquí, la expresión “resto de base heterocíclica” se refiere a una base nucleotídica que comprende un heterociclo.

15 Como se usa aquí, el término “desoxirribonucleótido” quiere decir un nucleótido que tiene un hidrógeno en la posición 2' de la porción de azúcar del nucleótido. Los desoxirribonucleótidos pueden estar modificados con cualquiera de diversos sustituyentes.

Como se usa aquí, el término “ribonucleótido” quiere decir un nucleótido que tiene un hidroxilo en la posición 2' de la porción de azúcar del nucleótido. Los ribonucleótidos pueden estar modificados con cualquiera de diversos sustituyentes.

20 Como se usa aquí, la expresión “compuesto oligomérico” se refiere a una estructura polimérica que comprende dos o más subestructuras y que es capaz de hibridar con una región de una molécula de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleósidos. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son compuestos antisentido cortos. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos antisentido cortos. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos quiméricos.

Como se usa aquí, el término “monómero” se refiere a una única unidad de un oligómero. Los monómeros incluyen, pero no se limitan a, nucleósidos y nucleótidos, naturales o modificados.

30 Como se usa aquí, “oligonucleósido” se refiere a un oligonucleótido en el que los enlaces internucleosídicos no contienen un átomo de fósforo.

35 Como se usa aquí, el término “oligonucleótido” se refiere a un compuesto oligomérico que comprende una pluralidad de nucleótidos unidos. En cierta realización se modifica uno o más nucleótidos de un oligonucleótido. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido comprende ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN). En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos están compuestos por bases nucleotídicas naturales y/o no naturales, azúcares y enlaces internucleotídicos covalentes y pueden además incluir conjugados de ácidos no nucleicos.

Como se usa aquí, “enlace internucleotídico” se refiere a un enlace covalente entre nucleótidos adyacentes.

Como se usa aquí, “enlace monomérico” se refiere a un enlace covalente entre dos monómeros. Los enlaces monoméricos incluyen, pero no se limitan a, enlaces internucleotídicos y enlaces internucleosídicos.

Como se usa aquí, “enlace internucleotídico natural” se refiere a un enlace fosfodiéster 3' a 5'.

40 Como se usa aquí, el término “compuesto antisentido” se refiere a un compuesto oligomérico que es, al menos parcialmente, complementario a una molécula de ácido nucleico diana con la que hibrida. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido modula (incrementa o disminuye) la expresión de un ácido nucleico diana. Los compuestos antisentido incluyen, pero no se limitan a, compuestos que son oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos y combinaciones quiméricas de estos. En consecuencia, aunque todos los compuestos antisentido son compuestos oligoméricos, no todos los compuestos oligoméricos son compuestos antisentido.

45 Como se usa aquí, la expresión “oligonucleótido antisentido” se refiere a un compuesto antisentido que es un oligonucleótido.

50 Como se usa aquí, la expresión “oligonucleótido antisentido parental” se refiere a un oligonucleótido de 20 nucleótidos de longitud que tiene una región de salto desoxi que tiene diez 2'-desoxirribonucleótidos, flanqueada por una primera y una segunda región ala, teniendo cada una de ellas cinco 2'-O-(2-metoxietil)ribonucleótidos (un gápmero 5-10-5 MOE) y que comprende la secuencia del compuesto antisentido corto correspondiente de que es padre.

Como se usa aquí, “compuesto antisentido corto” se refiere a un compuesto antisentido de alrededor de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 monómeros de longitud. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene al menos una modificación de alta afinidad.

5 Como se usa aquí, la expresión “oligonucleótido antisentido corto” se refiere a un oligonucleótido antisentido de alrededor de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido antisentido corto tiene al menos una modificación de alta afinidad.

Como se usa aquí, la expresión “gápmo corto” se refiere a un oligonucleótido antisentido corto que tiene una primera y una segunda región ala, teniendo cada una de ellas independientemente de 1 a 3 nucleótidos de longitud y una región de salto de 2 a 14 bases nucleotídicas de longitud.

10 Como se usa aquí, el término “motivo” se refiere a un patrón de nucleótidos no modificados y modificados en un compuesto antisentido corto.

15 Como se usa aquí, la expresión “oligómero antisentido quimérico” se refiere a un compuesto oligomérico antisentido que tiene al menos un azúcar, una base nucleotídica o un enlace internucleosídico que está modificado diferencialmente en comparación con al menos otro azúcar, base nucleotídica o enlace internucleosídico dentro del mismo compuesto oligomérico antisentido. El resto de los azúcares, bases nucleotídicas y enlaces internucleosídicos pueden estar modificados o no modificados independientemente, ser iguales o diferentes.

20 Como se usa aquí, la expresión “oligonucleótido antisentido quimérico” se refiere a un oligonucleótido antisentido que tiene al menos un azúcar, una base nucleotídica o un enlace internucleosídico que está modificado diferencialmente en comparación con al menos otro azúcar, base nucleotídica o enlace internucleosídico dentro del mismo oligonucleótido antisentido. El resto de los azúcares, bases nucleotídicas y enlaces internucleosídicos pueden estar modificados o no modificados independientemente, ser iguales o diferentes.

Como se usa aquí, la expresión “oligonucleótido antisentido de estructura mixta” se refiere a un oligonucleótido antisentido en el que al menos un enlace internucleosídico del oligonucleótido antisentido es diferente de al menos otro enlace internucleosídico del oligonucleótido antisentido.

25 Como se usa aquí, el término “diana” se refiere a una proteína cuya modulación se desea.

Como se usa aquí, la expresión “gen diana” se refiere a un gen que codifica una diana.

30 Como se usa aquí, las expresiones “ácido nucleico diana” y “molécula de ácido nucleico que codifica una diana” se refieren a cualquier molécula de ácido nucleico cuya expresión o actividad puede ser modulada por un compuesto antisentido. Los ácidos nucleicos diana incluyen, pero no se limitan a, ARN (incluidos, pero sin limitarse a, pre-ARNm y ARNm o porciones de los mismos) transcritos a partir de ADN que codifica una diana, y, también, ADNc derivado de dicho ARN, y ARNmi. Por ejemplo, el ácido nucleico diana puede ser un gen celular (o ARNm transcrito a partir del gen), cuya expresión se asocia con un trastorno o estado de enfermedad concreto, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso.

35 Como se usa aquí, el término “dirigido” o “dirigido a” se refiere a la asociación de un compuesto antisentido con una molécula de ácido nucleico diana concreta o una región concreta de nucleótidos dentro de una molécula de ácido nucleico diana.

Como se usa aquí, la expresión “sitio diana en 5'” se refiere al nucleótido de un ácido nucleico diana que es complementario al nucleótido más en 5' de un compuesto antisentido concreto.

40 Como se usa aquí, la expresión “sitio diana en 3'” se refiere al nucleótido de un ácido nucleico diana que es complementario al nucleótido más en 3' de un compuesto antisentido concreto.

Como se usa aquí, la expresión “región diana” se refiere a una porción de un ácido nucleico diana con la que uno o más compuestos antisentido son complementarios.

Como se usa aquí, la expresión “segmento diana” se refiere una parte más pequeña o subporciones de una región dentro de un ácido nucleico diana.

45 Como se usa aquí, la expresión “complementariedad con la base nucleotídica” se refiere a una base nucleotídica que puede aparearse con otra base nucleotídica. Por ejemplo, en el ADN, la adenina (A) es complementaria de la timina (T). Por ejemplo, en el ARN, la adenina (A) es complementaria del uracilo (U). En ciertas realizaciones, base nucleotídica complementaria se refiere a una base nucleotídica de un compuesto antisentido que puede aparearse con bases con una base nucleotídica de su ácido nucleico diana. Por ejemplo, si una base nucleotídica en una posición determinada de un compuesto antisentido puede unirse por enlaces de hidrógeno a una base nucleotídica en cierta posición de un ácido nucleico diana, la posición del enlace de hidrógeno entre el nucleótido y el ácido nucleico diana se considera complementaria en dicho par de bases nucleotídicas.

50

Como se usa aquí, la expresión “base nucleotídica no complementaria” se refiere a un par de bases nucleotídicas que no forman enlaces de hidrógeno entre sí o, de otro modo, soportar hibridación.

5 Como se usa aquí, el término “complementariedad” se refiere a la capacidad de un compuesto oligomérico para hibridar con otro compuesto oligomérico o ácido nucleico a través de complementariedad de base nucleotídica. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido y su diana son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula están ocupadas por bases nucleotídicas que se pueden unir entre sí para permitir una asociación estable entre el compuesto antisentido y la diana. Un experto en la técnica reconoce que la inclusión de faltas de coincidencia es posible sin eliminar la capacidad de los compuestos oligoméricos para permanecer en asociación. Por tanto, se describen aquí compuestos antisentido que pueden comprender hasta alrededor de 20% de nucleótidos que están desapareados (es decir, no son bases nucleotídicas complementarias a los correspondientes nucleótidos de la diana). Preferiblemente, los compuestos antisentido no contienen más de alrededor de 15%, más preferiblemente no más de alrededor de 10%, más preferiblemente no más de alrededor de 5% o ningún desapareamiento. Los nucleótidos restantes son bases nucleotídicas complementarias o, por otro lado, no alteran la hibridación (por ejemplo, bases universales). Un experto normal en la técnica reconocería que los compuestos proporcionados aquí son al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% complementarios a un ácido nucleico diana.

Como se usa aquí, el término “desapareamiento” se refiere a una base nucleotídica no complementaria en un compuesto oligomérico complementario.

20 Como se usa aquí, “hibridación” quiere decir el apareamiento de compuestos oligoméricos complementarios (por ejemplo, un compuesto antisentido y su ácido nucleico diana). Aunque no está limitado a un mecanismo concreto, el mecanismo más habitual de apareamiento implica enlaces de hidrógeno que pueden ser enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, de Hoogsteen o de Hoogsteen inverso, entre nucleósidos o bases nucleotídicas complementarias (bases nucleotídicas). Por ejemplo, la base natural adenina es una base nucleotídica complementaria a las bases nucleotídicas naturales timidina y uracilo, que se aparean a través de la formación de enlaces de hidrógeno. La base natural guanina es una base nucleotídica complementaria de las bases naturales citosina y 5-metil-citosina. La hibridación se puede producir en varias circunstancias.

30 Como se usa aquí, la expresión “hibrida específicamente” se refiere a la capacidad de un compuesto oligomérico para hibridar con un sitio en el ácido nucleico con mayor afinidad que con la que hibrida con otro sitio en el ácido nucleico. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con más de un sitio diana.

Como se usa aquí, “diseñar” o “diseñado” se refieren al procedimiento de diseñar un compuesto oligomérico que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico seleccionado.

35 Como se usa aquí, el término “modulación” se refiere a una perturbación de la función o actividad cuando se compara con el nivel de la función o actividad antes de la modulación. Por ejemplo, modulación incluye el cambio, un incremento (estimulación o inducción) o una disminución (inhibición o reducción) de la expresión génica. Como ejemplo adicional, la modulación de la expresión puede incluir perturbar la selección de un sitio de corte y empalme del procesamiento de pre-ARNm.

40 Como se usa aquí, el término “expresión” se refiere a todas las funciones y etapas por las cuales la información codificada en un gen se convierte en estructuras presentes y funcionando en una célula. Dichas estructuras incluyen, pero no se limitan a, los productos de la transcripción y la traducción.

45 Como se usa aquí, “variante” se refiere a un transcrito de ARN alternativo que se puede producir a partir de la misma región genómica del ADN. Variantes incluyen, pero no se limitan a, “variantes pre-ARNm” que son transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico que difieren de otros transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico en su posición de iniciación o de terminación y contienen secuencias intrónicas y exónicas. Variantes también incluyen, pero no se limitan a, aquellas con uniones de corte y empalme alternativas o codones de iniciación y terminación alternativos.

50 Como se usa aquí, “monómero modificado de alta afinidad” se refiere a un monómero que tiene al menos una base nucleotídica modificada, un enlace internucleosídico o un resto de azúcar, cuando se compara con monómeros naturales, de modo que la modificación aumenta la afinidad de un compuesto antisentido que comprende el monómero de alta afinidad por su ácido nucleico diana. Las modificaciones de alta afinidad incluyen, pero no se limitan a, monómeros (por ejemplo, nucleósidos y nucleótidos), que comprenden azúcares modificados en 2’.

55 Como se usa aquí, la expresión “modificado en 2’” o “sustituido en 2’” quiere decir un azúcar que comprende un sustituyente en la posición 2’ distinto a H u OH. Los monómeros modificados en 2’ incluyen, pero no se limitan a, BNA y monómeros (por ejemplo, nucleósidos y nucleótidos) con sustituyentes en 2’, tal como alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C_1-C_{10} , $-OCF_3$, $O-(CH_2)_2-O-CH_3$, $2'-O(CH_2)_2SCH_3$, $O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$, u $O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$, en los que cada R_m y R_n es, independientemente, H o alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden un monómero modificado en 2’ que no tiene la fórmula $2'-O(CH_2)_nH$, en la que n es de uno a seis. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden

un monómero modificado en 2' que no tiene la fórmula 2'-OCH₃. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden un monómero modificado en 2' que no tiene la fórmula o, en la alternativa, 2'-O(CH₂)₂OCH₃.

5 Como se usa aquí, la expresión “ácido nucleico bicíclico” o “BNA” o “nucleósido bicíclico” o “nucleótido bicíclico” se refiere a un nucleósido o nucleótido en el que la porción furanosa del nucleósido incluye un puente que conecta dos átomos de carbono sobre el anillo de furanosa, formando de este modo un sistema de anillo bicíclico.

Como se usa aquí, a menos que se indique lo contrario, la expresión “metilenoxi BNA” solo se refiere a β-D-metilenoxi BNA.

Como se usa aquí, el término “MOE” se refiere al sustituyente 2'-metoxietilo.

10 Como se usa aquí, el término “gápmero” se refiere a un compuesto oligomérico quimérico que comprende una región central (un “salto”) y una región en cualquiera de los lados de la región central (las “alas”), en la que el salto comprende al menos una modificación que es diferente de la de cada ala. Dichas modificaciones incluyen modificaciones en la base nucleotídica, el enlace monomérico y el azúcar, así como la ausencia de modificación (sin modificar). Por tanto, en ciertas realizaciones, los enlaces nucleotídicos en cada una de las alas son diferentes de los enlaces nucleotídicos en el salto. En ciertas realizaciones, cada ala comprende nucleótidos con modificaciones de alta afinidad y el salto comprende nucleótidos que no comprenden dicha modificación. En ciertas realizaciones, los nucleótidos en el salto y los nucleótidos en las alas comprenden todos ellos modificaciones de alta afinidad, pero las modificaciones de alta afinidad en el salto son diferentes de las modificaciones de alta afinidad en las alas. En ciertas realizaciones, las modificaciones en las alas son las mismas entre sí. En ciertas realizaciones, las modificaciones en las alas son diferentes entre sí. En ciertas realizaciones, los nucleótidos en el salto no están modificados, y los nucleótidos en las alas están modificados. En ciertas realizaciones, la(s) modificación(es) en cada ala son las mismas. En ciertas realizaciones, la(s) modificación(es) en un ala son diferentes de la(s) modificación(es) en las otras alas. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos son gápmeros que tienen 2'-desoxinucleótidos en el salto y nucleótidos con modificaciones de alta afinidad en el ala.

25 Como se usa aquí, el término “profármaco” se refiere a un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte en una forma activa (es decir, el fármaco) dentro del cuerpo o las células del mismo por acción de enzimas endógenas u otros productos químicos y/o condiciones.

Como se usa aquí, el término “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a sales de compuestos activos que conservan la actividad biológica deseada del compuesto activo y que no producen efectos toxicológicos indeseados.

30 Como se usa aquí, la expresión “estructura caperuza” o “resto caperuza terminal” se refiere a modificaciones químicas que se han incorporado en cualquier extremo de un compuesto antisentido.

Como se usa aquí, el término “prevención” se refiere a retrasar o impedir el inicio o desarrollo de una afección o enfermedad durante un periodo de tiempo que va desde horas a días, preferiblemente de semanas a meses.

35 Como se usa aquí, el término “mejora” se refiere a una disminución de al menos un indicador de la gravedad de una afección o enfermedad. La gravedad de los indicadores se puede determinar mediante medidas subjetivas u objetivas que son conocidas para los expertos en la técnica.

40 Como se usa aquí, el término “tratamiento” se refiere a administrar una composición de la invención para efectuar una alteración o mejora de la afección o enfermedad. La prevención, mejora y/o tratamiento puede requerir la administración de múltiples dosis a intervalos regulares, o antes del inicio de la afección o enfermedad, para alterar el curso de la enfermedad o afección. Además, se puede usar un único agente en un único individuo para cada prevención, mejora y tratamiento de una afección o enfermedad de forma secuencial o concurrente.

Como se usa aquí, la expresión “agente farmacéutico” se refiere a una sustancia que proporciona un beneficio terapéutico cuando se administra a un sujeto.

Como se usa aquí, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un agente farmacéutico que proporciona un beneficio terapéutico a un animal.

45 Como se usa aquí, “administrar” significa proporcionar un agente farmacéutico a un animal e incluye, pero no se limita a, la administración por un profesional médico y la autoadministración.

50 Como se usa aquí, el término “co-administración” se refiere a la administración de dos o más agentes farmacéuticos a un animal. Los dos o más agentes farmacéuticos pueden estar en una única composición farmacéutica o pueden estar en composiciones farmacéuticas distintas. Cada uno de los dos o más agentes farmacéuticos se puede administrar por la misma vía de administración o por vías diferentes. La co-administración abarca la administración en paralelo o secuencial.

Como se usa aquí, la expresión “composición farmacéutica” se refiere a una mezcla de sustancias adecuadas para administrar a un individuo. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender un oligonucleótido antisentido y una disolución acuosa estéril.

Como se usa aquí, el término “individuo” se refiere a un ser humano o a un animal no humano seleccionado para el tratamiento o terapia.

5 Como se usa aquí, el término “animal” se refiere a un ser humano o animal no humano, incluyendo, pero sin limitarse a, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y primates no humanos, incluyendo, pero sin limitarse a, monos y chimpancés.

Como se usa aquí, el término “sujeto” se refiere a un animal, incluido, pero sin limitarse a, el ser humano, al que se administra una composición farmacéutica.

10 Como se usa aquí, el término “duración” se refiere al período de tiempo durante el cual se continúa una actividad o acontecimiento. En ciertas realizaciones, la duración del tratamiento es el período de tiempo durante el cual se administran las dosis de un agente farmacéutico.

Como se usa aquí, la expresión “administración parenteral” se refiere a la administración mediante inyección o infusión. La administración parenteral incluye, pero no se limita a, administración subcutánea, administración intravenosa, o administración intramuscular.

15 Como se usa aquí, la expresión “administración subcutánea” se refiere a la administración justo debajo de la piel. “Administración intravenosa” significa administración en una vena.

20 Como se usa aquí, el término “dosis” se refiere a una cantidad especificada de un agente farmacéutico proporcionada en una única administración. En ciertas realizaciones, una dosis se puede administrar en dos o más bolos, comprimidos o inyecciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, en las que se desea la administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen que no se acomoda fácilmente mediante una única inyección. En dichas realizaciones, se pueden usar dos o más inyecciones para alcanzar la dosis deseada. En ciertas realizaciones, una dosis se puede administrar en dos o más inyecciones para minimizar la reacción en el punto de inyección en un individuo.

25 Como se usa aquí, la expresión “unidad de dosificación” se refiere a una forma en la que se proporciona un agente farmacéutico. En ciertas realizaciones, una unidad de dosificación es un vial que comprende oligonucleótido antisentido liofilizado. En ciertas realizaciones, una unidad de dosificación es un vial que comprende oligonucleótido antisentido reconstituido.

Como se usa aquí, la expresión “agente farmacéutico” se refiere a una sustancia que proporciona un beneficio terapéutico cuando se administra a un individuo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones un oligonucleótido antisentido es un agente farmacéutico.

30 Como se usa aquí, la expresión “ingrediente farmacéutico activo” se refiere a la sustancia en una composición farmacéutica que proporciona un efecto deseado.

35 Como se usa aquí, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un agente farmacéutico que proporciona un beneficio terapéutico a un individuo. En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto antisentido es la cantidad que necesita administrarse para tener como resultado un beneficio observable.

Como se usa aquí, el término “hipercolesterolemia” se refiere a una afección caracterizada por niveles elevados de colesterol en suero.

Como se usa aquí, el término “hiperlipidemia” se refiere a una afección caracterizada por niveles elevados de lípidos en suero.

40 Como se usa aquí, el término “hipertrigliceridemia” se refiere a una afección caracterizada por niveles elevados de triglicéridos en suero.

Como se usa aquí, el término “hipercolesterolemia no familiar” se refiere a una afección caracterizada por niveles elevados de colesterol que no es el resultado de una única mutación génica hereditaria.

45 Como se usa aquí, la expresión “hipercolesterolemia poligénica” se refiere a una afección caracterizada por niveles elevados de colesterol que es el resultado de la influencia de diversos factores genéticos. En ciertas realizaciones, la hipercolesterolemia poligénica se puede exacerbar por la ingesta de lípidos en la dieta.

50 Como se usa aquí, la expresión “hipercolesterolemia familiar (HF)” se refiere a un trastorno metabólico dominante autosómico caracterizado por una mutación en el gen del receptor de LDL (LDL-R), niveles marcadamente elevados de LDL-C e inicio prematuro de aterosclerosis. Un diagnóstico de hipercolesterolemia familiar se realiza cuando un individuo cumple uno o más de los criterios siguientes: pruebas genéticas que confirman 2 genes mutados del receptor de LDL; pruebas genéticas que confirman un gen mutado del receptor de LDL; historial documentado de LDL-colesterol en suero sin tratar superior a 500 mg/dl; xantoma tendinoso y/o cutáneo antes de los 10 años de

edad: o ambos padres presentan niveles elevados de LDL-colesterol en suero documentados antes de la terapia hipolipemiente consistente con hipercolesterolemia familiar heterocigótica.

Como se usa aquí, la expresión “hipercolesterolemia familiar homocigótica” o “HFHo” se refiere a una afección caracterizada por una mutación en el gen de LDL-R tanto materno como paterno.

- 5 Como se usa aquí, la expresión “hipercolesterolemia familiar heterocigótica” o “HFHe” se refiere a una afección caracterizada por una mutación en el gen de LDL-R materno o paternos.

Como se usa aquí, la expresión “dislipidemia mixta” se refiere a una afección caracterizada por niveles elevados de colesterol en suero y niveles elevados de triglicéridos en suero.

- 10 Como se usa aquí, la expresión “dislipidemia diabética” o “diabetes de tipo II con dislipidemia” se refiere a una afección caracterizada por diabetes de tipo II, niveles reducidos de HDL-C, niveles elevados de triglicéridos en suero y niveles elevados de partículas de LDL pequeñas densas.

- 15 Como se usa aquí, la expresión “equivalentes de riesgo de “CPC” se refiere a indicadores de enfermedad aterosclerótica clínica que confieren un riesgo elevado de cardiopatía coronaria. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los equivalentes de riesgo de CPC incluyen, sin limitaciones, cardiopatía coronaria clínica, enfermedad de las arterias carótidas sintomática, enfermedad arterial periférica y/o aneurisma aórtico abdominal.

Como se usa aquí, la expresión “enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA)” se refiere a una afección caracterizada por la inflamación grasa del hígado que no se debe a un abuso del consumo de alcohol (por ejemplo, consumo de alcohol de más de 20 g/día). En ciertas realizaciones, la EHGNA está relacionada con la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico.

- 20 Como se usa aquí, la expresión “esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)” se refiere a una afección caracterizada por la inflamación y la acumulación de grasa y tejido fibroso en el hígado que no se debe a un abuso del consumo de alcohol. EHNA es una forma extrema de la EHGNA.

- 25 Como se usa aquí, la expresión “factores de riesgo principales” se refiere a factores que contribuyen a un alto riesgo de una enfermedad o afección concreta. En ciertas realizaciones, los factores principales de riesgo de cardiopatía coronaria incluyen, sin limitación, tabaquismo, hipertensión, niveles bajos de HDL-C, antecedentes familiares de cardiopatía coronaria y la edad.

Como se usa aquí, el término “factores de riesgo de CPC” se refiere a equivalentes de riesgo de CPC y factores de riesgo principales.

- 30 Como se usa aquí, la expresión “cardiopatía coronaria (CPC)” se refiere a un estrechamiento de los vasos sanguíneos pequeños que suministran sangre y oxígeno al corazón, que a menudo da como resultado aterosclerosis.

- 35 Como se usa aquí, la expresión “riesgo reducido de cardiopatía coronaria” se refiere a una reducción de la probabilidad de que un individuo desarrolle cardiopatía coronaria. En ciertas realizaciones, una reducción del riesgo de cardiopatía coronaria se mide por una mejora en uno o más factores de riesgo de CPC, por ejemplo una disminución de los niveles de LDL-C.

Como se usa aquí, el término “aterosclerosis” se refiere a un endurecimiento de las arterias que afecta a las arterias de tamaño grande y medio y que se caracteriza por la presencia de depósitos de grasa. Los depósitos de grasa se denominan “ateromas” o “placas”, que consisten principalmente en colesterol y otras grasas, calcio y tejido cicatricial, y daños en el revestimiento de las arterias.

- 40 Como se usa aquí, la expresión “historial de cardiopatía coronaria” se refiere a la aparición de cardiopatía coronaria clínicamente evidente en el historial médico de un individuo o un miembro de la familia del individuo.

Como se usa aquí, la expresión “cardiopatía coronaria de inicio precoz” se refiere a un diagnóstico de cardiopatía coronaria antes de los 50 años de edad.

- 45 Como se usa aquí, la expresión “individuo intolerante a estatinas” se refiere a un individuo que, como resultado de la terapia con estatinas, experimenta uno o más incrementos de la creatinina cinasa, anomalías en las pruebas de función hepática, dolores musculares o efectos secundarios en el sistema nervioso central.

Como se usa aquí, el término “eficacia” se refiere a la capacidad para producir un efecto deseado. Por ejemplo, la eficacia de una terapia hipolipemiente puede ser la reducción en la concentración de uno o más de LDL-C, VLDL-C, IDL-C, no-HDL-C, ApoB, lipoproteína(a), o triglicéridos.

- 50 Como se usa aquí, la expresión “perfil de seguridad aceptable” se refiere a un patrón de efectos secundarios que está dentro de los límites clínicamente aceptables.

- 5 Como se usa aquí, la expresión “efectos secundarios” se refiere a respuestas fisiológicas atribuibles a un tratamiento aparte de los efectos deseados. En ciertas realizaciones, los efectos secundarios incluyen, sin limitaciones, reacciones en el sitio de la inyección, anomalías en las pruebas de función hepática, anomalías en la función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anomalías en el sistema nervioso central y miopatías. Por ejemplo, incrementos en los niveles de aminotransferasas en suero pueden indicar toxicidad hepática o anomalías en la función hepática. Por ejemplo, incrementos en los niveles de bilirrubina pueden indicar toxicidad hepática o anomalías en la función hepática.
- 10 Como se usa aquí, la expresión “reacción en el sitio de la inyección” se refiere a inflamación o enrojecimiento anormal de la piel en el punto de inyección en un individuo.
- 15 Como se usa aquí, la expresión “cumplimiento del individuo” se refiere a la adhesión a una terapia recomendada o prescrita por un individuo.
- Como se usa aquí, la expresión “terapia hipolipemiente” se refiere a un régimen terapéutico proporcionado a un individuo para reducir uno o más lípidos en un individuo. En ciertas realizaciones, se proporciona una terapia hipolipemiente para reducir uno o más de ApoB, colesterol total, LDL-C, VLDL-C, IDL-C, no-HDL-C, triglicéridos, partículas de LDL pequeñas densas y Lp(a) en un individuo.
- 20 Como se usa aquí, la expresión “agente hipolipemiente” se refiere a un agente farmacéutico proporcionado a un individuo para alcanzar una disminución de los niveles de lípidos en el individuo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se proporciona a un individuo un agente hipolipemiente para reducir uno o más de ApoB, LDL-C, colesterol total y triglicéridos.
- 20 Como se usa aquí, la expresión “LDL-C diana” se refiere a un nivel de LDL-C que se desea tras la terapia hipolipemiente.
- Como se usa aquí, el término “cumplimiento” se refiere a la adhesión a una terapia recomendada por parte de un individuo.
- 25 Como se usa aquí, la expresión “terapia recomendada” se refiere a un régimen terapéutico recomendado por un profesional médico para el tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad.
- Como se usa aquí, la expresión “actividad baja del receptor de LDL” se refiere a la actividad del receptor de LDL que no es lo suficientemente alta como para mantener niveles clínicamente aceptables de LDL-C en la corriente sanguínea.
- 30 Como se usa aquí, la expresión “desenlace cardiovascular” se refiere a la aparición de acontecimientos cardiovasculares adversos principales.
- Como se usa aquí, la expresión “desenlace cardiovascular mejorado” se refiere a una reducción de la aparición de acontecimientos cardiovasculares adversos principales o del riesgo de los mismos. Ejemplos de acontecimientos cardiovasculares adversos principales incluyen, sin limitaciones, muerte, reinfarcto, ictus, shock cardiogénico, edema pulmonar, parada cardíaca y arritmia ventricular.
- 35 Como se usa aquí, la expresión “marcadores sustitutos del desenlace cardiovascular” se refiere a los indicadores indirectos de acontecimientos cardiovasculares adversos o del riesgo de los mismos. Por ejemplo, marcadores sustitutos del desenlace cardiovascular incluyen el espesor de la media íntima de la carótida (CIMT). Otro ejemplo de un marcador sustituto del desenlace cardiovascular incluye el tamaño del ateroma. El tamaño del ateroma se puede determinar mediante ultrasonidos intravasculares (USIV).
- 40 Como se usa aquí, la expresión “incremento de los niveles de HDL-C” se refiere a un incremento de los niveles de HDL-C en suero en un individuo a lo largo del tiempo.
- Como se usa aquí, el término “hipolipemiente” se refiere a una reducción de uno o más lípidos en suero en un individuo a lo largo del tiempo.
- 45 Como se usa aquí, la expresión “trastorno metabólico” se refiere a una afección caracterizada por una alteración o interrupción de la función metabólica. “Metabólica/o” y “metabolismo” son términos bien conocidos en la técnica, y generalmente incluyen toda la gama de procesos bioquímicos que se producen dentro de un organismo vivo. Trastornos metabólicos incluyen, pero no se limitan a, hiperglucemia, prediabetes, diabetes (de tipo I y de tipo II), obesidad, resistencia a la insulina y síndrome metabólico.
- 50 Como se usa aquí, la expresión “síndrome metabólico” se refiere a una combinación de factores de riesgo cardiovascular lipídicos y no lipídicos de origen metabólico. Se ha vinculado estrechamente con el trastorno metabólico generalizado conocido como resistencia a la insulina. El Panel de Tratamiento de adultos III (ATP III) del Programa Nacional educativo sobre colesterol de EE.UU. (NCEP) estableció criterios para el diagnóstico del síndrome metabólico cuando están presentes tres o más de cinco determinantes de riesgo. Los cinco determinantes de riesgo son obesidad abdominal, definida como una circunferencia de la cintura superior a 102 cm para varones o

superior a 88 cm para mujeres, niveles de triglicéridos superiores o iguales a 150 mg/dl, niveles de HDL-colesterol inferiores a 40 mg/dl para varones e inferiores a 50 mg/dl para mujeres, presión arterial superior o igual a 130/85 mmHg y niveles de glucosa en ayunas superiores o iguales a 110 mg/dl. Estos determinantes se pueden medir fácilmente en la práctica clínica (JAMA, 2001, 285: 2486-2497).

5 El término “alquilo” tal como se usa aquí, se refiere a un radical de hidrocarburo saturado lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono. Ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, n-hexilo, octilo, decilo, dodecilo y similares. Típicamente, los grupos alquilo incluyen de 1 a alrededor de 24 átomos de carbono, más típicamente de 1 a alrededor de 12 átomos de carbono (alquilo C₁-C₁₂) siendo más preferidos con de 1 a alrededor de 6 átomos de carbono. La expresión “alquilo inferior”, como se
10 usa aquí, incluye de 1 a alrededor de 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo, como se usan aquí pueden incluir, opcionalmente, uno o más grupos sustituyentes adicionales.

15 El término “alqueno”, como se usa aquí, se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Ejemplos de grupos alqueno incluyen, pero no se limitan a, etenilo, propenilo, butenilo, 1-metil-2-buten-1-ilo, dienos tales como 1,3-butadieno y similares. Típicamente, los grupos alqueno incluyen de 2 a alrededor de 24 átomos de carbono, más típicamente de 2 a alrededor de 12 átomos de carbono, siendo más preferidos de 2 a alrededor de 6 átomos de carbono. Los grupos alqueno, como se usan aquí, pueden incluir, opcionalmente, uno o más grupos sustituyentes adicionales.

20 El término “alquino”, como se usa aquí, se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Ejemplos de grupos alquino incluyen, pero no se limitan a, etinilo, 1-propinilo, 1-butinilo y similares. Típicamente, los grupos alquino incluyen de 2 a alrededor de 24 átomos de carbono, más típicamente de 2 a alrededor de 12 átomos de carbono, siendo más preferidos de 2 a alrededor de 6 átomos de carbono. Los grupos alquino, como se usan aquí, pueden incluir, opcionalmente, uno o más grupos sustituyentes adicionales.

25 El término “aminoalquilo”, como se usa aquí, se refiere a un radical alquilo sustituido con amino. Con este término se quiere incluir grupos alquilo C₁-C₁₂ que tienen un sustituyente amino en cualquier posición, y en el que el grupo alquilo une el grupo aminoalquilo a la molécula parental. Las porciones alquilo y/o amino del grupo aminoalquilo pueden estar adicionalmente sustituidas con grupos sustituyentes.

30 El término “alifático”, como se usa aquí, se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono, en el que la saturación entre dos átomos de carbono cualesquiera es un enlace sencillo, doble o triple. Preferiblemente, un grupo alifático contiene de 1 a alrededor de 24 átomos de carbono, más típicamente de 1 a alrededor de 12 átomos de carbono, siendo más preferidos de 1 a alrededor de 6 átomos de carbono. La cadena lineal o ramificada de un grupo alifático puede interrumpirse con uno o más heteroátomos que incluyen nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo. Dichos grupos alifáticos interrumpidos por
35 heteroátomos incluyen, sin limitaciones, polialcoxis, tales como polialquilenglicoles, poliaminas y poliiminas. Los grupos alifáticos como se usan aquí pueden incluir, opcionalmente, grupos sustituyentes adicionales.

40 El término “alícíclico” o “alíciclico” se refiere a un sistema de anillo cíclico en el que el anillo es alifático. El sistema de anillo puede comprender uno o más anillos de los que al menos un anillo es alifático. Alícíclicos preferidos incluyen anillos que tienen de alrededor de 5 a alrededor de 9 átomos de carbono en el anillo. Los grupos alícíclicos, como se usan aquí, pueden incluir, opcionalmente, grupos sustituyentes adicionales.

45 El término “alcoxi”, como se usa aquí, se refiere a un radical formado entre un grupo alquilo y un átomo de oxígeno, en el que el átomo de oxígeno se usa para unir el grupo alcoxi a una molécula parental. Ejemplos de grupos alcoxi incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, n-butoxi, sec-butoxi, *tert*-butoxi, n-pentoxi, neopentoxi, n-hexoxi y similares. Los grupos alcoxi como se usan aquí pueden incluir, opcionalmente, grupos sustituyentes adicionales.

Los términos “halo” y “halógeno”, como se usan aquí, se refieren a un átomo seleccionado de flúor, cloro, bromo y yodo.

50 Los términos “arilo” y “aromático” como se usa aquí se refieren a radicales de sistemas de anillo carbocíclicos mono- o policíclicos que tienen uno o más anillos aromáticos. Ejemplos de grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, indenilo y similares. Sistemas de anillo de arilo preferidos tienen de alrededor de 5 a alrededor de 20 átomos de carbono en uno o más anillos. Grupos arilo, como se usa aquí, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

55 Los términos “aralquilo” y “arilalquilo” como se usan aquí se refieren a un radical formado entre un grupo alquilo y un grupo arilo, en el que el grupo alquilo se usa para unir el grupo aralquilo a una molécula parental. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, bencilo, fenetilo y similares. Grupos aralquilo, como se usa aquí, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales unidos al alquilo, al arilo o a ambos grupos que forman el grupo radical.

- La expresión “radical heterocíclico”, como se usa aquí, se refiere a un sistema de anillo mono- o poli-cíclico radical que incluye al menos un heteroátomo y está insaturado, parcialmente saturado o completamente saturado, incluyendo así grupos heteroarilo. Heterocíclico también implica que incluye sistemas de anillo condensados en los que uno o más de los anillos condensados contienen al menos un heteroátomo y los otros anillos pueden contener uno o más heteroátomos u opcionalmente no contienen heteroátomos. Un grupo heterocíclico incluye típicamente al menos un átomo seleccionado de azufre, nitrógeno u oxígeno. Ejemplos de grupos heterocíclicos incluyen, [1,3]dioxolano, pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, quinoxalinilo, piridazinilo, tetrahydrofurilo y similares. Grupos heterocíclicos, como se usa aquí, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.
- Los términos “heteroarilo” y “heteroaromático”, como se usan aquí, se refieren a un radical que comprende un anillo aromático mono- o poli-cíclico, sistema de anillo o sistema de anillo condensado en el que al menos uno de los anillos es aromático e incluye uno o más heteroátomos. Heteroarilo también implica que incluye sistemas de anillo condensados que incluyen sistemas en los que uno o más de los anillos condensados no contienen heteroátomos. Grupos heteroarilo típicamente incluyen un átomo de anillo seleccionado de azufre, nitrógeno u oxígeno. Ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, benzooxazolilo, quinoxalinilo y similares. Los radicales heteroarilo se pueden unir directamente a una molécula parental o un resto de enlace tal como un grupo alifático o heteroátomo. Grupos heteroarilo, como se usa aquí, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.
- El término “heteroarilalquilo”, como se usa aquí, se refiere a un grupo heteroarilo como se ha definido previamente que tiene un radical alquilo que puede unir el grupo heteroarilalquilo a una molécula parental. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, piridinilmetilo, pirimidinilmetilo, naftiridinilpropilo y similares. Grupos heteroarilalquilo, como se usa aquí, pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales sobre una o ambas de las porciones de heteroarilo o alquilo.
- La expresión “estructura mono- o policíclica”, como se usa aquí, incluye todos los sistemas de anillo que son individuales o policíclicos que tienen anillos que están condensados o ligados, e implica que incluye sistemas de anillo individuales y mixtos individualmente seleccionados de alifático, alicíclico, arilo, heteroarilo, aralquilo, arilalquilo, heterocíclico, heteroarilo, heteroaromático, heteroarilalquilo. Tales estructuras mono- y policíclicas pueden contener anillos que son uniformes o que tienen grados variables de saturación que incluyen completamente saturados, parcialmente saturados o completamente insaturados. Cada anillo puede comprender átomos de anillo seleccionados de C, N, O y S para dar lugar a anillos heterocíclicos, además de anillos que sólo comprenden átomos de anillo de C que pueden estar presentes en un motivo mixto tal como, por ejemplo, bencimidazol en el que un anillo sólo tiene átomos de anillo de carbono, y el anillo condensado tiene dos átomos de nitrógeno. Las estructuras mono- o policíclicas pueden estar adicionalmente sustituidas con grupos sustituyentes tales como, por ejemplo, ftalimida que tiene dos grupos =O unidos a uno de los anillos. En otro aspecto, estructuras mono- o policíclicas pueden unirse a una molécula parental directamente mediante un átomo de anillo, mediante un grupo sustituyente o un resto de enlace bifuncional.
- El término “acilo”, como se usa aquí, se refiere a un radical formado mediante eliminación de un grupo hidroxilo de un ácido orgánico y tiene la fórmula general -C(O)-X en la X es normalmente alifático, alicíclico o aromático. Ejemplos incluyen carbonilos alifáticos, carbonilos aromáticos, sulfonilos alifáticos, sulfinilos aromáticos, sulfinilos alifáticos, fosfatos aromáticos, fosfatos alifáticos y similares. Grupos acilo como se usa aquí pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.
- El término “hidrocarbilo” incluye grupos que comprenden C, O y H. Se incluyen grupos lineales, ramificados y cíclicos que tienen cualquier grado de saturación. Tales grupos hidrocarbilo pueden incluir uno o más heteroátomos seleccionados de N, O y S, y pueden estar adicionalmente mono- o polisustituidos con uno o más grupos sustituyentes.
- Los términos “sustituyente” y “grupo sustituyente”, como se usan aquí, incluyen grupos que típicamente se añaden a otros grupos o compuestos parentales para potenciar propiedades deseadas o dar efectos deseados. Los grupos sustituyentes pueden protegerse o no protegerse y pueden añadirse a un sitio disponible o a muchos sitios disponibles en un compuesto parental. Los grupos sustituyentes también pueden estar adicionalmente sustituidos con otros grupos sustituyentes y pueden unirse directamente o mediante un grupo de enlace tal como un grupo alquilo o hidrocarbilo a un compuesto parental. Tales grupos incluyen, sin limitación, halógeno, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, acilo (-C(O)R_{aa}), carboxilo (-C(O)O-R_{aa}), grupos alifáticos, grupos alicíclicos, alcoxi, oxo sustituido (-O-R_{aa}), arilo, aralquilo, heterocíclico, heteroarilo, heteroarilalquilo, amino (-NR_{bb}R_{cc}), imino (=NR_{bb}), amido (-C(O)NR_{bb}R_{cc} o -M(R_{bb})C(O)R_{aa}), azido (-N₃), nitro (-NO₂), ciano (-CN), carbamido (-OC(O)NR_{bb}R_{cc} o -N(R_{bb})C(O)OR_{aa}), ureido (-N(R_{bb})C(O)NR_{bb}R_{cc}), tioureido (-N(R_{bb})C(S)NR_{bb}R_{cc}), guanidinilo (-N(R_{bb})C(=NR_{bb})R_{bb}R_{cc}), amidinilo (-C(=NR_{bb})NR_{bb}R_{cc} o -N(R_{bb})C(NR_{bb})R_{aa}), tiol (-SR_{bb}), sulfinilo (-S(O)R_{bb}), sulfonilo (-S(O)₂R_{bb}), sulfonamidilo (-S(O)₂NR_{bb}R_{cc} o -N(R_{bb})S(O)₂R_{bb}) y grupos conjugados. En las que cada R_{aa}, R_{bb} y R_{cc} es, independientemente, H, un grupo funcional químico opcionalmente ligado u otro grupo sustituyente incluyendo una lista preferida, sin limitación H, alquilo, alquenilo, alquinilo, alifático, alcoxi, acilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, alicíclico, heterocíclico y heteroarilalquilo.

B. Ciertos compuestos oligoméricos

En ciertas realizaciones se desea modificar químicamente compuestos oligoméricos, en comparación con oligómeros que se producen naturalmente, tales como ADN o ARN. Ciertas de tales modificaciones alteran la actividad del compuesto oligomérico. Ciertas de tales modificaciones químicas pueden alterar la actividad, por ejemplo: aumentando la afinidad de un compuesto antisentido por su ácido nucleico diana, aumentando su resistencia a una o más nucleasas y/o alterando la farmacocinética o distribución en tejido del compuesto oligomérico. En ciertos casos, el uso de químicas que aumentan la afinidad de un compuesto oligomérico por su diana puede permitir el uso de compuestos oligoméricos más cortos.

1. Ciertos monómeros

- 10 En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos comprenden uno o más monómeros modificados. En ciertas de tales realizaciones, los compuestos oligoméricos comprenden uno o más monómeros de alta afinidad. En ciertas realizaciones, tal monómero de alta afinidad se selecciona de monómeros (por ejemplo, nucleósidos y nucleótidos) que comprenden azúcares modificados en 2' que incluyen, pero no se limitan a: BNA y monómeros (por ejemplo, nucleósidos y nucleótidos) con sustituyentes en 2' tales como alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C₁-C₁₀, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n) u O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), en los que cada R_m y R_n es, independientemente, H o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o sin sustituir.

En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos que incluyen, pero no se limitan a, compuestos antisentido cortos de la presente descripción, comprenden uno o más monómeros de alta afinidad, siempre que el compuesto oligomérico no comprenda un nucleótido que comprende 2'-O(CH₂)_nH, en la que n es uno a seis.

- 20 En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos que incluyen, pero no se limitan a, compuestos antisentido cortos de la presente descripción, comprenden uno o más monómeros de alta afinidad, siempre que el compuesto oligomérico no comprenda un nucleótido que comprende 2-OCH₃ o 2'-O(CH₂)₂OCH₃.

- 25 En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos que incluyen, pero no se limitan a, compuestos antisentido cortos de la presente descripción, comprenden uno o más monómeros de alta afinidad, siempre que el compuesto oligomérico no comprenda α-L-metilenoxi (4'-CH₂-O-2')-BNA.

En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos que incluyen, pero no se limitan a, compuestos antisentido cortos de la presente descripción, comprenden uno o más monómeros de alta afinidad, siempre que el compuesto oligomérico no comprenda β-D-metilenoxi (4'-CH₂-O-2')-BNA.

- 30 En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos que incluyen, pero no se limitan a, compuestos antisentido cortos de la presente descripción, comprenden uno o más monómeros de alta afinidad, siempre que el compuesto oligomérico no comprenda α-L-metilenoxi (4'-CH₂-O-2')-BNA o β-D-metilenoxi (4'-CH₂-O-2')-BNA.

a. Ciertas bases nucleotídicas

- 35 La porción de base natural de un nucleósido es, típicamente una base heterocíclica. Las dos clases más habituales de dichas bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Para los nucleósidos que incluyen un azúcar de pentofuranosilo, un grupo fosfato se puede unir al resto hidroxilo en 2', 3' o 5' del azúcar. Al formar oligonucleótidos, los grupos fosfato unen covalentemente a los nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. Dentro de los oligonucleótidos, normalmente se hace referencia a los grupos fosfato como formadores de la estructura internucleotídica del oligonucleótido. El enlace natural o estructura de ARN y de ADN es un enlace fosfodiéster 3' a 5'.

- 40 Además de las bases nucleotídicas "no modificadas" o "naturales", tal como las bases nucleotídicas de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases nucleotídicas de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U), muchas bases nucleotídicas modificadas o miméticas de bases nucleotídicas conocidas para los expertos en la técnica son susceptibles con los compuestos descritos aquí. En ciertas realizaciones, una base nucleotídica modificada es una base nucleotídica que es bastante similar en estructura a la base nucleotídica parental, tal como, por ejemplo, 7-desaza purina, una 5-metilcitosina o una pinza G. En ciertas realizaciones, los miméticos de las bases nucleotídicas incluyen estructuras más complicadas, tales como, por ejemplo, un mimético de una base nucleotídica de fenoxacina tricíclica. Los métodos para la preparación de las bases nucleotídicas modificadas indicadas anteriormente son bien conocidos por los expertos en la técnica.

b. Ciertos azúcares

- 50 Los compuestos oligoméricos descritos aquí pueden comprender uno o más monómeros, incluyendo un nucleósido o nucleótido, que tiene un resto de azúcar modificado. Por ejemplo, el anillo de azúcar de furanosilo de un nucleósido se puede modificar de diversas maneras, incluyendo, pero sin limitarse a, la adición de un grupo sustituyente, en puente de dos átomos de anillo no germinales, para formar un ácido bicíclico-nucleico (BNA).

En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos comprenden uno o más monómeros que es un BNA. En ciertas realizaciones, los BNA incluyen, pero no se limitan a, (A) α -L-metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, (B) β -D-metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, (C) etilenoxi (4'-(CH₂)₂-O-2') BNA, (D) aminooxi (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA y (E) oxiamino (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA, como se representa en la Figura 1.

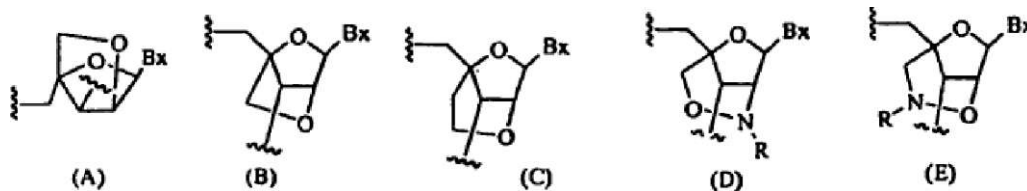


Figura 1. Ciertas estructuras BNA

En ciertas realizaciones, los compuestos de BNA incluyen, pero no se limitan a, compuestos que tienen al menos un puente entre la posición 4' y la posición 2' del azúcar, en los que cada uno de los puentes comprende de forma independiente de 1 o de 2 a 4 grupos de unión seleccionados de forma independiente de -[C(R₁)(R₂)]_n-, -C(R₁)=C(R₂)-, -C(R₁)=N-, -C(=NR₁)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R₁)₂-, -S(=O)_x- y -N(R₁)₁-;

en los que:

x es 0, 1, ó 2;

n es 1, 2, 3 ó 4;

cada R₁ y R₂ es, de forma independiente, H, un grupo protector, hidroxilo, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, arilo C₅-C₂₀, arilo C₅-C₂₀ sustituido, radical heterociclo, radical heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical alicíclico C₅-C₇, radical alicíclico C₅-C₇ sustituido, halógeno, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, CN, sulfonilo (S(=O)₂-J₁) o sulfoxilo (S(=O)-J₁); y

cada J₁ y J₂ es, de forma independiente, H, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, arilo C₅-C₂₀, arilo C₅-C₂₀ sustituido, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, aminoalquilo C₁-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂ sustituido o un grupo protector.

En una realización, cada uno de los puentes o los compuestos de BNA es, de forma independiente, -[C(R₁)(R₂)]_n-, -[C(R₁)(R₂)]_n-O-, -C(R₁R₂)-N(R₁)-O- o -C(R₁R₂)-O-N(R₁)-. En otra realización, cada uno de dichos puentes es, de forma independiente, 4'-(CH₂)-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-O-N(R₁)-2' y 4'-CH₂-N(R₁)-O-2', en el que cada R₁ es, de forma independiente, H, un grupo protector o alquilo C₁-C₁₂.

Ciertos BNA se han preparado y descrito en la bibliografía de patentes, así como en la bibliografía científica (Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; documento WO 94/14226; documento WO 2005/021570; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Ejemplos de patentes de EE.UU. presentadas y solicitudes publicadas que describen BNAs incluyen, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n^{os} 7.053.207; 6.268.490; 6.770.748; 6.794.499; 7.034.133; y 6.525.191; y las publicaciones pre-concesión de EE.UU. n^{os} 2004-0171570; 2004-0219565; 2004-0014959; 2003-0207841; 2004-0143114; y 20030082807.

Aquí también se describen BNAs en los que el grupo 2'-hidroxilo del anillo de azúcar ribosilo está unido al átomo de carbono en 4' del anillo de azúcar, formando de este modo un enlace metilenoxi (4'-CH₂-O-2') para formar el resto de azúcar bicíclico (Revisado en Elayadi et al., Curr. Opin. Invers. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 81-7; y Orum et al., Curr. Opin. Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; véase también las patentes de EE.UU.: 6.268.490 y 6.670.461). El enlace puede ser un grupo metileno (-CH₂-) que forma un puente entre el átomo de oxígeno en 2' y el átomo de carbono en 4', para los que el término metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA se usa para el resto bicíclico; en el caso de que haya un grupo etileno en esta posición se usa el término etilenoxi (4'-CH₂CH₂-O-2') BNA (Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Morita et al., Bioorganic Medicinal Chemistry, 2003, 11, 2211-2226). El metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA y otros análogos del azúcar bicíclico muestran estabilidades térmicas del dúplex muy altas con complementariedad de ADN y ARN (T_m = +3 a +10°C), estabilidad frente a la degradación 3'-exonucleolítica y buenas propiedades de solubilidad. Se han descrito potentes oligonucleótidos antisentido no tóxicos que comprenden BNAs (Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638).

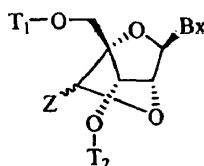
Un isómero de metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA que también se ha tratado es alfa-L-metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, que se ha demostrado que tiene una estabilidad superior contra una 3'-exonucleasa. Los alfa-L-metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA se incorporaron en gámperos y quimeras antisentido, que mostraron una potente actividad antisentido (Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372).

Se han descrito la síntesis y preparación de los monómeros de metileno (4'-CH₂-O-2') BNA adenina, citosina, guanina, 5-metil-citosina, timina y uracilo, junto con su oligomerización y las propiedades de reconocimiento de ácidos nucleicos (Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630). También se han descrito BNAs y su preparación en los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226.

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

15 Los restos de azúcares modificados son muy conocidos y pueden usarse para alterar, típicamente incrementar, la afinidad del compuesto antisentido por su diana y/o incrementar la resistencia a nucleasas. Una lista representativa de azúcares modificados preferidos incluye, pero no se limita a, azúcares modificados bicíclicos (BNA), incluyendo metileno (4'-CH₂-O-2') BNA y etileno (puente de 4'-(CH₂)₂-O-2') BNA; azúcares sustituidos, especialmente azúcares sustituidos en 2' que tienen un grupo sustituyente 2'-F, 2'-OCH₃ o 2'-O (CH₂)₂-OCH₃; y azúcares modificados en 4'-tio. Los azúcares también pueden reemplazarse con grupos miméticos de azúcar, entre otros. Los métodos para las preparaciones de azúcares modificados son muy conocidos para aquellos expertos en la técnica. Algunas patentes y publicaciones representativas que enseñan la preparación de dichos azúcares modificados incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. n^{os}. 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; 5.700.920; 6.531.584; y 6.600.032; y el documento WO 2005/121371.

En ciertas realizaciones, BNA incluyen nucleósidos bicíclicos que tienen la fórmula:



- 25 en la que:
- Bx es un resto de base heterocíclica;
- T₁ es H o un grupo protector de hidroxilo;
- T₂ es H, un grupo protector de hidroxilo o un grupo de fósforo reactivo;
- 30 Z es alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, o amida sustituida.

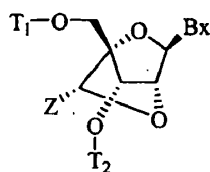
En una realización, cada uno de los grupos sustituidos está, de forma independiente, mono o polisustituido con grupos sustituyentes opcionalmente protegidos seleccionados de forma independiente de halógeno, oxo, hidroxilo, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ y CN, en los que cada uno de J₁, J₂ y J₃ es, de forma independiente, H o alquilo C₁-C₆ y X es O, S o NJ₁.

En ciertas de estas realizaciones, cada uno de los grupos sustituidos está, de forma independiente, mono o polisustituido con grupos sustituyentes seleccionados de forma independiente de halógeno, oxo, hidroxilo, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁ y NJ₃C(=X)NJ₁J₂, en los que cada uno de J₁, J₂ y J₃ es, de forma independiente, H, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido y X es O o NJ₁.

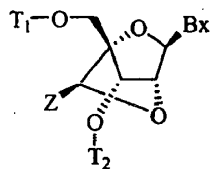
40 En ciertas realizaciones, el grupo Z es alquilo C₁-C₆ sustituido con uno o más X^x, en el que cada X^x es, de forma independiente, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ o CN; en los que cada uno de J₁, J₂ y J₃ es, de forma independiente, H o alquilo C₁-C₆ y X es O, S o NJ₁. En otra realización, el grupo Z es alquilo C₁-C₆ sustituido con uno o más X^x, en la que cada X^x es, de forma independiente halo (por ejemplo, flúor), hidroxilo, alcoxi (por ejemplo, CH₃O-), alcoxi o azido sustituido.

45 En ciertas realizaciones, el grupo Z es -CH₂X^x, en el que X^x es OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ o CN; en los que cada uno de J₁, J₂ y J₃ es, de forma independiente, H o alquilo C₁-C₆ y X es O, S o NJ₁. En otra realización, el grupo Z es CH₂X^x, en el que X^x es halo (por ejemplo, flúor), hidroxilo, alcoxi (por ejemplo, CH₃O-) o azido.

En ciertas de estas realizaciones, el grupo Z está en la configuración (R).



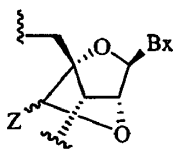
En ciertas de estas realizaciones, el grupo Z está en la configuración (S).



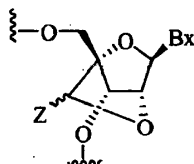
5 En ciertas realizaciones, cada T_1 y T_2 es un grupo protector de hidroxilo. Una lista preferida de grupos protectores de hidroxilo incluye bencilo, benzoilo, 2,6-diclorobencilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, mesilato, tosilato, dimetoxitritilo (DMT), 9-fenilxantina-9-ilo (Pixilo) y 9-(p-metoxifenilo)xantina-9-ilo (MOX). En ciertas realizaciones, T_1 es un grupo protector de hidroxilo seleccionado de acetilo, bencilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo y dimetoxitritilo, en los que un grupo protector de hidroxilo más preferido es T_1 es 4,4'-dimetoxitritilo.

10 En ciertas realizaciones, T_2 es un grupo de fósforo reactivo en el que los grupos de fósforo reactivos preferidos incluyen diisopropilcianoetoxi fosforoamidito y H-fosfonato. En ciertas realizaciones, T_1 es 4,4'-dimetoxitritilo y T_2 es diisopropilcianoetoxi fosforoamidito.

En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos tienen al menos un monómero de la fórmula:

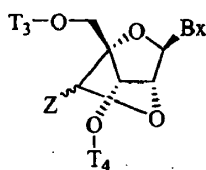


o de la fórmula:



15

o de la fórmula:



en las que

Bx es un resto de base heterocíclica;

20 T_3 es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo de unión internucleosídica unido a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad monomérica o un compuesto oligomérico;

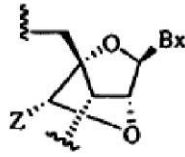
25 T_4 es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo de unión internucleosídica unido a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad monomérica o un compuesto oligomérico;

en las que al menos uno de T_3 y T_4 es un grupo de unión internucleosídica unido a un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleósido, un oligonucleótido, una subunidad monomérica o un compuesto oligomérico; y

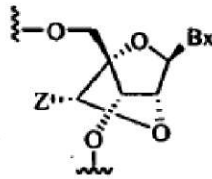
Z es alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆ sustituido, acilo, acilo sustituido o amida sustituida.

- En una realización, cada uno de los grupos sustituidos está, de forma independiente, mono o polisustituido con grupos sustituyentes opcionalmente protegidos seleccionados de forma independiente de halógeno, oxo, hidroxilo, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ y CN, en los que cada uno de J₁, J₂ y J₃ es, de forma independiente, H o alquilo C₁-C₆ y X es O, S o NJ₁.
- En una realización, cada uno de los grupos sustituidos está, de forma independiente, mono o polisustituido con grupos sustituyentes seleccionados de forma independiente de halógeno, oxo, hidroxilo, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁ y NJ₃C(=X)NJ₁J₂, en los que cada uno de J₁, J₂ y J₃ es, de forma independiente, H o alquilo C₁-C₆ y X es O o NJ₁.
- En ciertas de estas realizaciones, al menos un Z es alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido. En ciertas realizaciones, cada Z es, de forma independiente, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido. En ciertas realizaciones, al menos un Z es alquilo C₁-C₆. En ciertas realizaciones, cada Z es, de forma independiente, alquilo C₁-C₆. En ciertas realizaciones, al menos un Z es metilo. En ciertas realizaciones, cada Z es metilo. En ciertas realizaciones, al menos un Z es etilo. En ciertas realizaciones, cada Z es etilo. En ciertas realizaciones, al menos un Z es alquilo C₁-C₆ sustituido. En ciertas realizaciones, cada Z es, de forma independiente, alquilo C₁-C₆ sustituido. En ciertas realizaciones, al menos un Z es metilo sustituido. En ciertas realizaciones, cada Z es metilo sustituido. En ciertas realizaciones, al menos un Z es etilo sustituido. En ciertas realizaciones, cada Z es etilo sustituido.
- En ciertas realizaciones, al menos un grupo sustituyente es alcoxi C₁-C₆ (por ejemplo, al menos un Z es alquilo C₁-C₆ sustituido con uno o más alcoxi C₁-C₆). En otra realización, cada grupo sustituyente es, de forma independiente, alcoxi C₁-C₆ (por ejemplo, cada Z es, de forma independiente, alquilo C₁-C₆ sustituido con uno o más alcoxi C₁-C₆).
- En ciertas realizaciones, al menos un grupo sustituyente alcoxi C₁-C₆ es CH₃O- (por ejemplo, al menos un Z es CH₃OCH₂-). En otra realización, cada grupo sustituyente alcoxi C₁-C₆ es CH₃O- (por ejemplo, cada Z es CH₃OCH₂-).
- En ciertas realizaciones, al menos un grupo sustituyente es halógeno (por ejemplo, al menos un Z es alquilo C₁-C₆ sustituido con uno o más halógenos). En ciertas realizaciones, cada grupo sustituyente es, de forma independiente, halógeno (por ejemplo, cada Z es, de forma independiente, alquilo C₁-C₆ sustituido con uno o más halógenos). En ciertas realizaciones, al menos un grupo sustituyente halógeno es flúor (por ejemplo, al menos un Z es CH₂FCH₂-, CHF₂CH₂- o CF₃CH₂-). En ciertas realizaciones, cada grupo sustituyente halógeno es flúor (por ejemplo, cada Z es, de forma independiente, CH₂FCH₂-, CHF₂CH₂- o CF₃CH₂-).
- En ciertas realizaciones, al menos un grupo sustituyente es hidroxilo (por ejemplo, al menos un Z es alquilo C₁-C₆ sustituido con uno o más hidroxilos). En ciertas realizaciones, cada grupo sustituyente es, de forma independiente, hidroxilo (por ejemplo, cada Z es, de forma independiente, alquilo C₁-C₆ sustituido con uno o más hidroxilos). En ciertas realizaciones, al menos un Z es HOCH₂-. En otra realización, cada Z es HOCH₂-.
- En ciertas realizaciones, al menos un Z es CH₃-, CH₃CH₂-, CH₂OCH₃-, CH₂F- o HOCH₂-. En ciertas realizaciones, cada Z es, de forma independiente, CH₃-, CH₃CH₂-, CH₂OCH₃-, CH₂F- o HOCH₂-.
- En ciertas realizaciones, al menos un grupo Z es alquilo C₁-C₆ sustituido con uno o más X^x, en el que cada X^x es, de forma independiente, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ o CN; en los que cada uno de J₁, J₂ y J₃ es, de forma independiente, H o alquilo C₁-C₆ y X es O, S o NJ₁. En otra realización, al menos un grupo Z es alquilo C₁-C₆ sustituido con uno o más X^x, en el que cada X^x es, de forma independiente, halo (por ejemplo, flúor, alcoxi (por ejemplo, CH₃O-) o azido.
- En ciertas realizaciones, cada grupo Z es, de forma independiente, alquilo C₁-C₆ sustituido con uno o más X^x, en el que cada X^x es, de forma independiente, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ o CN; en los que cada uno de J₁, J₂ y J₃ es, de forma independiente, H o alquilo C₁-C₆ y X es O, S o NJ₁. En otra realización, cada grupo Z es, de forma independiente, alquilo C₁-C₆ sustituido con uno o más X^x, en el que cada X^x es, de forma independiente halo (por ejemplo, flúor), hidroxilo, alcoxi (por ejemplo, CH₃O-) o azido.
- En ciertas realizaciones, al menos un grupo Z es -CH₂X^x, en el que X^x es OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ o CN; en los que cada uno de J₁, J₂ y J₃ es, de forma independiente, H o alquilo C₁-C₆ y X es O, S o NJ₁. En ciertas realizaciones, al menos un grupo Z es CH₂X^x, en el que X^x es halo (por ejemplo, flúor), hidroxilo, alcoxi (por ejemplo, CH₃O-) o azido.
- En ciertas realizaciones, cada grupo Z es, de forma independiente, -CH₂X^x, en el que X^x es, de forma independiente, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ o CN; en los que cada uno de J₁, J₂ y J₃ es, de forma independiente, H o alquilo C₁-C₆ y X es O, S o NJ₁. En otra realización, cada grupo Z es, de forma independiente, CH₂X^x, en el que X^x es, de forma independiente, halo (por ejemplo, flúor), hidroxilo, alcoxi (por ejemplo, CH₃O-) o azido.
- En ciertas realizaciones, al menos un Z es CH₃-. En otra realización, cada Z es CH₃-.

En ciertas realizaciones, el grupo Z de al menos un monómero está en la configuración (*R*) representada por la fórmula:

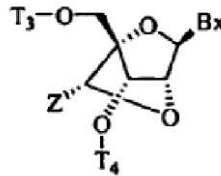


o la fórmula:



5

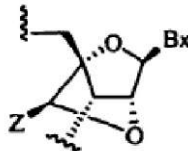
o la fórmula:



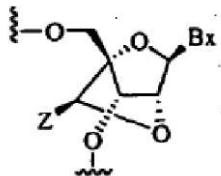
En ciertas realizaciones, el grupo Z de cada monómero de la fórmula está en la configuración (*R*).

En ciertas realizaciones, el grupo Z de al menos un monómero está en la configuración (*S*) representada por la fórmula:

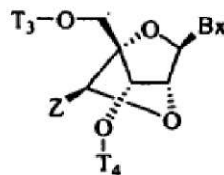
10



o la fórmula:



o la fórmula:



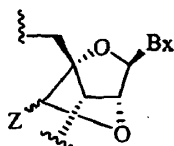
15

En ciertas realizaciones, el grupo Z de cada monómero de la fórmula está en la configuración (*S*).

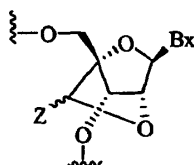
En ciertas realizaciones, cada T₃ es H o un grupo protector de hidroxilo. En ciertas realizaciones, cada T₄ es H o un grupo protector de hidroxilo. En una realización adicional, T₃ es un grupo de unión internucleosídica unido a un nucleósido, nucleótido o una subunidad monomérica. En ciertas realizaciones, T₄ es un grupo de unión

- internucleosídica unido a un nucleósido, nucleótido o una subunidad monomérica. En ciertas realizaciones, T₃ es un grupo de unión internucleosídica unido a un oligonucleósido o a un oligonucleótido. En ciertas realizaciones, T₄ es un grupo de unión internucleosídica unido a un oligonucleósido o a un oligonucleótido. En ciertas realizaciones, T₃ es un grupo de unión internucleosídica unido a un compuesto oligomérico. En ciertas realizaciones, T₄ es un grupo de unión internucleosídica unido a un compuesto oligomérico. En ciertas realizaciones, al menos uno de T₃ y T₄ comprende un grupo de unión internucleosídica seleccionado de fosfodiéster o fosforotioato.

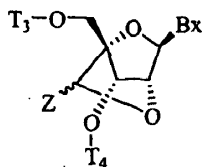
En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos tienen al menos una región de al menos dos monómeros contiguos de la fórmula:



- 10 o de la fórmula:



o de la fórmula:



- 15 En ciertas realizaciones, el compuesto oligomérico comprende al menos dos regiones de al menos dos monómeros contiguos de la fórmula anterior. En ciertas realizaciones, el compuesto oligomérico comprende un compuesto oligomérico con salto. En ciertas realizaciones, el compuesto oligomérico comprende al menos una región de alrededor de 8 a alrededor de 14 nucleósidos β-D-2'-desoxirribofuranosilo contiguos. En ciertas realizaciones, el compuesto oligomérico comprende al menos una región de alrededor de 9 a alrededor de 12 nucleósidos β-D-2'-desoxirribofuranosilo contiguos.
- 20 En ciertas realizaciones, los monómeros incluyen miméticos de azúcar. En ciertas de estas realizaciones, se usa un mimético en lugar del azúcar o de la combinación azúcar-unión internucleosídica, y la base nucleotídica se mantiene por hibridación a una diana seleccionada. Ejemplos representativos de miméticos de azúcar incluyen, pero no se limitan a, ciclohexenilo o morfolino. Ejemplos representativos de un mimético para una combinación de azúcar-unión internucleosídica incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) o grupos morfolino unidos por enlaces aquirales sin carga. En algunos casos se usa un mimético en lugar de la base nucleotídica. Miméticos de bases nucleotídicas representativos son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, análogos de fenoxacina tricíclica y bases universales (Berger et al., Nuc Acid Res. 2000, 28:2911-14). Los métodos para la síntesis de azúcar, nucleósidos y miméticos de bases nucleotídicas son bien conocidos para los expertos en la técnica.

30 3. Enlaces monoméricos

- Aquí se describen grupos ligadores que unen monómeros (incluidos, pero sin limitarse a, nucleósidos y nucleótidos modificados y no modificados), formando de este modo un compuesto oligomérico. Las dos clases principales de grupos de unión se definen por la presencia o ausencia de un átomo de fósforo. Enlaces representativos que contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a, fosforodiésteres (P=O), fosforotriésteres, metilfosfonatos, fosforoamidato y fosforotioatos (P=S). Grupos de unión que no contienen fósforo representativos incluyen, pero no se limitan a, metilmetilimino (-CH₂-N(CH₃)O-CH₂-), tiodiéster (-O-C(O)-S-), tionocarbamato (-O-C(O)(NH)-S-); siloxano (-O-Si(H)₂-O-); y N,N'-dimetilhidrazina (-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-). Los compuestos oligoméricos que tienen grupos de unión sin fósforo se denominan oligonucleósidos. Se pueden usar enlaces modificados, en comparación con los enlaces fosfodiéster naturales, para alterar, típicamente aumentar, la resistencia a la nucleasa del compuesto oligomérico. En ciertas realizaciones, se pueden preparar enlaces que tienen un átomo quiral, como mezclas racémicas en forma de enantiómeros separados. Enlaces quirales representativos incluyen, pero no se limitan a, alquilfosfonatos y fosforotioatos. Los métodos para la preparación de enlaces que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los compuestos oligoméricos descritos aquí contienen uno o más centros asimétricos y pueden, por tanto, dar lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras configuraciones estereoisoméricas que pueden definirse en términos de estereoquímica absoluta como (R) o (S), α o β , tal como para anómeros de azúcar, o como (D) o (L), tal como para aminoácidos. Incluidos en los compuestos antisentido proporcionados aquí están todos estos posibles isómeros, así como sus formas racémicas y ópticamente puras.

4. Compuestos oligoméricos

En ciertas realizaciones, se proporcionan aquí compuestos oligoméricos que tienen grupos de fósforo reactivos útiles para formar enlaces, incluyendo, por ejemplo, enlaces internucleosídicos fosfodiéster y fosforotioato. Los métodos de preparación y/o purificación de precursores o compuestos oligoméricos no son una limitación de las composiciones o métodos descritos aquí. Los métodos para la síntesis y purificación de compuestos oligoméricos, incluyendo ADN, ARN, oligonucleótidos, oligonucleósidos y compuestos antisentido son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En general, los compuestos oligoméricos comprenden una pluralidad de subunidades monoméricas unidas mediante grupos de unión. Ejemplos no limitantes de compuestos oligoméricos incluyen cebadores, sondas, compuestos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencias de guía externas (SGE), empalmadotes alternativos y ARNs. Como tales, estos compuestos se pueden introducir en forma monocatenaria, bicatenaria, circular, ramificada o en horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias o bucles. Compuestos oligoméricos bicatenarios pueden ser dos hebras hibridadas para formar compuestos bicatenarios o una sola hebra con suficiente autocomplementariedad para permitir la hibridación y la formación de un compuesto completamente o parcialmente bicatenario.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos oligoméricos quiméricos. En ciertas de estas realizaciones, los compuestos oligoméricos quiméricos son oligonucleótidos quiméricos. En ciertas de estas realizaciones, los oligonucleótidos quiméricos comprenden nucleótidos modificados de forma diferente. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos quiméricos son oligonucleótidos antisentido de estructura mixta.

En general, un compuesto oligomérico quimérico tendrá nucleósidos modificados que pueden estar en posiciones aisladas o agrupados en regiones que definirán un motivo concreto. Cualquier combinación de modificaciones y/o grupos miméticos puede comprender un compuesto oligomérico quimérico, tal como se describe aquí.

En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos quiméricos típicamente comprenden al menos una región modificada de modo que confieren un incremento de la resistencia a la degradación por nucleasas, incremento de la captación celular y/o incremento de la afinidad de unión por el ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, una región adicional del compuesto oligomérico puede servir como sustrato para las enzimas capaces de escindir ARN:ADN o híbridos ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex ARN:ADN. Por tanto, la activación de la RNasa H da lugar a la escisión del ARN diana, de modo que se potencia considerablemente la eficiencia de la inhibición de la expresión génica. En consecuencia, a menudo se pueden obtener resultados comparables con compuestos oligoméricos más cortos cuando se usan quimeras, en comparación con, por ejemplo, fosforotioato desoxi oligonucleótidos que hibridan con la misma región diana. La escisión del ARN diana se puede detectar de forma rutinaria mediante electroforesis en gel y, en caso necesario, técnicas asociadas de hibridación de ácidos nucleicos conocidas en la técnica.

En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos quiméricos son gápmers. En ciertas realizaciones, los compuestos quiméricos son compuestos antisentido cortos. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos son gápmers. En ciertas de estas realizaciones, un oligómero antisentido de estructura mixta tiene un tipo de enlace internucleotídico en una o ambas alas y un tipo diferente de enlaces internucleotídicos en el salto. En ciertas de estas realizaciones, el oligómero antisentido de estructura mixta tiene enlaces fosfodiéster en las alas y enlaces fosforotioato en el salto. En ciertas realizaciones en las que el enlace internucleotídico en un ala es diferente del enlace internucleotídico en el salto, el enlace internucleotídico que une dicha ala y el salto es el mismo que el enlace internucleotídico del ala. En ciertas realizaciones en las que el enlace internucleotídico en un ala es diferente del enlace internucleotídico en el salto, el enlace internucleotídico que une dicha ala y el salto es el mismo que el enlace internucleotídico del salto.

C. Ciertos compuestos antisentido cortos

Se describen aquí compuestos antisentido de 8 a 16, preferiblemente de 9 a 15, más preferiblemente de 9 a 14, más preferiblemente de 10 a 14 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen una longitud de 9 a 14 nucleótidos. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen una longitud de 10 a 14 nucleótidos. En ciertas realizaciones, dichos compuestos antisentido cortos son oligonucleotídicos antisentido cortos.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden una o más modificaciones químicas. En ciertas de estas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden al menos un nucleótido modificado. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden al menos dos o más nucleótidos modificados. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden al menos un enlace

internucleotídico modificado. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos son oligonucleótidos de estructura mixta. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos son oligonucleótidos quiméricos. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido cortos se modifican de forma uniforme. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido cortos comprenden modificaciones seleccionadas de forma independiente en cada base nucleotídica y en cada enlace.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos son gápmers cortos. En ciertas de estas realizaciones, los gápmers cortos comprenden al menos una modificación de alta afinidad en una o más alas del compuesto. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden de 1 a 3 modificaciones de alta afinidad en cada ala. En ciertas realizaciones, las modificaciones de alta afinidad de los compuestos antisentido cortos permiten una afinidad por la diana similar, o incluso mayor, a la afinidad por la diana de compuestos antisentido más largos. En ciertas realizaciones, los nucleótidos modificados de alta afinidad son nucleótidos modificados con azúcar. Dichos nucleótidos modificados con azúcar incluyen aquellos que comprenden un puente entre las posiciones 4' y 2' del azúcar. Las modificaciones de alta afinidad ejemplares incluyen, pero no se limitan a, BNA y otras modificaciones en 2', tal como 2'-MOE. En una realización alternativa de la invención, la modificación de alta afinidad no es un nucleótido modificado con azúcar 2'-O-(CH₂)_nH (n = 1-6). En una realización alternativa adicional, el nucleótido modificado de alta afinidad no es un nucleótido 2'-OCH₃ o un 2'-OCH₂CH₂OCH₃. En ciertas realizaciones, los nucleótidos modificados de alta afinidad confieren un T_m de al menos 1, al menos 1,5, al menos 2, al menos 2,5, al menos 3,0, al menos 3,5 o al menos 4,0 grados por nucleótido. En la técnica se sabe que algunas modificaciones nucleotídicas de alta afinidad aumentan la toxicidad. Como se muestra aquí, los compuestos antisentido cortos que tienen un número limitado (en general de 2 a 6) de modificaciones de alta afinidad muestran poco o ningún aumento de toxicidad, pero conservan o aumentan la afinidad por el ARN diana, al tiempo que también reducen significativamente la expresión del ARN diana. Los compuestos antisentido cortos de la invención pueden comprender, opcionalmente, un grupo conjugado, tal como, por ejemplo, colesterol o C₁₆.

1. Ciertas alas

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden un ala en 5' y/o un ala en 3'. En dichas realizaciones, las características del ala en 3' y las características del ala en 5' se seleccionan de forma independiente. Por tanto, en dichas realizaciones, el número de monómeros en el ala 5' y el número de monómeros (longitud) en el ala 3' pueden ser iguales o pueden ser diferentes; las modificaciones, si las hay, en el ala 5' pueden ser las mismas que las modificaciones, si las hay, en el ala 3', o dichas modificaciones, si las hay, pueden ser diferentes; y los enlaces monoméricos en el ala 5' y los enlaces monoméricos en el ala 3' pueden ser iguales o pueden ser diferentes.

En ciertas realizaciones, un ala comprende uno, dos o tres monómeros (es decir, tiene una longitud de 1, 2 ó 3). En ciertas realizaciones, los monómeros de un ala están modificados. En ciertas de tales realizaciones, los monómeros del ala están modificados para incrementar la afinidad del compuesto antisentido por su ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, los monómeros de un ala son nucleósidos o nucleótidos. En ciertas de tales realizaciones, los nucleósidos o nucleótidos del ala comprenden una modificación en 2'. En ciertas de tales realizaciones, los monómeros (nucleósidos o nucleótidos) del ala son BNA. En ciertas de tales realizaciones, los monómeros del ala se seleccionan de α-L-metilenoxi (4'-CH₂O-2') BNA, β-D-metilenoxi (4'-CH₂O-2') BNA, etilenoxi 4'-(CH₂)₂-O-2') BNA, aminooxi (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA y oxiamino (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA. En ciertas realizaciones, los monómeros de un ala comprenden un sustituyente en la posición 2' seleccionado de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C₁-C₁₀, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n) y O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), en los que cada R_m y R_n es, de forma independiente, H o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, los monómeros de un ala son nucleótidos 2'MOE.

En ciertas realizaciones, los enlaces monoméricos en un ala son enlaces internucleotídicos naturales. En ciertas realizaciones, los enlaces monoméricos en un ala son enlaces internucleotídicos no naturales o enlaces internucleosídicos. En ciertas de tales realizaciones, los enlaces monoméricos en el ala son más resistentes a una o más nucleasas que los enlaces internucleotídicos naturales. En ciertas de tales realizaciones, los enlaces monoméricos en el ala son enlaces fosforotioato (P=S). En ciertas realizaciones en las que un ala tiene más de un enlace monomérico, los enlaces monoméricos son iguales entre sí. En ciertas realizaciones en las que un ala tiene más de un enlace monomérico, los enlaces monoméricos son diferentes entre sí.

Un experto en la técnica reconocerá que las características y modificaciones tratadas anteriormente pueden usarse en cualquier combinación para preparar un ala. La tabla a continuación proporciona ejemplos no limitantes que muestran cómo se podría preparar un ala seleccionando un cierto número de monómeros, modificaciones monoméricas (si las hay) y enlaces monoméricos dentro del ala.

Longitud	Tipo de monómero/modificaciones	Enlaces monoméricos dentro del ala
1	2'MOE	Ninguno
1	BNA	Ninguno

1	Metilenoxi BNA	Ninguno
1	ENA	Ninguno
2	2'MOE	P=S
2	BNA	P=S
2	Metilenoxi BNA	P=S
2	ENA	P=S
2	2' MOE	P=O
2	BNA	P=O
2	Metilenoxi BNA	P=O
2	ENA	P=O
3	2' MOE	P=S
3	BNA	P=S
3	Metilenoxi BNA	P=S
3	ENA	P=S
3	2' MOE	P=O
3	BNA	P=O
3	Metilenoxi BNA	P=O
3	ENA	P=O

5 En ciertas realizaciones en las que un ala comprende dos, tres o cuatro monómeros, dichos dos, tres o cuatro monómeros comprenden todos ellos las mismas modificaciones, si las hay. En ciertas realizaciones en las que un ala comprende dos, tres o cuatro monómeros, una o más de dichas dos, tres o cuatro bases nucleotídicas comprenden una o más modificaciones que son diferentes de una o más de las modificaciones de uno o más del resto de los monómeros.

2. Ciertos saltos

10 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden un salto entre el ala en 5' y el ala en 3'. En ciertas realizaciones, el salto comprende cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce monómeros. En ciertas realizaciones, los monómeros del salto son desoxirribonucleótidos no modificados. En ciertas realizaciones, los monómeros del salto son ribonucleótidos no modificados. En ciertas realizaciones, las modificaciones del salto (si las hay) dan como resultado un compuesto antisentido que, cuando se une a su ácido nucleico diana, soporta la escisión por una RNasa, incluyendo, pero sin limitarse a, RNasa H.

15 En ciertas realizaciones, los enlaces monoméricos en el salto son enlaces internucleotídicos naturales. En ciertas realizaciones, los enlaces monoméricos en el salto son enlaces internucleotídicos no naturales. En ciertas de tales realizaciones, los enlaces monoméricos en el salto son más resistentes a una o más nucleasas que los enlaces internucleotídicos naturales. En ciertas de tales realizaciones, los enlaces monoméricos en el salto son enlaces fosforotioato (P=S). En ciertas realizaciones, los enlaces monoméricos en el salto son iguales entre sí. En ciertas realizaciones, los enlaces monoméricos en el salto no son todos iguales.

20 Un experto en la técnica reconocerá que las características y modificaciones tratadas anteriormente pueden usarse en cualquier combinación para preparar un salto. La tabla a continuación proporciona ejemplos no limitantes que muestran cómo se podría preparar un salto seleccionando un cierto número de monómeros, modificaciones monoméricas (si las hay) y enlaces monoméricos dentro de la región del salto.

Longitud	Tipo de monómero/modificaciones	Enlaces monoméricos dentro del salto
5	ADN	P=S
6	ADN	P=S
7	ADN	P=S
8	ADN	P=S
9	ADN	P=S
10	ADN	P=S
11	ADN	P=S
12	ADN	P=S
13	ADN	P=S
14	ADN	P=S
6	ADN	P=O
7	ADN	P=O
8	ADN	P=O
9	ADN	P=O
10	ADN	P=O
11	ADN	P=O
12	ADN	P=O
8	ARN	P=S
9	ARN	P=S
10	ARN	P=S
11	ARN	P=S
12	ARN	P=S

3. Ciertos compuestos oligoméricos antisentido con saltos

5 Un experto normal en la técnica reconocerá que se pueden seleccionar las alas y los saltos tratados anteriormente y después combinar en diversas combinaciones para generar compuestos oligoméricos con saltos, incluyendo, pero sin limitarse a, compuestos oligoméricos antisentido con saltos y oligonucleótidos antisentido con saltos. Las características (longitud, modificaciones, enlaces) del ala en 5' y del ala en 3' pueden seleccionarse de forma independiente entre sí. Las características del salto incluyen al menos una diferencia en la modificación en comparación con las características del ala en 5' y al menos una diferencia en comparación con las características del ala en 3' (es decir, debe haber al menos una diferencia en la modificación entre regiones adyacentes para distinguir dichas regiones adyacentes entre sí). Las características del salto pueden, por otro lado, seleccionarse de forma independiente.

15 En ciertas realizaciones, los enlaces monoméricos en un ala y los enlaces monoméricos dentro del salto son iguales. En ciertas realizaciones, los enlaces monoméricos en un ala y los enlaces monoméricos dentro del salto son diferentes. En ciertas de tales realizaciones, el enlace monomérico que une el ala y el salto es igual que los enlaces monoméricos dentro del ala. En ciertas realizaciones, el enlace monomérico que une el ala y el salto es igual que los enlaces monoméricos dentro del salto. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen enlaces

uniformes a lo largo del compuesto. En ciertas de tales realizaciones, todos los enlaces son enlaces fosforotioato (P=S).

- 5 Un experto normal en la técnica reconocerá que las alas en 3', las alas en 5', los saltos y los enlaces tratados anteriormente pueden usarse en cualquier combinación para preparar un gápmero. La tabla a continuación proporciona ejemplos no limitantes que muestran cómo se podría preparar un gápmero seleccionando un cierto número de ala en 5', un salto, un ala en 3' y ciertos enlaces que unen el salto y cada ala.

Ala en 5'			Puente en 5' salto				Puente en 3'	Ala en 3'		
Longitud	Monómero	Enlace	Enlace	Longitud	Monómero	Enlace	Enlace	Longitud	Monómero	Enlace
2	MOE	P=S	P=S	6	ADN	P=S	P=S	2	MOE	P=S
2	BNA	P=S	P=O	8	ADN	P=O	P=S	3	BNA	P=S
1	MOE	Ninguno	P=S	10	ADN	P=S	P=S	1	MOE	P=S
2	MOE	P=S	P=S	8	ARN	P=S	P=S	2	MOE	P=S
3	Metilenoxi BNA	P=S	P=S	8	ARN	P=S	P=S	3	MOE	P=S
3	ADN	P=O	P=O	10	ARN	P=S	P=O	3	2'OH	P=O
2	2-F	P=S	P=S	5	ARN	P=S	P=S	2	2'-F	P=S
1	MOE	P=O	P=S	5	ADN	P=O	P=S	4	MOE	P=S

- 10 En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos descritos aquí pueden comprender de alrededor de 8 a alrededor de 16, preferiblemente de 9 a 15, más preferiblemente de 9 a 14, más preferiblemente de 10 a 14 monómeros (es decir, de alrededor de 8 a alrededor de 16 monómeros unidos). Un experto normal en la técnica apreciará que esto comprende compuestos antisentido de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 bases nucleotídicas. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son compuestos antisentido.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen 8 bases nucleotídicas de longitud.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen 9 bases nucleotídicas de longitud.

- 15 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen 10 bases nucleotídicas de longitud.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen 11 bases nucleotídicas de longitud.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen 12 bases nucleotídicas de longitud.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen 13 bases nucleotídicas de longitud.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen 14 bases nucleotídicas de longitud.

- 20 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen 15 bases nucleotídicas de longitud.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen 16 bases nucleotídicas de longitud.

- 25 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen 8 monómeros de longitud. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen 9 monómeros de longitud. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen 10 monómeros de longitud. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen 11 monómeros de longitud. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen monómeros de longitud. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen 13 monómeros de longitud. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen 14 monómeros de longitud. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen 15 monómeros de longitud. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen 16 monómeros de longitud. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden 9 a 15 monómeros. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden 10 a 15 monómeros. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden 12 a 14 monómeros. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden 12 a 14 nucleótidos o nucleósidos.

- 35 Un experto en la técnica e informado de los compuestos antisentido cortos ilustrados aquí podrá identificar sin experimentación adicional otros compuestos antisentido cortos.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden un salto flanqueado por más de un ala tanto en uno como en ambos lados. Por tanto, en ciertas realizaciones, un compuesto antisentido corto comprende dos o más alas en 5' y dos o más alas en 3'. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido corto comprende un ala en 5' y dos o más alas en 3'. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido corto comprende un ala en 3' y dos o más alas en 5'. Ciertas de tales realizaciones comprenden, por ejemplo, las regiones siguientes: un primer ala en 5'-un puente - un segundo ala en 5'- un puente - un salto - un puente - un segundo ala en 3' - un puente - un primer ala en 3'. En dichas realizaciones, cada región tiene al menos una diferencia en la modificación cuando se compara con su región adyacente. Por tanto, en dichas realizaciones, el segundo ala en 5' y el segundo ala en 3' comprenden, cada uno de forma independiente, una o más diferencias en la modificación cuando se compara con el salto y cuando se compara con el primer ala en 5' y con el primer ala en 3'. En dichas realizaciones, las modificaciones del primer ala en 3' y del primer ala en 5' pueden ser, cada una o ambas, iguales o diferentes de las modificaciones del salto, si las hay.

4. Ciertos grupos conjugados

En un aspecto, los compuestos oligoméricos están modificados mediante unión covalente de uno o más grupos conjugados. En general, los grupos conjugados modifican una o más propiedades del compuesto oligomérico unido incluyendo, pero sin limitarse a, farmacodinámica, farmacocinética, unión, absorción, distribución celular, captación celular, carga y aclaramiento. Los grupos conjugados se usan rutinariamente en las técnicas químicas y están unidos directamente o mediante un resto de unión o grupo de unión opcional a un compuesto parental, tal como un compuesto oligomérico. Una lista preferida de grupos conjugados incluye, sin limitaciones, intercalantes, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, tioéteres, poliésteres, colesteroles, tiocolesteroles, restos de ácido cólico, folato, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, fenantridina, antraquinona, adamantano, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y pigmentos.

Grupos conjugados preferidos en la presente invención incluyen restos lipídicos, tales como un resto colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553); ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053); un tioéter, por ejemplo hexil-S-tritilol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765); un tiocolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533); una cadena alifática, por ejemplo residuos de dodecanodiol o undecilo (Saison-Hehmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 111; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49); un fosfolípido, por ejemplo, dihexadecil-rac-glicerol o trietilamonio-1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777); una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969); ácido adamantano acético (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651); un resto palmitilo (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229); o u resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Croke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923).

Grupos de unión o restos de unión bifuncionales, tales como los conocidos en la técnica, son adecuados para los compuestos proporcionados aquí. Los grupos de unión son útiles para la unión de grupos químicos funcionales, grupos conjugados, grupos indicadores y otros grupos para sitios selectivos en un compuesto parental, tal como, por ejemplo, un compuesto oligomérico. En general, un resto de unión bifuncional comprende un resto hidrocarbilo que tiene dos grupos funcionales. Uno de los grupos funcionales se selecciona de modo que se una a una molécula parental o compuesto de interés y el otro se selecciona de modo que se una esencialmente a cualquier grupo seleccionado, tal como un grupo químico funcional o un grupo conjugado. En algunas realizaciones, el ligador comprende una estructura de cadena o un oligómero de unidades repetidas, tales como unidades de etilenglicol o aminoácido. Ejemplos de grupos funcionales que se usan de forma rutinaria en un resto de unión bifuncional incluyen, pero no se limitan a, electrófilos para reaccionar con grupos nucleófilos y nucleófilos para reaccionar con grupos electrófilos. En algunas realizaciones, restos de unión bifuncionales incluyen amino, hidroxilo, ácido carboxílico, tiol, insaturaciones (por ejemplo, dobles o triples enlaces) y similares. Algunos ejemplos no limitantes de restos de unión bifuncionales incluyen ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) y ácido 6-aminohexanoico (AHX o AHA). Otros grupos de unión incluyen, pero no se limitan a, alquilo C₁-C₁₀ sustituido, alqueno C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido o alquino C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, en los que una lista no limitante de grupos sustituyentes preferidos incluyen hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alqueno y alquino.

5. Síntesis, purificación y análisis

La oligomerización de nucleósidos y nucleótidos modificados y no modificados se puede realizar de forma rutinaria de acuerdo con los procedimientos de la bibliografía ADN (Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Ed. Agrawal (1993), Humana Press) y/o ARN (Scaringe, Methods (2001), 23, 206-217. Gait et al., Applications of Chemically synthesized RNA in RNA: Protein Interactions, Ed. Smith (1998), 1-36. Gallo et al., Tetrahedron (2001), 57, 5707-5713).

Los compuestos oligoméricos proporcionados aquí pueden obtenerse de forma conveniente y rutinaria a través de la técnica bien conocida de la síntesis en fase sólida. El equipo para dicha síntesis se comercializa mediante diferentes proveedores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). También se puede emplear

adicionalmente o como alternativa cualquier otro medio para dicha síntesis. Es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como fosforotioatos y derivados alquilados. La invención no está limitada por el método de la síntesis de compuestos antisentido.

5 Los expertos en la técnica conocen métodos de purificación y análisis de compuestos oligoméricos. Los métodos de análisis incluyen electroforesis capilar (EC) y espectroscopía de masas por electropulverización. Dichos métodos de síntesis y análisis pueden realizarse en placas de múltiples pocillos. El método de la invención no está limitado por el método de la purificación de oligómeros.

D. Antisentido

10 Los mecanismos antisentido son todos aquellos que implican la hibridación de un compuesto con un ácido nucleico diana, en los que el resultado o efecto de la hibridación es la degradación de la diana o la ocupación de la diana con la detención de la maquinaria celular que implica, por ejemplo, transcripción o corte y empalme.

15 Un tipo de mecanismo antisentido que implica la degradación de la diana incluye una RNasa H. La RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex ARN:ADN. En la técnica se sabe que los compuestos antisentido monocatenarios que son "similares a ADN" provocan actividad de RNasa H en células de mamífero. Por tanto, la activación de la RNasa H da como resultado la escisión del ARN diana, de modo que se potencia considerablemente la eficiencia de la inhibición de la expresión génica mediada por oligonucleótidos similares a ADN.

20 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido modificados químicamente tienen una afinidad mayor por los ARN diana que los ADN no modificados. En ciertas de tales realizaciones, dicha afinidad mayor proporciona a su vez mayor potencia, lo que permite la administración de dosis menores de dichos compuestos, menor potencial de toxicidad y mejora del índice terapéutico y menores costes globales de la terapia.

25 La presente descripción demuestra que la incorporación de nucleótidos y nucleósidos de alta afinidad químicamente modificados en compuestos antisentido permite el diseño de compuestos antisentido cortos de una longitud de 8-16 bases nucleotídicas útiles para la reducción de los ARN diana y/o las proteínas diana en células, tejidos y animales, incluyendo, pero sin limitarse a, seres humanos con mayor potencia y mejor índice terapéutico. Por tanto, en ciertas realizaciones, se describen aquí compuestos antisentido cortos que comprenden modificaciones en nucleótidos de alta afinidad útiles para reducir un ARN diana *in vivo*. Ciertos de tales compuestos antisentido cortos son eficaces a dosis menores que los compuestos antisentido descritos anteriormente, lo que permite una reducción de la toxicidad y los costes de tratamiento. Además, ciertos compuestos antisentido cortos tienen mayor potencial para dosificación oral.

30 Para abordar la necesidad de compuestos antisentido más potentes, aquí se describen compuestos antisentido cortos (de 8 a 16, preferiblemente de 9 a 15, más preferiblemente de 9 a 14, más preferiblemente de 10 a 14 nucleótidos de longitud) con mayor actividad *in vivo* respecto a los compuestos más largos. Ciertos compuestos antisentido cortos son compuestos gámperos que comprenden nucleósidos químicamente modificados de alta afinidad en los extremos 3' y 5' (alas) del compuesto. En ciertas realizaciones, la adición de nucleótidos modificados de alta afinidad permite que los compuestos antisentido sean activos, o específicos para, su ARN diana objetivo *in vivo* a pesar de tener una longitud más corta. Aquí se contemplan compuestos antisentido en los que cada una de las alas comprende de forma independiente de 1 a 3 nucleótidos modificados de alta afinidad. En ciertas realizaciones, las modificaciones de alta afinidad son modificaciones de azúcar. Los nucleótidos modificados de alta afinidad incluyen, pero no se limitan a, BNA u otros nucleótidos modificados en 2', tales como nucleótidos 2'-MOE. También se contemplan compuestos antisentido cortos que tienen al menos un enlace internucleotídico modificado, tal como un enlace internucleotídico fosforotioato. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos de la presente invención pueden tener todos los enlaces internucleosídicos de fosforotioato. Los compuestos antisentido cortos comprenden, opcionalmente, un grupo conjugado. Como se muestra aquí, los compuestos antisentido cortos tienen mayor afinidad por ARN diana que por ADN, y son significativamente más potentes *in vivo*, como se demuestra mediante la reducción del ARNm diana así como la mejora de una diversidad de indicaciones de enfermedad.

35 Como se usa aquí, un ARN que está implicado en la regulación del metabolismo o aclaramiento de la glucosa, el metabolismo de los lípidos, el metabolismo del colesterol o el metabolismo de la insulina es cualquier ARN implicado en las vías bioquímicas que regulan estos procesos. Dichos ARN son bien conocidos en la técnica.

1. Modulación de la expresión diana

40 En ciertas realizaciones, se identifica una diana y se diseñan oligonucleótidos antisentido para modular dicha diana o su expresión. En ciertas realizaciones, el diseño de un compuesto oligomérico para una molécula de ácido nucleico diana puede ser un procedimiento de múltiples etapas. Típicamente, el procedimiento comienza con la identificación de una proteína diana cuya actividad se tiene que modular y, después identificando el ácido nucleico cuya expresión produce la proteína diana. En ciertas realizaciones, el diseño de un compuesto antisentido da como resultado un compuesto antisentido que se puede hibridar con la molécula de ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido o un oligonucleósido antisentido. En ciertas realizaciones,

un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana son complementarios entre sí. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido es perfectamente complementario de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido incluye un apareamiento erróneo. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido incluye dos apareamientos erróneos. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido incluye tres o más apareamientos erróneos.

La modulación de la expresión de un ácido nucleico diana se puede conseguir mediante la alteración de cualquier número de funciones del ácido nucleico. En ciertas realizaciones, las funciones del ARN que se van a modular incluyen, pero no se limitan a, funciones de translocación, que incluyen, pero no se limitan a, translocación del ARN a un sitio de traducción de proteínas, translocación del ARN a sitios dentro de la célula que están lejos del sitio de la síntesis de ARN, y traducción de proteínas a partir del ARN. Las funciones de procesamiento de ARN que se pueden modular incluyen, pero no se limitan a, corte y empalme del ARN para dar una o más especies de ARN, tapar los extremos del ARN, maduración en 3' del ARN y actividad catalítica o formación de complejos que implican al ARN que se pueden unir o ser facilitados por el ARN. La modulación de la expresión puede dar como resultado el incremento de los niveles de una o más especies de ácido nucleico o la disminución de los niveles de una o más especies de ácido nucleico, bien temporalmente o a un nivel neto en equilibrio. Por tanto, en una realización, modulación de la expresión puede significar aumentar o disminuir los niveles de ARN o de proteínas dianas. En otra realización, modulación de la expresión puede significar aumentar o disminuir uno o más productos de corte y empalme del ARN o un cambio en la proporción de dos o más productos de corte y empalme.

En ciertas realizaciones, la expresión de un gen diana se modula usando un compuesto oligomérico que comprende de alrededor de 8 a alrededor de 16, preferiblemente de 9 a 15, más preferiblemente de 9 a 14, más preferiblemente de 10 a 14 monómeros (es decir, de alrededor de 8 a alrededor de 16 monómeros unidos). Un experto normal en la técnica apreciará que esto comprende métodos de modulación de la expresión de un gen diana usando uno o más compuestos antisentido de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 bases nucleotídicas.

En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de un gen diana comprenden usar un compuesto antisentido corto que tiene 8 bases nucleotídicas de longitud. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de un gen diana comprenden usar un compuesto antisentido corto que tiene 9 bases nucleotídicas de longitud. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de un gen diana comprenden usar un compuesto antisentido corto que tiene 8 bases nucleotídicas de longitud. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de un gen diana comprenden usar un compuesto antisentido corto que tiene 10 bases nucleotídicas de longitud. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de un gen diana comprenden usar un compuesto antisentido corto que tiene 11 bases nucleotídicas de longitud. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de un gen diana comprenden usar un compuesto antisentido corto que tiene 12 bases nucleotídicas de longitud. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de un gen diana comprenden usar un compuesto antisentido corto que tiene 13 bases nucleotídicas de longitud. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de un gen diana comprenden usar un compuesto antisentido corto que tiene 14 bases nucleotídicas de longitud. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de un gen diana comprenden usar un compuesto antisentido corto que tiene 15 bases nucleotídicas de longitud. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de un gen diana comprenden usar un compuesto antisentido corto que tiene 16 bases nucleotídicas de longitud.

En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de la expresión de un gen diana comprenden el uso de un compuesto antisentido corto que comprende de 9 a 15 monómeros. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de la expresión de un gen diana comprenden el uso de un compuesto antisentido corto que comprende de 10 a 15 monómeros. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de la expresión de un gen diana comprenden el uso de un compuesto antisentido corto que comprende de 12 a 14 monómeros. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de la expresión de un gen diana comprenden el uso de un compuesto antisentido corto que comprende 12 ó 14 nucleótidos o nucleósidos.

2. Hibridación

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido hibridan específicamente cuando hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido con secuencias de un ácido nucleico no diana en condiciones en las que se desea unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de los ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en las condiciones en las que se realizan los ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

Como se usa aquí, "condiciones rigurosas de hibridación" o "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones en las cuales un compuesto antisentido hibrida con su secuencia diana pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes y las "condiciones rigurosas" en las que los compuestos antisentido hibridan con una secuencia diana vienen determinadas por la naturaleza y la composición de los compuestos antisentido y de los ensayos en los que se están investigando.

3. Complementariedad

En la técnica se entiende que la incorporación de modificaciones de afinidad en el nucleótido puede hacer que se produzca un mayor número de apareamientos erróneos en comparación con un compuesto no modificado. De forma similar, ciertas secuencias oligonucleotídicas pueden ser más tolerantes a los apareamientos erróneos que otras secuencias oligonucleotídicas. Un experto normal en la técnica es capaz de determinar un número adecuado de apareamientos erróneos entre oligonucleótidos o entre un oligonucleótido y un ácido nucleico diana, tal como mediante la determinación de la temperatura de fusión (T_m). T_m o T_m se pueden calcular mediante técnicas familiares para un experto normal en la técnica. Por ejemplo, las técnicas descritas en Freier et al. (Nucleic Acids Research, 1997, 25, 22: 4429-4443) permiten a un experto normal en la técnica evaluar en las modificaciones nucleotídicas su capacidad para incrementar la temperatura de fusión de un dúplex ARN:ADN.

4. Identidad

Los compuestos antisentido, o una porción de los mismos, pueden tener un porcentaje definido de identidad con una SEC ID NO o un compuesto que tenga un número Isis específico. Como se usa aquí, una secuencia es idéntica a la secuencia descrita aquí si tiene la misma capacidad de apareamiento de bases nucleotídicas. Por ejemplo, un ARN que contiene uracilo en lugar de timidina en las secuencias descritas de los compuestos descritos aquí se consideraría idéntico, ya que ambos se aparearían con adenina. Esta identidad puede estar a lo largo de toda la longitud del compuesto oligomérico, o en una porción del compuesto antisentido (por ejemplo, las bases nucleotídicas 1-20 de un 27-mero pueden compararse con un 20-mero para determinar el porcentaje de identidad del compuesto oligomérico con la SEC ID NO. Los expertos en la técnica entienden que un compuesto antisentido no tiene que tener una secuencia idéntica a la de los descritos aquí para funcionar de un modo similar al compuesto antisentido descrito aquí. Aquí también se proporcionan versiones más cortas de los compuestos antisentido enseñados aquí o versiones no idénticas de los compuestos antisentido enseñados aquí. Las versiones no idénticas son aquellas en las que cada base no tiene la misma actividad de apareamiento que los compuestos antisentido descritos aquí. Las bases no tienen la misma actividad de apareamiento por ser más cortas o por tener al menos un sitio abásico. Como alternativa, una versión no idéntica puede incluir al menos una base sustituida con una base diferente con distinta actividad de apareamiento (por ejemplo, G se puede sustituir por C, A o T). El porcentaje de identidad se calcula de acuerdo con el número de bases que tienen idéntico apareamiento de bases correspondiente a la SEC ID NO o al compuesto antisentido con el que se está comparando. Las bases no idénticas pueden estar adyacentes entre sí, dispersas por el oligonucleótido o ambas cosas.

Por ejemplo, un 16-mero que tiene la misma secuencia que las bases nucleotídicas 2-17 de un 20-mero es un 80% idéntico al 20-mero. Como alternativa, un 20-mero que contiene cuatro bases nucleotídicas no idénticas al 20-mero es también un 80% idéntico al 20-mero. Un 14-mero que tiene la misma secuencia que las bases nucleotídicas 1-14 de un 18-mero es un 78% idéntico al 18-mero. Dichos cálculos entran dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

El porcentaje de identidad se basa en el porcentaje de bases nucleotídicas en la secuencia original presentes en una porción de la secuencia modificada. Por tanto, un compuesto antisentido de 30 bases nucleotídicas que comprende la secuencia completa de la complementaria de un segmento diana activo de 20 bases nucleotídicas tendría una porción de identidad del 100% con el complementario del segmento diana activo de 20 bases nucleotídicas, al tiempo que además comprende una porción adicional de 10 bases nucleotídicas. En el contexto de la presente descripción, el complementario de un segmento diana activo puede constituir una única porción. En realizaciones preferidas, los oligonucleótidos proporcionados aquí son al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% idénticos a al menos una porción del complementario de los segmentos diana activos presentados aquí.

E. Ácidos nucleicos, regiones y segmentos diana

El ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que codifica ApoB. Las moléculas de ácido nucleico que codifican ApoB incluyen, sin limitaciones, SEC ID NO 1 y SEC ID NO: 2 que codifican ApoB humano y de ratón (NM_000384.1) y XM_137955.5).

El procedimiento de apuntar a una diana incluye la determinación de al menos una región, segmento o sitio diana dentro del ácido nucleico diana para que se produzca la interacción antisentido de modo que dé como resultado el efecto deseado.

En ciertas realizaciones, el nucleótido más en 5' de una región diana es el sitio diana en 5' de un compuesto antisentido corto, y el nucleótido más en 3' de una región diana es el sitio diana en 3' del mismo compuesto antisentido corto. En ciertas realizaciones, el nucleótido más en 5' de una región diana es el sitio diana en 5' de un compuesto antisentido corto, y el nucleótido más en 3' de una región diana es el sitio diana en 3' de un compuesto antisentido corto diferente. En ciertas realizaciones, una región diana comprende una secuencia nucleotídica dentro de 10, 15 ó 20 nucleótidos de un sitio diana en 5' o un sitio diana en 3'.

En ciertas realizaciones, una región diana es una región estructuralmente definida del ácido nucleico. Por ejemplo, en ciertas de tales realizaciones, una región diana puede abarcar una 3' UTR, una 5' UTR, un exón, un intrón, una

región codificadora, una región de inicio de la traducción, una región de terminación de la traducción u otra región de ácido nucleico definida.

5 Las localizaciones sobre el ácido nucleico diana definido por tener uno o más compuestos antisentido cortos activos diana se denominan "segmentos diana activos". En ciertas realizaciones, el ácido nucleico diana que tiene uno o más compuestos antisentido cortos activos diana es ARN diana. Cuando un segmento diana activo se define por múltiples compuestos antisentido cortos, los compuestos están separados preferiblemente por no más de alrededor de 10 nucleótidos sobre la secuencia diana, más preferiblemente no más de alrededor de 5 nucleótidos sobre la secuencia diana, incluso más preferiblemente los compuestos antisentido cortos son contiguos, más preferiblemente los compuestos antisentido cortos se solapan. Puede haber una considerable variación de la actividad (por ejemplo, definida por el porcentaje de inhibición) de los compuestos antisentido cortos dentro de un segmento diana activo. 10 Los compuestos antisentido cortos activos son aquellos que modulan la expresión de su ácido nucleico diana, incluyendo, pero sin limitarse a, un ARN diana. Los compuestos antisentido cortos activos inhiben la expresión de su ARN diana al menos un 10%, preferiblemente un 20%. En una realización preferida, al menos alrededor del 50%, preferiblemente alrededor del 70% de los compuestos antisentido cortos dirigidos al segmento diana activo modulan la expresión de su ARN diana al menos un 40%. En una realización más preferida, el nivel de inhibición requerido para definir un compuesto antisentido corto activo se define en base a los resultados del cribado usado para definir los segmentos diana activos. 15

Un segmento diana adecuado es una porción de al menos alrededor de 8 bases nucleotídicas de una región diana a la que está dirigido un compuesto antisentido corto activo. Los segmentos diana pueden incluir secuencias de ADN o 20 ARN que comprenden al menos las 8 bases nucleotídicas consecutivas desde el extremo 5' de uno de los segmentos diana ilustrativos (siendo las bases nucleotídicas restantes una tira consecutiva del mismo ADN o ARN comenzando inmediatamente antes del extremo 5' del segmento diana y continuando hasta que el ADN o ARN comprende de alrededor de 8 a alrededor de 16 bases nucleotídicas). Los segmentos diana también están representados por secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos las 8 bases nucleotídicas consecutivas desde el extremo 3' de uno de los segmentos diana ilustrativos (siendo las bases nucleotídicas restantes una tira consecutiva del mismo ADN o ARN comenzando inmediatamente después del extremo 3' del segmento diana y continuando hasta que el ADN o ARN comprende de alrededor de 8 a alrededor de 16 bases nucleotídicas). Se entiende también que los segmentos diana antisentido se pueden representar por secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos 8 bases nucleotídicas consecutivas de una porción interna de la secuencia de un segmento 30 diana ilustrativo y pueden extenderse en una o ambas direcciones hasta que el compuesto antisentido corto comprende de alrededor de 8 a alrededor de 16 bases nucleotídicas. Un experto en la técnica armado con los segmentos diana ilustrados aquí podrá, sin experimentación indebida, identificar otros segmentos diana.

Una vez que se han identificado una o más regiones, segmentos o sitios diana, se escogen los compuestos antisentido cortos que son suficientemente complementarios a la diana, es decir hibridan suficientemente bien y con suficiente especificidad, para dar el efecto deseado. 35

Los compuestos antisentido cortos también pueden estar dirigidos a regiones de la secuencia de bases nucleotídicas diana que comprende cualquier base nucleotídica consecutiva de 8 a 16 bases nucleotídicas de longitud a lo largo de la molécula de ácido nucleico diana.

Los segmentos diana de 8 a 16 bases nucleotídicas de longitud que comprenden una tira de al menos ocho (8) 40 bases nucleotídicas consecutivas seleccionadas del interior de los segmentos diana ilustrativos también se consideran adecuados como diana. Por tanto, los compuestos antisentido cortos también pueden abarcar 8-16 bases nucleotídicas con los segmentos identificados aquí comenzando en un sitio diana en 5' concreto. Cualquier segmento de 8, 9, 10, 11, o, más preferiblemente, de 12, 13, 14, 15 o 16 bases nucleotídicas contiguas en un perímetro de 50, preferiblemente 25, más preferiblemente 16 bases nucleotídicas alrededor de estas regiones 45 también se consideran adecuados como diana.

En una realización adicional, los "segmentos diana adecuados" identificados aquí se pueden emplear en una criba para compuestos antisentido cortos adicionales que modulan la expresión de un ácido nucleico diana. "Moduladores" son los compuestos que disminuyen o incrementan la expresión de un ácido nucleico diana y que comprenden al menos una porción de 8 bases nucleotídicas que es complementaria a un segmento diana. El método de criba 50 comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana de un ácido nucleico con uno o más moduladores candidatos y seleccionar uno o más moduladores candidatos que disminuyan o incrementen la expresión de un ácido nucleico diana. Una vez que se ha demostrado que el modulador o moduladores candidatos diana son capaces de modular (por ejemplo, disminuir o aumentar) la expresión de un ácido nucleico diana, el modulador puede emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de la diana, o para usar como agente de investigación, diagnóstico o terapéutico de acuerdo con la presente descripción. 55

Para todos los compuestos antisentido cortos tratados aquí, secuencia, monómero, modificación monomérica y enlace monomérico pueden, cada uno, seleccionarse de forma independiente. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos están descritos con un motivo. En dichas realizaciones, cualquier motivo puede usarse con cualquier secuencia, se describan específicamente aquí o no, la secuencia y/o el motivo. En ciertas 60 realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden modificaciones que no son adecuados para describir

con un motivo (por ejemplo, los compuestos antisentido cortos que comprenden varias modificaciones y/o enlaces diferentes en varias posiciones a lo largo del compuesto). Dichas combinaciones se pueden incorporar para cualquier secuencia, se describa o no aquí. El listado de secuencias que acompaña a esta presentación proporciona ciertas secuencias de ácido nucleico independientes de la modificación química. Aunque dicho listado identifica cada secuencia como "ARN" o "ADN", según se requiera, en realidad dichas secuencias pueden modificarse con cualquier combinación de modificaciones químicas y/o motivos.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos comprenden al menos un monómero modificado de alta afinidad. En ciertas realizaciones se proporcionan compuestos antisentido cortos dirigidos a moléculas de ácido nucleico que codifican ApoB-100 (también conocida como APOB; antígeno Ag(x); apoB-48; apolipoproteína B; apolipoproteína B-100; apolipoproteína B-48).

F. Ciertas dianas

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos pueden diseñarse de modo que modulen cualquier diana. En ciertas realizaciones, la diana es clínicamente relevante. En dichas realizaciones, la modulación de la diana da como resultado un beneficio clínico. Ciertas dianas se expresan, preferentemente, en el riñón. Ciertas dianas se expresan, preferiblemente, en el hígado. Ciertas dianas se asocian con un trastorno metabólico. Ciertas dianas se asocian con un trastorno cardiovascular. En ciertas realizaciones, la diana es ApoB.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos exhiben *in vivo* una reducción del ARN diana específico del riñón y del hígado. Dicha propiedad convierte a dichos compuestos antisentido cortos en particularmente útiles para la inhibición de muchos ARN diana implicados en enfermedades metabólicas y cardiovasculares. Por tanto, se describen aquí métodos para tratar trastornos metabólicos y cardiovasculares poniendo en contacto dichos tejidos renales o hepáticos con compuestos antisentido cortos dirigidos a ARN asociados con dichos trastornos. Por tanto, aquí también se describen métodos para mejorar cualquiera de diversas indicaciones de enfermedad metabólica o cardiovascular con los compuestos antisentido cortos de la presente descripción.

1. ApoB

La ApoB (también conocida como apolipoproteína B-100; ApoB-100, apolipoproteína B-48; ApoB-48 y antígeno Ag(x)) es una glucoproteína grande que desempeña un papel indispensable en el ensamblaje y secreción de lípidos y en el transporte y captación mediada por receptor y liberación de distintas clases de lipoproteínas. La ApoB realiza diversas actividades, desde la absorción y procesamiento de lípidos de la dieta hasta la regulación de los niveles circulantes de lipoproteína (Davidson y Shelness, *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20, 169-193). Esta última propiedad destaca su relevancia en términos de susceptibilidad a la aterosclerosis, que se correlaciona considerablemente con la concentración ambiental de lipoproteínas que contienen ApoB (Davidson y Shelness, *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20, 169-193). La ApoB-100 es el principal componente proteico de LDL-C y contiene el dominio requerido para la interacción de esta especie de lipoproteína con el receptor de LDL. Los niveles elevados de LDL-C son un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular, incluida la aterosclerosis.

35 Definiciones

La "ApoB" es el producto génico o proteína cuya expresión se va a modular mediante la administración de un compuesto antisentido corto.

"Ácido nucleico de ApoB" significa cualquier ácido nucleico que codifica la ApoB. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ácido nucleico de ApoB incluye, sin limitaciones, una secuencia de ADN que codifica ApoB, una secuencia de ARN transcrita a partir de ADN que codifica ApoB, y una secuencia de ARNm que codifica la ApoB.

"ARNm de ApoB" significa un ARNm que codifica la ApoB.

Indicaciones terapéuticas de ApoB

En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para modular la expresión de ApoB en un individuo, que comprende administrar un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB. En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para tratar a un individuo, que comprenden administrar una o más composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB. En ciertas realizaciones, el individuo tiene hipercolesterolemia, hipercolesterolemia no familiar, hipercolesterolemia familiar, hipercolesterolemia familiar heterocigótica, hipercolesterolemia familiar homocigótica, dislipidemia mixta, aterosclerosis, un riesgo de desarrollar aterosclerosis, cardiopatía coronaria, antecedentes de cardiopatía coronaria, cardiopatía coronaria de inicio precoz, uno o más factores de riesgo de cardiopatía coronaria, diabetes de tipo II, diabetes de tipo II con dislipidemia, dislipidemia, hipertrigliceridemia, hiperlipidemia, hiperacidemia grasa, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica o enfermedad de hígado graso no alcohólica.

Las guías para terapias hipolipemiantes se establecieron en el 2001, en el Panel de Tratamiento de adultos III (ATP III) del Programa Nacional educativo sobre colesterol de EE.UU. (NCEP) y se actualizaron en 2004 (Grundey et al., *Circulation*, 2004, 110, 227-239). Las guías incluyen obtener un perfil lipoproteico completo, normalmente después

de ayunar durante 9 a 12 horas, para la determinación de los niveles de LDL-C, colesterol total y HDL-C. De acuerdo con las guías más recientemente establecidas, los niveles de LDL-C de 130-159 mg/dl, 160-189 mg/dl y mayores o iguales a 190 mg/dl se consideran en el límite alto, alto y muy alto, respectivamente. Niveles de colesterol de 200-239 y mayores o iguales a 240 mg/dl se consideran en el límite alto y altos, respectivamente. Niveles de HDL-C inferiores a 40 mg/dl se consideran bajos.

En ciertas realizaciones, se ha identificado que el individuo necesita terapia hipolipemiente. En ciertas de tales realizaciones, se ha identificado que el individuo necesita terapia hipolipemiente de acuerdo con las guías establecidas en 2001 por Panel de Tratamiento de adultos III (ATP III) del Programa Nacional educativo sobre colesterol de EE.UU. (NCEP) y actualizadas en 2004 (Grundey et al., *Circulation*, 2004, 110, 227-239). En ciertas de tales realizaciones, el individuo que necesita terapia hipolipemiente tiene un nivel de LDL-C superior a 190 mg/dl. En ciertas de tales realizaciones, el individuo que necesita terapia hipolipemiente tiene un nivel de LDL-C superior a 160 mg/dl. En ciertas de tales realizaciones, el individuo que necesita terapia hipolipemiente tiene un nivel de LDL-C superior a 130 mg/dl. En ciertas de tales realizaciones, el individuo que necesita terapia hipolipemiente tiene un nivel de LDL-C superior a 100 mg/dl. En ciertas de tales realizaciones, el individuo que necesita terapia hipolipemiente debe mantener el nivel de LDL-C por debajo de 160 mg/dl. En ciertas de tales realizaciones, el individuo que necesita terapia hipolipemiente debe mantener el nivel de LDL-C por debajo de 130 mg/dl. En ciertas de tales realizaciones, el individuo que necesita terapia hipolipemiente debe mantener el nivel de LDL-C por debajo de 100 mg/dl. En ciertas de tales realizaciones, el individuo debe mantener el nivel de LDL-C por debajo de 70 mg/dl.

En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para reducir la ApoB en un individuo. En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para reducir en un individuo los niveles de lipoproteínas que contienen ApoB. En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para reducir el nivel de LDL-C en un individuo. En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para reducir el nivel de VLDL-C en un individuo. En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para reducir el nivel de IDL-C en un individuo. En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para reducir el nivel de no HDL-C en un individuo. En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para reducir Lp(a) en un individuo. En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para reducir los triglicéridos en suero en un individuo. En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para reducir los triglicéridos hepáticos en un individuo. En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para reducir el nivel de Ox-LDL-C en un individuo. En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para reducir las partículas pequeñas de LDL en un individuo. En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para reducir las partículas pequeñas de VLDL en un individuo. En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para reducir los fosfolípidos en un individuo. En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para reducir los fosfolípidos oxidados en un individuo.

En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para reducir la concentración de Ox-LDL-C en un sujeto. En ciertas de tales realizaciones, la reducción de ApoB, LDL-C, VLDL-C, IDL-C, colesterol total, no-HDL-C, Lp(a), triglicéridos u Ox-LDL-C se selecciona, de forma independiente, de al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% y al menos 100%. En ciertas de tales realizaciones, la reducción de ApoB, LDL-C, VLDL-C, IDL-C, colesterol total, no-HDL-C, Lp(a), triglicéridos u Ox-LDL-C se selecciona, de forma independiente, de al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60% y al menos 70%. En ciertas de tales realizaciones, la reducción de ApoB, LDL-C, VLDL-C, IDL-C, colesterol total, no-HDL-C, Lp(a), triglicéridos u Ox-LDL-C se selecciona, de forma independiente, de al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, y al menos 70%.

En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para elevar la concentración de HDL-C en un sujeto.

En ciertas realizaciones, los métodos descritos aquí no reducen los niveles de HDL-C. En ciertas realizaciones, los métodos descritos aquí no dan como resultado la acumulación de lípidos en el hígado. En ciertas realizaciones, los métodos descritos aquí no producen esteatosis hepática.

En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para reducir la concentración de ApoB en un sujeto al tiempo que se reducen los efectos secundarios asociados con el tratamiento. En ciertas de tales realizaciones, un efecto secundario es toxicidad hepática. En ciertas de tales realizaciones, un efecto secundario es una función hepática anómala. En ciertas de tales realizaciones, un efecto secundario es elevación de los niveles de alanina aminotransferasa (ALT). En ciertas de tales realizaciones, un efecto secundario es elevación de los niveles de aspartato aminotransferasa (AST).

En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para reducir la concentración de ApoB en un sujeto que no alcanza los niveles diana de LDL-C como resultado de la terapia hipolipemiente. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB es el único agente hipolipemiente administrado al sujeto. En ciertas de tales realizaciones, el sujeto no ha cumplido la terapia hipolipemiente recomendada. En ciertas de tales realizaciones, una composición farmacéutica de la descripción se administra junto con una terapia hipolipemiente adicional diferente. En ciertas de tales realizaciones, una terapia hipolipemiente adicional es aféresis de LDL. En ciertas de tales realizaciones, una terapia hipolipemiente adicional es una estatina. En ciertas de tales realizaciones, una terapia hipolipemiente adicional es ezetimiba.

En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para disminuir la concentración de ApoB en un sujeto intolerante a estatinas. En ciertas de tales realizaciones, el sujeto presenta incrementos de la concentración de creatina cinasa como resultado de la administración de estatinas. En ciertas de tales realizaciones, el sujeto presenta anomalías en la función hepática como resultado de la administración de estatinas. En ciertas de tales realizaciones, el sujeto presenta dolores musculares como resultado de la administración de estatinas. En ciertas de tales realizaciones, el sujeto tiene efectos secundarios sobre el sistema nervioso central como resultado de la administración de estatinas. En ciertas realizaciones, el sujeto no ha cumplido la terapia de estatinas recomendada.

En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para disminuir los niveles de triglicéridos en hígado en un sujeto. En ciertas de tales realizaciones, el sujeto tiene niveles elevados de triglicéridos en el hígado. En ciertas de tales realizaciones, el sujeto tiene esteatohepatitis. En ciertas de tales realizaciones, el sujeto tiene esteatosis. En ciertas de tales realizaciones, los niveles de triglicéridos en hígado se miden mediante pruebas de imagen de resonancia magnética.

En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para reducir el riesgo de cardiopatía coronaria en un sujeto. En ciertas realizaciones, los métodos son para ralentizar la progresión de la aterosclerosis en un sujeto. En ciertas de tales realizaciones, los métodos son para detener la progresión de la aterosclerosis en un sujeto. En ciertas de tales realizaciones, los métodos son para reducir el tamaño y/o la prevalencia de las placas ateroscleróticas en un sujeto. En ciertas realizaciones, los métodos reducen el riesgo de un sujeto de desarrollar aterosclerosis.

En ciertas realizaciones, los métodos descritos mejoran el resultado cardiovascular en un sujeto. En ciertas de tales realizaciones, el resultado cardiovascular mejorado es la reducción del riesgo de desarrollar cardiopatía coronaria. En ciertas de tales realizaciones, el resultado cardiovascular mejorado es una reducción en la aparición de uno o más acontecimientos cardiovasculares importantes, que incluyen, pero no se limitan a, muerte, infarto de miocardio, reinfarto, ictus, shock cardiogénico, edema pulmonar, parada cardíaca y arritmia ventricular. En ciertas de tales realizaciones, el resultado cardiovascular mejorado se pone de manifiesto por la mejora del espesor de la media íntima de la carótida. En ciertas de tales realizaciones, la mejora del espesor de la media íntima de la carótida es una disminución del espesor. En ciertas de tales realizaciones, la mejora del espesor de la media íntima de la carótida es una prevención de un incremento del espesor de la media íntima.

En ciertas de tales realizaciones, una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB es para usar en terapia. En ciertas realizaciones, la terapia es la reducción de LDL-C, ApoB, VLDL-C, IDL-C, no-HDL-C, Lp(a), triglicéridos en suero, triglicéridos en hígado, Ox-LDL-C, partículas pequeñas de LDL, VLDL pequeñas, fosfolípidos o fosfolípidos oxidados en un individuo. En ciertas realizaciones, la terapia es el tratamiento de hipercolesterolemia, hipercolesterolemia no familiar, hipercolesterolemia familiar, hipercolesterolemia familiar heterocigótica, hipercolesterolemia familiar homocigótica, dislipidemia mixta, aterosclerosis, un riesgo de desarrollar aterosclerosis, cardiopatía coronaria, antecedentes de cardiopatía coronaria, cardiopatía coronaria de inicio precoz, uno o más factores de riesgo de cardiopatía coronaria, diabetes de tipo II, diabetes de tipo II con dislipidemia, dislipidemia, hipertrigliceridemia, hiperlipidemia, hiperacidemia grasa, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica o enfermedad de hígado graso no alcohólica. En realizaciones adicionales, la terapia es la reducción del riesgo de CPC. En ciertas realizaciones, la terapia es la prevención de la aterosclerosis. En ciertas realizaciones, la terapia es la prevención de cardiopatía coronaria.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB se usa para la preparación de un medicamento para reducir los niveles de LDL-C, ApoB, VLDL-C, IDL-C, no-HDL-C, Lp(a), triglicéridos en suero, triglicéridos en hígado, Ox-LDL-C, partículas pequeñas de LDL, VLDL pequeñas, fosfolípidos o fosfolípidos oxidados en un individuo. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB se usa para la preparación de un medicamento para reducir el riesgo de cardiopatía coronaria. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB se usa para la preparación de un medicamento para el tratamiento de hipercolesterolemia, hipercolesterolemia no familiar, hipercolesterolemia familiar, hipercolesterolemia familiar heterocigótica, hipercolesterolemia familiar homocigótica, dislipidemia mixta, aterosclerosis, un riesgo de desarrollar aterosclerosis, cardiopatía coronaria, antecedentes de cardiopatía coronaria, cardiopatía coronaria de inicio precoz, uno o más factores de riesgo de cardiopatía coronaria, diabetes de tipo II, diabetes de tipo II con dislipidemia, dislipidemia, hipertrigliceridemia, hiperlipidemia, hiperacidemia grasa, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica, o enfermedad de hígado graso no alcohólica.

Terapias de combinación con ApoB

En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB se administran conjuntamente con uno o más agentes farmacéuticos distintos. En ciertas realizaciones, dichos uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar la misma enfermedad o afección que las una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. En ciertas de tales realizaciones, los uno o más agentes farmacéuticos son agentes hipolipemiantes. En ciertas realizaciones, dichos uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar otra enfermedad o afección distinta a la de las una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. En ciertas realizaciones, dichos uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar un efecto indeseado de las una o más composiciones

- farmacéuticas de la presente invención. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran conjuntamente con otro agente farmacéutico para tratar un efecto indeseado de dicho otro agente farmacéutico. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más agentes farmacéuticos distintos se administran al mismo tiempo. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más agentes farmacéuticos distintos se administran en momentos diferentes. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más agentes farmacéuticos distintos se preparan juntos en una única formulación. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más agentes farmacéuticos distintos se preparan por separado.
- En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos que se pueden administrar de forma conjunta con una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB incluyen agentes hipolipemiantes. En ciertas de tales realizaciones, los agentes farmacéuticos que se pueden administrar de forma conjunta con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, atorvastatina, simvastatina, rosuvastatina y ezetimiba. En ciertas de tales realizaciones, el agente hipolipemiente se administra antes de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas de tales realizaciones, el agente hipolipemiente se administra después de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas de tales realizaciones, el agente hipolipemiente se administra al mismo tiempo que la composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas de tales realizaciones, la dosis de un agente hipolipemiente coadministrado es la misma que la dosis que se administraría si el agente hipolipemiente se administrara solo. En ciertas de tales realizaciones, la dosis de un agente hipolipemiente coadministrado es menor que la dosis que se administraría si el agente hipolipemiente se administrara solo. En ciertas de tales realizaciones, la dosis de un agente hipolipemiente coadministrado es mayor que la dosis que se administraría si el agente hipolipemiente se administrara solo.
- En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiente coadministrado es un inhibidor de la HMG-CoA reductasa. En ciertas de tales realizaciones, el inhibidor de la HMG-CoA reductasa es una estatina. En ciertas de tales realizaciones, la estatina se selecciona de atorvastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina y rosuvastatina.
- En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiente coadministrado es un inhibidor de la absorción de colesterol. En ciertas de tales realizaciones, el inhibidor de la absorción de colesterol es ezetimiba.
- En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiente coadministrado es un inhibidor de la HMG-CoA reductasa formulado conjuntamente con un inhibidor de la absorción de colesterol. En ciertas de tales realizaciones, el agente hipolipemiente formulado conjuntamente es ezetimiba/simvastatina.
- En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiente coadministrado es un inhibidor de la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (inhibidor de MTP).
- En ciertas realizaciones, un agente farmacéutico coadministrado es un secuestrante de ácidos biliares. En ciertas de tales realizaciones, el secuestrante de ácidos biliares se selecciona de colestiramina, colestipol y colesevelam.
- En ciertas realizaciones, un agente farmacéutico coadministrado es un ácido nicotínico. En ciertas de tales realizaciones, el ácido nicotínico se selecciona de ácido nicotínico de liberación inmediata, ácido nicotínico de liberación extendida y ácido nicotínico de liberación sostenida.
- En ciertas realizaciones, un agente farmacéutico coadministrado es un ácido fibrico. En ciertas de tales realizaciones, el ácido fibrico se selecciona de gemfibrozilo, fenofibrato, clofibrato, bezafibrato y ciprofibrato.
- Otros ejemplos de agentes farmacéuticos que se pueden administrar de forma conjunta con una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB incluyen, pero no se limitan a, corticosteroides, incluyendo, pero sin limitarse a, prednisona; inmunoglobulinas, incluyendo, pero sin limitarse a, inmunoglobulina intravenosa (IgIV); analgésicos (por ejemplo, acetaminofeno); agentes antiinflamatorios, incluyendo, pero sin limitarse a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, ibuprofeno, inhibidores de la COX-1 e inhibidores de la COX-2); salicilatos; antibióticos; antivirales; agentes antifúngicos; agentes antidiabéticos (por ejemplo, biguanidas, inhibidores de la glucosidasa, insulinas, sulfonilureas y tiazolidendionas); modificadores adrenérgicos; diuréticos; hormonas (por ejemplo, esteroides anabólicos, andrógenos, estrógenos, calcitonina, progestina, somatostatina y hormonas tiroideas); inmunomoduladores; relajantes musculares; antihistamínicos, agentes antiosteoporosis (por ejemplo, bisfosfonatos, calcitonina y estrógenos); prostaglandinas, agentes antineoplásicos; agentes psicoterapéuticos; sedantes; roble venenoso atlántico o zumaque veneoso; anticuerpos; y vacunas.
- En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB se puede administrar junto con una terapia hipolipemiente. En ciertas de tales realizaciones, una terapia hipolipemiente es un cambio terapéutico del estilo de vida. En ciertas de tales realizaciones, una terapia hipolipemiente es aféresis de LDL.

En una realización, los compuestos antisentido proporcionados aquí se pueden usar para disminuir el nivel de lipoproteínas que contienen apolipoproteína B en un sujeto humano. Como se usa aquí, "lipoproteína que contiene apolipoproteína B" se refiere a cualquier lipoproteína que tiene apolipoproteína B como su componente proteico y se entiende que incluye LDL, VLDL, IDL, y lipoproteína(a). Cada uno de LDL, VLDL, IDL, y lipoproteína(a) contienen una molécula de apolipoproteína B, por tanto la medida de la apolipoproteína B en suero refleja el número total de estas lipoproteínas. Como se conoce en la técnica, cada una de las lipoproteínas mencionadas en lo que antecede es aterogénica. Por tanto, la reducción de una o más lipoproteínas que contienen apolipoproteína B en suero puede proporcionar un beneficio terapéutico a un sujeto humano. Las partículas pequeñas de LDL se consideran particularmente aterogénicas con respecto a las partículas grandes de LDL. Por lo que la reducción de las partículas pequeñas de LDL puede proporcionar un beneficio terapéutico a un sujeto humano. También se pueden determinar parámetros lipídicos adicionales en un sujeto. La reducción de la proporción colesterol total:HDL o de la proporción LDL:HDL es una mejora clínicamente deseable en la proporción del colesterol. De forma similar, es clínicamente deseable reducir los triglicéridos en suero en seres humanos que exhiben niveles elevados de lípidos.

Otras indicaciones de enfermedad cardiovascular que se pueden medir en un sujeto incluyen el tamaño de la partícula de LDL; la concentración en suero de LDL éster de colesterol; la composición en suero de LDL éster de colesterol; la extensión de la poliinsaturación de LDL ésteres de colesterol en suero; y los niveles en suero de HDL colesterol. Como se usa aquí, "el tamaño de partícula de LDL en suero" se refiere a la clasificación del tamaño de partícula de LDL en suero, que puede ser muy pequeña, pequeña, medio o grande, y típicamente se expresa en g/μmol. En el contexto de la presente invención, "concentración en suero de LDL éster de colesterol" quiere decir la cantidad de éster de colesterol presente en las partículas de LDL y típicamente se mide en mg/dl. En el contexto de la presente invención, "composición en suero de LDL éster de colesterol" es una medida del porcentaje de ésteres de colesterol de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados presentes en las partículas de LDL en suero. "Poliinsaturación de ésteres de colesterol en LDL en suero" quiere decir el porcentaje de ésteres de colesterol de ácidos grasos poliinsaturados en las partículas de LDL en suero.

Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para obtener muestras de suero o plasma para análisis y métodos de preparación de las muestras de suero para análisis. Con respecto a las determinaciones de lipoproteínas, colesterol, triglicéridos y ésteres de colesterol, los términos "suero" y "plasma" se usan aquí de forma intercambiable.

En otra realización, los compuestos antisentido proporcionados aquí se pueden usar para tratar trastornos metabólicos. Se puede emplear una diversidad de biomarcadores para evaluar la enfermedad metabólica. Por ejemplo, un médico, o incluso el paciente, puede determinar los niveles de glucosa en sangre usando un kit de análisis disponible habitualmente o un glucosímetro (por ejemplo, el kit Ascensia ELITE™, Ascensia (Bayer), Tarrytown NY, o Accucheck, Roche Diagnostics). También se pueden medir los niveles de hemoglobina glucada (HbA_{1c}). La HbA_{1c} es una variante de hemoglobina minoritaria estable formada *in vivo* mediante la modificación postraduccional de la glucosa y contiene, principalmente, cadena β glucada en NH₂-terminal. Existe una fuerte correlación entre los niveles de HbA_{1c} y los niveles medios de glucosa en sangre durante los 3 meses previos. Por tanto, la HbA_{1c} a menudo se ve como "el patrón" para medir el control sostenido de la glucosa en sangre (Bunn, H.F. et al., 1978, Science. 200, 21-7). La HbA_{1c} se puede medir mediante HPLC de intercambio iónico o mediante inmunoensayo; actualmente se dispone de gran cantidad de kit para recolección domiciliar de sangre y su envío para la determinación de HbA_{1c}. La fructosamina en suero es otra medida del control estable de la glucosa y se puede medir mediante un método colorimétrico (Cobas Integra, Roche Diagnostics).

Ciertos compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos están dirigidos a un ácido nucleico de ApoB que tiene la secuencia de número de acceso en GENBANK® NM_000384.1, incorporada aquí como SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a la SEC ID NO: 1 es al menos un 90% complementario a la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a la SEC ID NO: 1 es al menos un 95% complementario a la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a la SEC ID NO: 1 es 100% complementario a la SEC ID NO: 1. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de las secuencias nucleotídicas indicadas en la Tabla 1 y en la Tabla 2.

La secuencia nucleotídica indicada en cada SEC ID NO en las Tablas 1 y 2 es independiente de cualquier modificación de un resto de azúcar, un enlace monomérico o una base nucleotídica. Como tales, los compuestos antisentido cortos definidos por una SEC ID NO pueden comprender, de forma independiente, una o más modificaciones en un resto de azúcar, un enlace internucleosídico o una base nucleotídica. Los compuestos antisentido descritos por el Número Isis (n° Isis) indican una combinación de secuencia de bases nucleotídicas y una o más modificaciones en un resto de azúcar, un enlace internucleosídico o una base nucleotídica.

Las Tablas 1 y 2 ilustran ejemplos de compuestos antisentido cortos dirigidos a la SEC ID NO: 1. La Tabla 1 ilustra compuestos antisentido cortos que son 100% complementarios a la SEC ID NO: 1. La Tabla 2 ilustra compuestos antisentido cortos que tienen uno o dos apareamientos erróneos con respecto a la SEC ID NO: 1. La columna denominada "motivo gápmo" indica el motivo ala-salto-ala de cada compuesto antisentido corto. El segmento salto

comprende 2'- desoxinucleótidos y cada nucleótido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado en 2'. El azúcar modificado en 2' concreto también está indicado en la columna "motivo gápmero". Por ejemplo, "2-10-2 MOE" significa un motivo gápmero 2-10-2, en el que un segmento de salto de diez 2'-desoxinucleótidos está flanqueado por segmentos ala de dos nucleótidos, en los que los nucleótidos de los segmentos ala son nucleótidos 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos son fosforotioato. Los compuestos antisentido cortos comprenden 5-metilcitosina en lugar de citosina no modificada, a menos que "citosina no modificada" esté en la lista en la columna del motivo gápmero, en cuyo caso las citosinas indicadas son citosinas no modificadas. Por ejemplo, "5-mC sólo en salto" indica que el segmento de salto tiene 5-metilcitosinas, mientras que los segmentos ala tienen citosinas no modificadas.

5

Tabla 1: Compuestos antisentido cortos dirigidos a la SEC ID NO: 1

10

Nº ISIS	Sitio diana en 5'	Sitio diana en 3'	Secuencia (5'-3')	Motivo gápmero	SEC ID NO
372816	263	278	CCGGAGGTGCTTGAAT	3-10-3 MOE	16
372894	264	277	CGGAGGTGCTTGAA	2-10-2 MOE	17
372817	428	443	GAAGCCATACACCTCT	3-10-3 MOE	18
372895	429	442	AAGCCATACACCTC	2-10-2 MOE	19
372818	431	446	GTTGAAGCCATACACC	3-10-3 MOE	20
372896	432	445	TTGAAGCCATACAC	2-10-2 MOE	21
372819	438	453	CCTCAGGGTTGAAGCC	3-10-3 MOE	22
372897	439	452	CTCAGGGTTGAAGC	2-10-2 MOE	23
372820	443	458	TTTGCCCTCAGGGTTG	3-10-3 MOE	24
372898	444	457	TTGCCCTCAGGGTT	2-10-2 MOE	25
372821	468	483	AGTTCTTGTTTTCTT	3-10-3 MOE	26
372899	469	482	GTTCTTGTTTTCT	2-10-2 MOE	27
372822	587	602	CCTCTTGATGTTTCAGG	3-10-3 MOE	28
372900	588	601	CTCTTGATGTTTCAG	2-10-2 MOE	29
372823	592	607	ATGCCCTCTTGATGT	3-10-3 MOE	30
372901	593	606	TGCCCTCTTGATG	2-10-2 MOE	31
346583	715	728	TGCCACATTGCCCT	3-8-3 MOE	32
346584	716	729	TTGCCACATTGCC	3-8-3 MOE	33
346585	717	730	GTTGCCACATTGCC	3-8-3 MOE	34
346586	718	731	TGTTGCCACATTGC	3-8-3 MOE	35
346587	719	732	CTGTTGCCACATTG	3-8-3 MOE	36
346588	720	733	TCTGTTGCCACATT	3-8-3 MOE	37
346589	721	734	TTCTGTTGCCACAT	3-8-3 MOE	38
346590	722	735	TTTCTGTTGCCACA	3-8-3 MOE	39
346591	723	736	ATTTCTGTTGCCAC	3-8-3 MOE	40
372824	929	944	GTAGGAGAAAGGCAGG	3-10-3 MOE	41

ES 2 471 978 T3

372902	930	943	TAGGAGAAAGGCAG	2-10-2 MOE	42
372825	1256	1271	GGCTTGTAAGTGATG	3-10-3 MOE	43
372903	1257	1270	GCTTGTAAGTGAT	2-10-2 MOE	44
372826	1304	1319	CCACTGGAGGATGTGA	3-10-3 MOE	45
372904	1305	1318	CACTGGAGGATGTG	2-10-2 MOE	46
372829	2135	2150	TTTCAGCATGCTTTCT	3-10-3 MOE	47
372907	2136	2149	TTCAGCATGCTTTC	2-10-2 MOE	48
372832	2774	2789	CATATTTGTCACAAAC	3-10-3 MOE	49
372910	2775	2788	ATATTTGTCACAAA	2-10-2 MOE	50
372833	2779	2794	ATGCCCATATTTGTCA	3-10-3 MOE	51
372911	2780	2793	TGCCCATATTTGTC	2-10-2 MOE	52
372835	2961	2976	TTTTGGTGGTAGAGAC	3-10-3 MOE	53
372913	2962	2975	TTTGGTGGTAGAGA	2-10-2 MOE	54
346592	3248	3261	TCTGCTTCGCACCT	3-8-3 MOE	55
346593	3249	3262	GTCTGCTTCGCACC	3-8-3 MOE	56
346594	3250	3263	AGTCTGCTTCGCAC	3-8-3 MOE	57
346595	3251	3264	CAGTCTGCTTCGCA	3-8-3 MOE	58
346596	3252	3265	TCAGTCTGCTTCGC	3-8-3 MOE	59
346597	3253	3266	CTCAGTCRGCTTCG	3-8-3 MOE	60
346598	3254	3267	CCTCAGTCTGCTTC	3-8-3 MOE	61
346599	3255	3268	GCCTCAGTCTGCTT	3-8-3 MOE	62
346600	3256	3269	AGCCTCAGTCTGCT	3-8-3 MOE	63
372836	3350	3365	AACTCTGAGGATTGTT	3-10-3 MOE	64
372914	3351	3364	ACTCTGAGGATTGT	2-10-2 MOE	65
372837	3355	3370	TCATTA ACTCTGAGGA	3-10-3 MOE	66
372915	3356	3369	CATTA ACTCTGAGG	2-10-2 MOE	67
372838	3360	3375	ATTCATCATAACTCT	3-10-3 MOE	68
372916	3361	3374	TTCATCATAACTC	2-10-2 MOE	69
372839	3409	3424	TTGTTCTGAATGTCCA	3-10-3 MOE	70
387461	3409	3424	TTGTTCTGAATGTCCA	3-10-3 Metilenoxi BNA citosinas no modificadas en el salto	70
380147	3409	3424	TTGTTCTGAATGTCCA	3-10-3 Metilenoxi BNA	70
372917	3410	3423	TGTTCTGAATGTCC	2-10-2 MOE	73

ES 2 471 978 T3

372840	3573	3588	CAGATGAGTCCATTTG	3-10-3 MOE	74
372918	3574	3587	AGATGAGTCCATTT	2-10-2 MOE	75
372841	3701	3716	ATCCACAGGGAAATTG	3-10-3 MOE	76
372919	3702	3715	TCCACAGGGAAATT	2-10-2 MOE	77
372843	4219	4234	CAGTTGTACAAGTTGC	3-10-3 MOE	78
372921	4220	4233	AGTTGTACAAGTTG	2-10-2 MOE	79
372844	4301	4316	CACAGAGTCAGCCTTC	3-10-3 MOE	80
372922	4302	4315	ACAGAGTCAGCCTT	2-10-2 MOE	81
372845	4308	4323	GGTCAACCACAGAGTC	3-10-3 MOE	82
372923	4309	4322	GTCAACCACAGAGT	2-10-2 MOE	83
346601	5588	5601	CAGCCACATGCAGC	3-8-3 MOE	84
346602	5589	5602	CCAGCCACATGCAG	3-8-3 MOE	85
346603	5590	5603	ACCAGCCACATGCA	3-8-3 MOE	86
346604	5591	5604	TACCAGCCACATGC	3-8-3 MOE	87
346605	5592	5605	TTACCAGCCACATG	3-8-3 MOE	88
346606	5593	5606	GTTACCAGCCACAT	3-8-3 MOE	89
346607	5594	5607	GGTTACCAGCCACA	3-8-3 MOE	90
346608	5595	5608	AGGTTACCAGCCAC	3-8-3 MOE	91
346609	5596	5609	TAGGTTACCAGCCA	3-8-3 MOE	92
372851	5924	5939	AGGTTCTGCTTTCAAC	3-10-3 MOE	93
372929	5925	5938	GGTTCTGCTTTCAA	2-10-2 MOE	94
372854	6664	6679	TACTGATCAAATTGTA	3-10-3 MOE	95
372932	6665	6678	ACTGATCAAATTGT	2-10-2 MOE	96
372855	6908	6923	TTTTTCTTGATCTGG	3-10-3 MOE	97
372933	6909	6922	TTTTCTTGATCTG	2-10-2 MOE	98
372856	7190	7205	ATCCATTAACCTGG	3-10-3 MOE	99
372934	7191	7204	TCCATTAACCTG	2-10-2 MOE	100
372858	7817	7832	ATATTGCTCTGCAAAG	3-10-3 MOE	101
372936	7818	7831	TATTGCTCTGCAAA	2-10-2 MOE	102
346610	7818	7831	TATTGCTCTGCAAA	3-8-3 MOE	102
346611	7819	7832	ATATTGCTCTGCAA	3-8-3 MOE	104
346612	7820	7833	AATATTGCTCTGCA	3-8-3 MOE	105
346613	7821	7834	GAATATTGCTCTGC	3-8-3 MOE	106

ES 2 471 978 T3

346614	7822	7835	AGAATATTGCTCTG	3-8-3 MOE	107
346615	7823	7836	TAGAATATTGCTCT	3-8-3 MOE	108
346616	7824	7837	ATAGAATATTGCTC	3-8-3 MOE	109
346617	7825	7838	GATAGAATATTGCT	3-8-3 MOE	110
346618	7826	7839	GGATAGAATATTGC	3-8-3 MOE	111
372859	7995	8010	ATGGAATCCTCAAATC	3-10-3 MOE	112
372937	7996	8009	TGGAATCCTCAAAT	2-10-2 MOE	113
372861	8336	8351	GAATTCTGGTATGTGA	3-10-3 MOE	114
372939	8337	8350	AATTCTGGTATGTG	2-10-2 MOE	115
372862	8341	8356	AGCTGGAATTCTGGTA	3-10-3 MOE	116
372940	8342	8355	GCTGGAATTCTGGT	2-10-2 MOE	117
372863	8539	8554	TGAAAATCAAATTGA	3-10-3 MOE	118
372941	8540	8553	GAAAATCAAATTG	2-10-2 MOE	119
372871	9344	9359	AAACAGTGCATAGTTA	3-10-3 MOE	120
372949	9345	9358	AACAGTGCATAGTT	2-10-2 MOE	121
372872	9515	9530	TTCAGGAATTGTTAAA	3-10-3 MOE	122
372950	9516	9529	TCAGGAATTGTTAA	2-10-2 MOE	123
372875	9794	9809	TTTTGTTTCATTATAG	3-10-3 MOE	124
372953	9795	9808	TTTGTTTCATTATA	2-10-2 MOE	125
372877	10157	10172	GATGACACTTGATTTA	3-10-3 MOE	126
372955	10158	10171	ATGACACTTGATTT	2-10-2 MOE	127
372878	10161	10176	GTGTGATGACACTTGA	3-10-3 MOE	128
372956	10162	10175	TGTGATGACACTTG	2-10-2 MOE	129
372879	10167	10182	TATTCAGTGTGATGAC	3-10-3 MOE	130
372957	10168	10181	ATTCAGTGTGATGA	2-10-2 MOE	131
372880	10172	10187	ATTGGTATTCAGTGTG	3-10-3 MOE	132
372958	10173	10186	TTGGTATTCAGTGT	2-10-2 MOE	133
346619	10838	10851	CCTCTAGCTGTAAG	3-8-3 MOE	134
346620	10839	10852	CCCTCTAGCTGTAA	3-8-3 MOE	135
346621	10840	10853	GCCCTCTAGCTGTA	3-8-3 MOE	136
346622	10841	10854	GGCCCTCTAGCTGT	3-8-3 MOE	137
346623	10842	10855	AGGCCCTCTAGCTG	3-8-3 MOE	138
346624	10843	10856	GAGGCCCTCTAGCT	3-8-3 MOE	139

ES 2 471 978 T3

346625	10844	10857	AGAGGCCCTCTAGC	3-8-3 MOE	140
346626	10845	10858	AAGAGGCCCTCTAG	3-8-3 MOE	141
346627	10846	10859	AAAGAGGCCCTCTA	3-8-3 MOE	142
372890	13689	13704	GAATGGACAGGTCAAT	3-10-3 MOE	143
372968	13690	13703	AATGGACAGGTCAA	2-10-2 MOE	144
372891	13694	13709	GTTTTGAATGGACAGG	3-10-3 MOE	145
372969	13695	13708	TTTTGAATGGACAG	2-10-2 MOE	146
372892	13699	13714	TGGTAGTTTTGAATGG	3-10-3 MOE	147
372970	13700	13713	GGTAGTTTTGAATG	2-10-2 MOE	148
346628	13907	13920	TCACTGTATGGTTT	3-8-3 MOE	149
346629	13908	13921	CTCACTGTATGGTT	3-8-3 MOE	150
346630	13909	13922	GCTCACTGTATGGT	3-8-3 MOE	151
346631	13910	13923	GGCTCACTGTATGG	3-8-3 MOE	152
346632	13911	13924	TGGCTCACTGTATG	3-8-3 MOE	153
346633	13912	13925	CTGGCTCACTGTAT	3-8-3 MOE	154
346634	13913	13926	GCTGGCTCACTGTA	3-8-3 MOE	155
346635	13914	13927	GGCTGGCTCACTGT	3-8-3 MOE	156
346636	13915	13928	AGGCTGGCTCACTG	3-8-3 MOE	157
346637	13963	13976	CAGGTCCAGTTCAT	3-8-3 MOE	158
346638	13964	13977	GCAGGTCCAGTTCA	3-8-3 MOE	159
346639	13965	13978	TGCAGGTCCAGTTC	3-8-3 MOE	160
346640	13966	13979	GTGCAGGTCCAGTT	3-8-3 MOE	161
346641	13967	13980	GGTGCAGGTCCAGT	3-8-3 MOE	162
346642	13968	13981	TGGTGCAGGTCCAG	3-8-3 MOE	163
346643	13969	13982	TTGGTGCAGGTCCA	3-8-3 MOE	164
346644	13970	13983	TTTGGTGCAGGTCC	3-8-3 MOE	165
346645	13971	13984	CTTTGGTGCAGGTC	3-8-3 MOE	166
346646	14051	14064	TAACTCAGATCCTG	3-8-3 MOE	167
346647	14052	14065	ATAACTCAGATCCT	3-8-3 MOE	168
346648	14053	14066	AATAACTCAGATCC	3-8-3 MOE	169
346649	14054	14067	AAATAACTCAGATC	3-8-3 MOE	170
346650	14055	14068	AAAATAACTCAGAT	3-8-3 MOE	171
346651	14056	14069	CAAATAACTCAGA	3-8-3 MOE	172

ES 2 471 978 T3

346652	14057	14070	GCAAAAATAACTCAG	3-8-3 MOE	173
346653	14058	14071	AGCAAAAATAACTCA	3-8-3 MOE	174
346654	14059	14072	TAGCAAAAATAACTC	3-8-3 MOE	175

Tabla 2: Compuestos antisentido cortos dirigidos a la SEC ID NO: 1 y que tienen 1 ó 2 apareamientos erróneos

Nº ISIS	Sitio diana en 5'	Sitio diana en 3'	Secuencia (5'-3')	Motivo gápmero	SEC ID NO
372894	771	784	CGGAGGTGCTTGAA	2-10-2 MOE	17
372905	1111	1124	CAGGGCCTGGAGAG	2-10-2 MOE	176
346628	1493	1506	TCACTGTATGGTTT	3-8-3 MOE	149
372828	2006	2021	TCTGAAGTCCATGATC	3-10-3 MOE	177
372906	2007	2020	CTGAAGTCCATGAT	2-10-2 MOE	178
372830	2382	2397	TGGGCATGATTCCATT	3-10-3 MOE	179
372908	2383	2396	GGGCATGATTCCAT	2-10-2 MOE	180
346616	3162	3175	ATAGAATATTGCTC	3-8-3 MOE	109
346617	3163	3176	GATAGAATATTGCT	3-8-3 MOE	110
372929	3513	3526	GGTTCTGCTTTCAA	2-10-2 MOE	94
372946	3800	3813	TGGAGCCCACGTGC	2-10-2 MOE	181
372904	4040	4053	CACTGGAGGATGTG	2-10-2 MOE	46
372842	4084	4099	TTGAAGTTGAGGGCTG	3-10-3 MOE	182
372920	4085	4098	TGAAGTIGAGGGCT	2-10-2 MOE	183
346586	4778	4791	TGTTGCCACATTGC	3-8-3 MOE	35
372847	5030	5045	ACCAGTATTAATTTTG	3-10-3 MOE	184
372925	5031	5044	CCAGTATTAATTTT	2-10-2 MOE	185
372848	5192	5207	GTGTTCTTTGAAGCGG	3-10-3 MOE	186
372926	5193	5206	TGTTCTTTGAAGCG	2-10-2 MOE	187
372953	5625	5638	TTTGTTTCATTATA	2-10-2 MOE	125
372935	7585	7598	AGTTACTTTGGTGT	2-10-2 MOE	188
372860	8255	8270	TGGTACATGGAAGTCT	3-10-3 MOE	189
372938	8256	8269	GGTACATGGAAGTC	2-10-2 MOE	190

ES 2 471 978 T3

391260	8256	8269	GGTACATGGAAGTC	2-10-2 MOE	190
392068	8256	8269	GGTACATGGAAGTC	2-10-2 MOE	190
387462	8256	8269	GGTACATGGAAGTC	2-10-2 metilenoxi BNA	190
391872	8256	8269	GGTACATGGAAGTC	1-1-10-22'-(butilacetomido)-palmitamida metilenoxi BNA/metilenoxi BNA Citosinas no modificadas en el salto	190
380148	8256	8269	GGTACATGGAAGTC	2-10-2 Metilenoxi BNA	190
391871	8256	8269	GGTACATGGAAGTC	1-1-10-2 2'-(butilacetomido)-palmitamida/MOE/MOE Citosinas no modificadas en el salto	190
391755	8256	8269	GGTACATGGAAGTC	2-10-2 ENA mC sólo en el ala	190
398296	8256	8269	GGTACATGGAAGTC	2-10-2 (6'S)-6'-metil-Metilenoxi BNA Citosinas no modificadas	190
372942	8455	8468	TCCATGCCATATGT	2-10-2 MOE	200
372865	8888	8903	CCCTGAAGAAGTCCAT	3-10-3 MOE	201
372943	8889	8902	CCTGAAGAAGTCCA	2-10-2 MOE	202
372866	8908	8923	GCCCAGTTCCATGACC	3-10-3 MOE	203
372944	8909	8922	CCCAGTTCCATGAC	2-10-2 MOE	204
372867	9058	9073	TTGAGGAAGCCAGATT	3-10-3 MOE	205
372945	9059	9072	TGAGGAAGCCAGAT	2-10-2 MOE	206
372870	9261	9276	TGGATGCAGTAATCTC	3-10-3 MOE	207
372948	9262	9275	GGATGCAGTAATCT	2-10-2 MOE	208
372881	10185	10200	TATAAAGTCCAGCATT	3-10-3 MOE	209
372959	10186	10199	ATAAAGTCCAGCAT	2-10-2 MOE	210
372882	10445	10460	AAGTTCCTGCTTGAAG	3-10-3 MOE	211
372960	10446	10459	AGTTCCTGCTTGAA	2-10-2 MOE	212
372964	11451	11464	AATGGTGAAGTACT	2-10-2 MOE	213
346612	13459	13472	AATATTGCTCTGCA	3-8-3 MOE	105
346613	13460	13473	GAATATTGCTCTGC	3-8-3 MOE	106

En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 263-278 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a los nucleótidos 263-278 de la SEC ID NO: 1 comprenden una secuencia nucleotídica seleccionada de la SEC ID NO: 16 ó 17. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 263-278 de la SEC ID NO: 1 se selecciona del n° Isis 372816 ó 372894.

- 5 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 428-483 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 428-483 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, ó 27. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 428-483 de la SEC ID N° 1 se selecciona de los n^{os} Isis 372817, 372895, 372818, 372896, 372819, 372897, 372820, 372898, 372821, ó 372899.
- 10 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 428-458 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 428-458 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 428-458 de la SEC ID NO: 1 se selecciona de los n^{os} Isis 372817, 372895, 372818, 372896, 372819, 372897, 372820 ó 372898.
- 15 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 468-483 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 468-483 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 26 ó 27. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 468-483 de la SEC ID NO: 1 se selecciona del n° Isis 372821 ó 372899.
- 20 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 587-607 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 587-607 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 28 29, 30, ó 31. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 587-607 de la SEC ID NO: 1 se selecciona de los n^{os} Isis 372822, 372900, 372823 ó 372901.
- 25 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 715-736 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 715-736 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ó 40. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 715-736 de la SEC ID NO: 1 se selecciona de los n^{os} Isis 346583, 346584, 346585, 346586, 346587, 346588, 346589, 346590 ó 346591.
- 30 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 929-944 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 929-944 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 41 ó 42. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 929-944 de la SEC ID NO: 1 se selecciona del n° Isis 372824 ó 372902.
- 35 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 1256-1319 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 1256-1319 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 43 44, 45, ó 46. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 1256-1319 de la SEC ID NO: 1 se selecciona de los n^{os} Isis 372825, 372903, 372826 ó 372904.
- 40 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 1256-1271 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 1256-1271 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 43 ó 44. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 1256-1271 de la SEC ID N° 1 se selecciona del n° Isis 372825 ó 372903.
- 45 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 1304-1319 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 1304-1319 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 45 ó 46. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 1304-1319 de la SEC ID NO: 1 se selecciona del n° Isis 372826 ó 372904.
- 50 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 2135-2150 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 2135-2150 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 47 ó 48. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 2135-2150 de la SEC ID NO: 1 se selecciona del n° Isis 372829 ó 372907.
- 55 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 2774-2794 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 2774-2794 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 49 50, 51, ó 52. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 2774-2794 de la SEC ID NO: 1 se selecciona de los n^{os} Isis 372832, 372910, 372833 ó 372911.
- En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 2961-2976 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 2961-2976 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 53 ó 54. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 2961-2976 de la SEC ID NO: 1 se selecciona del n° Isis 372835 ó 372913.
- En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 3248-3269 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 3248-3269 de la SEC ID NO: 1 comprende

una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 ó 63. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 3248-3269 de la SEC ID NO: 1 se selecciona de los n^{os} Isis 346592, 346593, 346594, 346595, 346596, 346597, 346598, 346599 ó 346600.

5 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 3350-3375 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 3350-3375 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 64, 65, 66, 67, 68 ó 69. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 3350-3375 de la SEC ID NO: 1 se selecciona de los n^{os} Isis 372836, 372914, 372837, 372915, 372838, ó 372916.

10 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 3409-3424 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 3409-3424 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 70 ó 73. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 3409-3424 de la SEC ID NO: 1 se selecciona de los n^{os} Isis 372839, 387461, 380147 ó 372917.

15 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 3573-3588 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 3573-3588 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 74 ó 75. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 3573-3588 de la SEC ID NO: 1 se selecciona del n^o Isis 372840 ó 372918. En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 3701-3716 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 3701-3716 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 76 ó 77. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 3701-3716 de la SEC ID NO: 1 se selecciona del n^o Isis 372841 ó 372919.

20 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 4219-4234 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 4219-4234 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 78 ó 79. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 4219-4234 de la SEC ID NO: 1 se selecciona del n^o Isis 372843 ó 372921.

25 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 4301-4323 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 4301-4323 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 80, 81, 82, u 83. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 4301-4323 de la SEC ID NO: 1 se selecciona de los n^{os} Isis 372844, 372922, 372845 ó 372923.

30 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 5588-5609 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 5588-5609 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91 ó 92. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 5588-5609 de la SEC ID NO: 1 se selecciona de los n^{os} Isis 346601, 346602, 346603, 346604, 346605, 346606, 346607, 346608 ó 346609.

35 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 5924-5939 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 5924-5939 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 93 ó 94. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 5924-5939 de la SEC ID NO: 1 se selecciona del n^o Isis 372851 ó 372929.

40 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 6664-6679 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 6664-6679 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 95 ó 96. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 6664-6679 de la SEC ID NO: 1 se selecciona del n^o Isis 372854 ó 372932.

45 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 6908-6923 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 6908-6923 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 97 ó 98. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 6908-6923 de la SEC ID NO: 1 se selecciona del n^o Isis 372855 ó 372933.

50 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 7190-7205 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 7190-7205 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 99 ó 100. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 7190-7205 de la SEC ID NO: 1 se selecciona del n^o Isis 372856 ó 372934.

55 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 7817-7839 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 7817-7839 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 101, 102, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, ó 111. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 7817-7839 de la SEC ID NO: 1 se selecciona de los n^{os} Isis 372858, 372936, 346610, 346611, 346612, 346613, 346614, 346615, 346616, 346617 ó 346618.

- En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 7995-8010 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 7995-8010 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 112 ó 113. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 7995-8010 de la SEC ID NO: 1 se selecciona del n^o Isis 372859 ó 372937.
- 5 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 8336-8356 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 8336-8356 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 114 115, 116, ó 117. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 8336-8356 de la SEC ID NO: 1 se selecciona de los n^{os} Isis 372861, 372939, 372862 ó 372940.
- 10 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 8539-8554 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 8539-8554 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 118 ó 119. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 8539-8554 de la SEC ID NO: 1 se selecciona del n^o Isis 372863 ó 372941.
- En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 9344-9359 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 9344-9359 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 120 ó 121. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 9344-9359 de la SEC ID NO: 1 se selecciona del n^o Isis 372871 ó 372949.
- 15 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 9515-9530 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 9515-9530 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 122 ó 123. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 9515-9530 de la SEC ID NO: 1 se selecciona del n^o Isis 372872 ó 372950.
- 20 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 9794-9809 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 9794-9809 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 124 ó 125. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 9794-9809 de la SEC ID NO: 1 se selecciona del n^o Isis 372875 ó 372953.
- 25 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 10157-10187 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 10157-10187 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 ó 133. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 10157-10187 de la SEC ID NO: 1 se selecciona de los n^{os} Isis 372877, 372955, 372878, 372956, 372879, 372957, 372880 ó 372958.
- 30 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 10838-10859 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 10838-10859 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141 ó 142. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 10838-10859 de la SEC ID NO: 1 se selecciona de los n^{os} Isis 346619, 346620, 346621, 346622, 346623, 346624, 346625, 346626 ó 346627.
- 35 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 13689-13714 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 13689-13714 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 143, 144, 145, 146, 147 ó 148. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 13689-13714 de la SEC ID NO: 1 se selecciona de los n^{os} Isis 372890, 372968, 372891, 372969, 372892, ó 372970.
- 40 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 13907-13928 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 13907-13928 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156 ó 157. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 13907-13928 de la SEC ID NO: 1 se selecciona de los n^{os} Isis 346628, 346629, 346630, 346631, 346632, 346633, 346634, 346635 ó 346636.
- 45 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 13963-13984 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 13963-13984 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165 ó 166. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 13963-13984 de la SEC ID NO: 1 se selecciona de los n^{os} Isis 346637, 346638, 346639, 346640, 346641, 346642, 346643, 346644 ó 346645.
- 50 En ciertas realizaciones, una región diana es los nucleótidos 14051-14072 de la SEC ID NO: 1. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 14051-14072 de la SEC ID NO: 1 comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de SEC ID NO 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174 ó 175. En ciertas de tales realizaciones, un compuesto antisentido corto dirigido a los nucleótidos 14051-14072 de la SEC ID NO: 1 se selecciona de los n^{os} Isis 346646, 346647, 346648, 346649, 346650, 346651, 346652, 346653 ó 346654.
- 55

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB tienen una longitud de 8 a 16, preferiblemente de 9 a 15, más preferiblemente de 9 a 14, más preferiblemente de 10 a 14 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB tienen una longitud de 9 a 14 nucleótidos. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB tienen una longitud de 10 a 14 nucleótidos. En ciertas realizaciones, dichos compuestos antisentido cortos son oligonucleotídicos antisentido cortos.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB son gámpmeros cortos. En ciertas de tales realizaciones, los gámpmeros cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB comprenden al menos una modificación de alta afinidad en una o más alas del compuesto. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB comprenden de 1 a 3 modificaciones de alta afinidad en cada ala. En ciertas de tales realizaciones, los nucleósidos o nucleótidos del ala comprenden una modificación en 2'. En ciertas realizaciones, los monómeros del ala son BNA. En ciertas de tales realizaciones, los monómeros del ala se seleccionan de α -L-metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, β -D-metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, etilenoxi (4'-(CH₂)₂-O-2')BNA, aminooxi (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA y oxiamino (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA. En ciertas realizaciones, los monómeros de un ala comprenden un sustituyente en la posición 2' seleccionado de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C₁-C₁₀, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), y O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), en los que cada R_m y R_n es, de forma independiente, H o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, los monómeros de un ala son nucleótidos 2'MOE.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB comprenden un salto entre el ala en 5' y el ala en 3'. En ciertas realizaciones, el salto comprende cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce monómeros. En ciertas realizaciones, los monómeros del salto son desoxirribonucleótidos no modificados. En ciertas realizaciones, los monómeros del salto son ribonucleótidos no modificados. En ciertas realizaciones, las modificaciones del salto (si las hay) dan como resultado un compuesto antisentido que, cuando se une a su ácido nucleico diana, soporta la escisión por una RNasa, incluyendo, pero sin limitarse a, RNasa H.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB tienen enlaces monoméricos uniformes. En ciertas de tales realizaciones, dichos enlaces son todos enlaces fosforotioato. En ciertas realizaciones, los enlaces son todos enlaces fosfodiéster. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB tienen esqueletos mixtos.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB tienen una longitud de 8 monómeros. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB tienen una longitud de 9 monómeros. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB tienen una longitud de 10 monómeros. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB tienen una longitud de 11 monómeros. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB tienen una longitud de monómeros. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB tienen una longitud de 13 monómeros. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB tienen una longitud de 14 monómeros. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB tienen una longitud de 15 monómeros. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB tienen una longitud de 16 monómeros. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB comprenden de 9 a 15 monómeros. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB comprenden de 10 a 15 monómeros. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB comprenden de 12 a 14 monómeros. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB comprenden de 12 a 14 nucleótidos o nucleósidos.

En ciertas realizaciones, se describen aquí métodos para modulación de la expresión de ApoB. En ciertas realizaciones, dichos métodos comprenden el uso de uno o más compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB, en el que el compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB tiene una longitud de alrededor de 8 a alrededor de 16, preferiblemente de 9 a 15, más preferiblemente de 9 a 14, más preferiblemente de 10 a 14 monómeros (es decir, de alrededor de 8 a alrededor de 16 monómeros unidos). Un experto normal en la técnica apreciará que esto comprende métodos de modulación de la expresión de ApoB usando uno o más compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB de de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 monómeros.

En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de ApoB comprenden el uso de un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB que tiene una longitud de 8 monómeros. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de ApoB comprenden el uso de un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB que tiene una longitud de 9 monómeros. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de ApoB comprenden el uso de un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB que tiene una longitud de 10 monómeros. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de ApoB comprenden el uso de un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB que tiene una longitud de 11 monómeros. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de ApoB comprenden el uso de un compuesto antisentido corto dirigido a

5 un ácido nucleico de ApoB que tiene una longitud de 12 monómeros. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de ApoB comprenden el uso de un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB que tiene una longitud de 13 monómeros. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de ApoB comprenden el uso de un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB que tiene una longitud de 14 monómeros. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de ApoB comprenden el uso de un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB que tiene una longitud de 15 monómeros. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de ApoB comprenden el uso de un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB que tiene una longitud de 16 monómeros.

10 En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de la expresión de ApoB comprenden el uso de un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB que comprende de 9 a 15 monómeros. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de la expresión de ApoB comprenden el uso de un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB que comprende de 10 a 15 monómeros. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de la expresión de ApoB comprenden el uso de un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB que comprende de 12 a 14 monómeros. En ciertas realizaciones, los métodos de modulación de la expresión de ApoB comprenden el uso de un compuesto antisentido corto dirigido a un ácido nucleico de ApoB que comprende de 12 ó 14 nucleótidos o nucleósidos.

15 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB pueden tener una cualquiera o más propiedades o características de los compuestos antisentido cortos generalmente descritos aquí. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB tienen un motivo (ala-salto desoxi-ala) seleccionado de 1-12-1, 1-1-10-2, 2-10-1-1, 3-10-3, 2-10-3, 2-10-2, 1-10-1, 1-10-2, 3-8-3, 2-8-2, 1-8-1, 3-6-3 ó 1-6-1, más preferiblemente 1-10-1, 2-10-2, 3-10-3 y 1-9-2.

Sales, profármacos y bioequivalentes

20 Los compuestos antisentido proporcionados aquí comprenden cualquier sal, ésteres o sales de dichos ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro equivalente funcional que, tras la administración a un animal, incluyendo un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o un residuo del mismo. De acuerdo con esto, por ejemplo, la descripción también se extiende a profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos antisentido, sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos, y otros bioequivalentes.

25 El término "profármaco" indica un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva o menos activa que se convierte en una forma activa (es decir, el fármaco) dentro del cuerpo o las células del mismo por acción de enzimas endógenas, productos químicos y/o condiciones. En particular, las versiones profármaco de los oligonucleótidos se preparan como derivados SATE ((S-acetil-2-tioetil)fosfato de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO 93/24510 o el documento WO 94/26764. Los profármacos también pueden incluir compuestos antisentido en los que uno o ambos extremos comprenden bases nucleotídicas que se escinden (por ejemplo, incorporando enlaces fosfodiéster en el esqueleto en los extremos) para producir el compuesto activo. En ciertas realizaciones, uno o más restos que no son fármacos se escinden de un profármaco, dando la forma activa. En ciertas de tales realizaciones, dichos restos que no son fármacos no son un nucleótido o un oligonucleótido.

30 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos aquí, es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto parental y que no producen efectos toxicológicos indeseados en el mismo. Las sales de sodio de los oligonucleótidos antisentido son útiles y bien aceptadas para administración terapéutica a seres humanos.

35 En ciertas realizaciones, se proporcionan sales, incluyendo, pero sin limitarse a, las sales de ácidos nucleicos bicatenarios (incluyendo, pero sin limitarse a, compuestos de ARNbc).

G. Ciertas composiciones farmacéuticas

40 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden uno o más compuestos antisentido cortos y uno o más excipientes. En ciertas de tales realizaciones, los excipientes se seleccionan de agua, disoluciones salinas, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilasa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona.

45 En ciertas realizaciones, se prepara una composición farmacéutica de la presente invención usando técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitarse a, métodos de mezclado, disolución, granulación, formación de pastillas, trituración, emulsión, encapsulación, atrapamiento o de formación de comprimidos.

50 En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de la presente invención es un líquido (por ejemplo, una suspensión, elixir y/o disolución). En ciertas de tales realizaciones, se prepara una composición farmacéutica líquida usando ingredientes conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes y agentes colorantes.

55

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de la presente invención es un sólido (por ejemplo, un polvo, comprimido y/o cápsula). En ciertas de tales realizaciones, se prepara una composición farmacéutica sólida que comprende uno o más oligonucleótidos usando ingredientes conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes y agentes disgregantes.

5 En ciertas realizaciones, se formula una composición farmacéutica de la presente invención como una preparación depot. Ciertas preparaciones depot son, típicamente, de acción más prolongada que las preparaciones que no son depot. En ciertas realizaciones, dichas preparaciones se administran mediante implantación (por ejemplo subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. En ciertas realizaciones, las preparaciones depot se preparan usando materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo una emulsión en un aceite
10 aceptable) o resinas de intercambio iónico, o en forma de derivados escasamente solubles, por ejemplo en forma de una sal escasamente soluble.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de la presente invención comprende un sistema de liberación. Ejemplos de sistemas de liberación incluyen, pero no se limitan a, liposomas y emulsiones. Ciertos sistemas de liberación son útiles para preparar ciertas composiciones farmacéuticas, incluyendo las que comprenden compuestos hidrófobos. En ciertas realizaciones, se usan ciertos disolventes orgánicos, tales como
15 dimetilsulfóxido.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de la presente invención comprende una o más moléculas de liberación específicas de tejido diseñadas para liberar el uno o más agentes farmacéuticos de la presente invención en tejidos o tipos de células específicos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las composiciones
20 farmacéuticas incluyen liposomas recubiertos con un anticuerpo específico de tejido.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de la presente invención comprende un sistema de co-disolvente. Ciertos de dichos sistemas de co-disolvente comprenden, por ejemplo, alcohol bencílico, un tensioactivo apolar, un polímero orgánico miscible en agua y una fase acuosa. En ciertas realizaciones, dichos sistemas de co-disolvente se usan para compuestos hidrófobos. Un ejemplo no limitante de dicho sistema de co-disolvente es el sistema de co-disolvente de VPD, que es una disolución de etanol absoluto que comprende 3% p/v de alcohol bencílico, 8% p/v del tensioactivo apolar, Polisorbato 80.TM y 65% p/v de polietilenglicol 300. Las proporciones de dichos sistemas de co-disolvente se pueden variar considerablemente sin alterar de forma significativa sus características de solubilidad y de toxicidad. Además, la identidad de los componentes del co-disolvente se puede variar: por ejemplo, se pueden usar otros tensioactivos en lugar de Polisorbato 80.TM; el tamaño de la fracción de polietilenglicol puede variarse; otros polímeros biocompatibles pueden sustituir al polietilenglicol, por ejemplo polivinilpirrolidona; y otros azúcares o polisacáridos pueden sustituir a la dextrosa.
25
30

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de la presente invención comprende un sistema de liberación sostenida. Un ejemplo no limitante de dicho sistema de liberación sostenida es una matriz semipermeable de polímeros hidrófobos sólidos. En ciertas realizaciones, los sistemas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar agentes farmacéuticos durante un periodo de horas, días, semanas o meses.
35

En ciertas realizaciones, se prepara una composición farmacéutica de la presente invención para administración oral. En ciertas de tales realizaciones, se formula una composición farmacéutica combinando uno o más oligonucleótidos con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Ciertos de dichos vehículos permiten formular las composiciones farmacéuticas en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un sujeto. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas para uso oral se obtienen mezclando oligonucleótidos y uno o más excipientes sólidos. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, cargas, tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa, tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). En ciertas realizaciones, dicha mezcla opcionalmente se tritura, y opcionalmente se añaden adyuvantes. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se forman para obtener comprimidos o núcleos de pastillas. En ciertas realizaciones se añaden agentes disgregantes (por ejemplo, polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico o una sal de los mismos, tal como alginato de sodio).
40
45

En ciertas realizaciones, los núcleos de pastillas se proporcionan con recubrimientos. En ciertas de tales realizaciones se pueden usar disoluciones de azúcar concentradas, que opcionalmente pueden comprender goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. A los recubrimientos de pastillas o comprimidos se pueden añadir colorantes o pigmentos.
50

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas para administración oral son cápsulas duras hechas de gelatina. Ciertas de dichas cápsulas duras comprenden uno o más agentes farmacéuticos de la presente invención mezclados con una o más cargas, tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas para administración oral son cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. En ciertas cápsulas blandas, uno o más agentes farmacéuticos de la presente invención se
55

disuelven o suspenden en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se preparan para administración bucal. Ciertas de dichas composiciones farmacéuticas son comprimidos o píldoras formuladas de un modo convencional.

5 En ciertas realizaciones, se prepara una composición farmacéutica para administración mediante inyección (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). En ciertas de tales realizaciones, una composición farmacéutica comprende un vehículo y se formula en disolución acuosa, tal como agua o tampones fisiológicamente compatibles, tales como disolución de Hank, disolución de Ringer o disolución salina tamponada fisiológicamente. En ciertas realizaciones se incluyen otros ingredientes (por ejemplo, ingredientes que ayudan a la solubilidad o sirven como conservantes). En ciertas realizaciones se preparan suspensiones inyectables usando vehículos líquidos adecuados, agentes de suspensión y similares. Ciertas composiciones farmacéuticas para inyección se presentan en forma de monodosis, por ejemplo en ampollas, o en envases con múltiples dosis. Ciertas composiciones farmacéuticas para inyección son suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Ciertos disolventes adecuados para uso en composiciones farmacéuticas para inyección incluyen, pero no se limitan a, disolventes lipófilos y aceites grasos tales como aceite de sésamo, ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, y liposomas. Las suspensiones inyectables acuosas pueden comprender sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, dichas suspensiones también pueden comprender estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los agentes farmacéuticos para permitir la preparación de disoluciones muy concentradas.

En ciertas realizaciones, se prepara una composición farmacéutica para administración transmucosal. En ciertas de tales realizaciones se usan en la formulación penetrantes adecuados para atravesar la barrera. Tales penetrantes se conocen generalmente en la técnica.

25 En ciertas realizaciones, se prepara una composición farmacéutica para administración por inhalación. Ciertas de dichas composiciones farmacéuticas se preparan en forma de un nebulizador de aerosol en un envase presurizado o nebulizador. Ciertas de dichas composiciones farmacéuticas comprenden un propelente, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En ciertas realizaciones que usan un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula que libera una cantidad medida. En ciertas realizaciones se pueden formular cápsulas y cartuchos para usar en un inhalador o insuflador. Ciertas de dichas formulaciones comprenden una mezcla en polvo de un agente farmacéutico de la invención y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

35 En ciertas realizaciones, se prepara una composición farmacéutica para administración rectal, tal como supositorios o enema de retención. Ciertas de dichas composiciones farmacéuticas comprenden ingredientes conocidos, tales como manteca de cacao y/u otros glicéridos.

En ciertas realizaciones, se prepara una composición farmacéutica para administración tópica. Ciertas de dichas composiciones farmacéuticas comprenden bases blandas de hidratación, tales como ungüentos o cremas. Ejemplos de bases adecuadas para ungüentos incluyen, pero no se limitan a, vaselina, vaselina más siliconas volátiles, lanolina y agua en emulsiones de aceite, tal como Eucerin.TM., disponible de Beiersdorf (Cincinnati, Ohio). Ejemplos de bases de crema adecuadas incluyen, pero no se limitan a, Crema Nivea.TM., disponible de Beiersdorf (Cincinnati, Ohio), crema fría (USP), Purpose Cream.TM., disponible en Johnson & Johnson (New Brunswick, N.J.), pomada hidrófila (USP) y Lubriderm.TM., disponible de Pfizer (Morris Plains, N.J.).

45 En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de la presente invención comprende un oligonucleótido en una cantidad terapéuticamente eficaz. En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una enfermedad o para prolongar la supervivencia del sujeto que se esté tratando. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz entra dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

50 En ciertas realizaciones, se formulan uno o más compuestos antisentido cortos de la presente invención como un profármaco. En ciertas realizaciones, tras la administración in vivo, un profármaco se convierte químicamente en la forma biológica, farmacéutica o terapéuticamente más activa del compuesto antisentido corto. En ciertas realizaciones, los profármacos son útiles debido a que son más fáciles de administrar que la forma activa correspondiente. Por ejemplo, en ciertos casos, un profármaco puede estar más biodisponible (por ejemplo, mediante administración oral) que su forma activa correspondiente. En ciertos casos, un profármaco puede tener mejor solubilidad en comparación con la forma activa correspondiente. En ciertas realizaciones, los profármacos son menos hidrosolubles que la forma activa correspondiente. En ciertos casos, dichos profármacos poseen superior transmisión a través de las membranas celulares, en los que la solubilidad en agua es perjudicial para la movilidad. En ciertas realizaciones, un profármaco es un éster. En ciertas de tales realizaciones, el éster se hidroliza metabólicamente en ácido carboxílico tras la administración. En ciertos casos, el compuesto que contiene ácido carboxílico es la forma activa correspondiente. En ciertas realizaciones, un profármaco comprende un péptido corto

(poliaminoácido) unido a un grupo ácido. En ciertas de tales realizaciones, el péptido se escinde tras la administración para formar la forma activa correspondiente.

En ciertas realizaciones, se produce un profármaco modificando un compuesto farmacéuticamente activo de modo que el compuesto activo se regenerará tras la administración in vivo. El profármaco se puede diseñar para alterar la estabilidad metabólica o las características de transporte de un fármaco, para enmascarar los efectos secundarios o la toxicidad, para mejorar el sabor de un fármaco o para alterar otras características o propiedades de un fármaco. En virtud de los conocimientos sobre los procesos farmacodinámicos y el metabolismo de los fármacos in vivo, los expertos en la técnica, una vez que se conoce el compuesto farmacéuticamente activo, pueden diseñar profármacos del compuesto (véase, por ejemplo, Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, Nueva York, páginas 388-392).

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende uno o más agentes farmacéuticos de la presente invención es útil para tratar afecciones o trastornos en un mamífero, y, particularmente, en un sujeto humano. Las vías de administración adecuadas incluyen, pero no se limitan a, las vías oral, rectal, transmucosal, intestinal, enteral, tópica, supositorios, mediante inhalación, intratecal, intraventricular, intraperitoneal, intranasal, intraocular y parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intramedular y subcutánea). En ciertas realizaciones se administran agentes farmacéuticos intratecales para alcanzar exposiciones locales en lugar de sistémicas. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas se pueden inyectar directamente en el área del efecto deseado (por ejemplo, en el área renal o cardíaca).

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos, en comparación con sus oligonucleótidos parentales, son particularmente adecuados para administración oral. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos están mejor adaptados para administración oral que sus oligonucleótidos parentales, debido a que tienen mayor potencia en comparación con dichos oligonucleótidos parentales. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos están mejor adaptados para administración oral que sus oligonucleótidos parentales, debido a que tienen mejores propiedades de estabilidad, disponibilidad o solubilidad en comparación con los oligonucleótidos parentales.

En un aspecto adicional, un agente farmacéutico es un oligonucleótido liofilizado estéril que se reconstituye con un diluyente adecuado, por ejemplo agua estéril para inyectables. El producto reconstituido se administra como una inyección subcutánea o como una infusión intravenosa tras la dilución en disolución salina. El producto farmacológico liofilizado consiste en un oligonucleótido que se ha preparado en agua para inyectables, ajustado a un pH 7,0-9,0 con un ácido o base durante la preparación y, después, se liofiliza. El oligonucleótido liofilizado puede ser 25-800 mg del oligonucleótido. Se entiende que esto abarca 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775 y 800 mg de oligonucleótido liofilizado. El producto farmacológico liofilizado puede envasarse en un vial de cristal transparente de tipo I de 2 ml (tratado con sulfato amónico), tapado con un cierre de caucho de bromobutilo y sellado con una cápsula de aluminio FLIP-OFF®.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender, adicionalmente, otros componentes adyuvantes encontrados convencionalmente en composiciones farmacéuticas a sus niveles de uso establecidos en la técnica. Por tanto, por ejemplo, las composiciones pueden comprender materiales adicionales compatibles, farmacéuticamente activos tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden comprender materiales adicionales útiles en la formulación física de varias formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como colorantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, dichos materiales, cuando se añaden, no deberían interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones se pueden esterilizar y, si se desea, mezclar con agentes adyuvantes, por ejemplo lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales de influencia sobre la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares, que no interactúan de forma perjudicial con el (los) oligonucleótido(s) de la formulación.

Los compuestos antisentido proporcionados aquí se pueden mezclar, encapsular, conjugar o, de otro modo, asociar con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos.

Aquí también se describen composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen los compuestos antisentido proporcionados aquí. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de diversos modos dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que se va a tratar. En una realización preferida, la administración es tópica en la superficie del tracto respiratorio, particularmente pulmonar, por ejemplo mediante nebulización, inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, por boca y/o nariz.

Las formulaciones farmacéuticas descritas aquí, que se pueden presentar de forma conveniente en forma de monodosis, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en contacto los ingredientes activos con el (los) vehículo(s) farmacéutico(s) o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto de forma uniforme y estrecha los ingredientes activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o con ambos y,

después, en caso necesario, dando forma al producto (por ejemplo, en un tamaño de partícula específico para liberación). En una realización preferida, las formulaciones farmacéuticas se preparan para administración pulmonar en un disolvente adecuado, por ejemplo agua o disolución salina normal, posiblemente en una formulación estéril, con vehículos u otros agentes para permitir la formación de gotas del diámetro deseado para liberación usando inhaladores, dispositivos de liberación nasal, nebulizadores y otros dispositivos para liberación pulmonar. Como alternativa, las formulaciones farmacéuticas se pueden formular como polvos secos para usar en inhaladores de polvo seco.

Un "vehículo farmacéutico" o "excipiente" puede ser un disolvente farmacéuticamente aceptable, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para liberar uno o más ácidos nucleicos a un individuo y se conocen en la técnica. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, con el modo de administración previsto en mente, de modo que proporcione el volumen y la consistencia, etc., deseados, cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica dada.

H. Ciertos usos terapéuticos

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido se usan para modular la expresión de un gen diana en un animal, tal como un ser humano. En ciertas realizaciones, dichos compuestos se pueden usar para tratar trastornos metabólicos, o modular una o más indicaciones de enfermedad. Por ejemplo, los métodos comprenden la etapa de administrar a dicho animal que necesite terapia por una enfermedad o afección asociada con un gen diana una cantidad eficaz de un compuesto antisentido que module la expresión del gen diana. Los compuestos antisentido proporcionados aquí que modulan de forma eficaz la expresión de un ARN diana o productos proteicos de la expresión se consideran compuestos antisentido activos. Los compuestos antisentido activos también pueden incluir compuestos que modulan de forma eficaz una o más de una serie de indicaciones de enfermedad, incluyendo indicaciones de enfermedad metabólica y cardiovascular, ejemplos de los cuales se describen más abajo.

La modulación de la expresión de un gen diana se puede medir en un fluido corporal, que puede o no contener células; tejido; u órgano del animal. Los métodos para obtener muestras para análisis, tales como fluidos corporales (por ejemplo, esputo, suero, orina), tejidos (por ejemplo, biopsia) u órganos, y los métodos de preparación de las muestras para permitir el análisis son bien conocidos para los expertos en la técnica. Los métodos para el análisis de ARN y los niveles de proteínas se tratan anteriormente, y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los efectos del tratamiento se pueden evaluar midiendo biomarcadores, o indicaciones de enfermedad, asociados con la expresión del gen diana en los fluidos, tejidos u órganos mencionados anteriormente, recogidos de un animal en contacto con uno o más compuestos descritos aquí, mediante métodos clínicos rutinarios conocidos en la técnica. Estos biomarcadores incluyen, pero no se limitan a: transaminasas hepáticas, bilirrubina, albúmina, nitrógeno ureico en sangre, creatinina y otros marcadores de la función renal y hepática; interleucinas, factores de necrosis tumoral, moléculas de adhesión intracelular, proteína C reactiva, quimiocinas, citocinas y otros marcadores de inflamación.

Los compuestos antisentido proporcionados aquí se pueden usar en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad eficaz de un compuesto a un diluyente o vehículo adecuado farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y diluyentes aceptables son bien conocidos por los expertos en la técnica. La selección de un diluyente o vehículo se basa en una serie de factores, incluyendo, pero sin limitarse a, la solubilidad del compuesto y la vía de administración. Dichas consideraciones son bien conocidas por los expertos en la técnica. En un aspecto, los compuestos antisentido descritos aquí inhiben la expresión de un gen diana. Los compuestos también se pueden usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con un gen diana.

También se contemplan métodos mediante los que los fluidos corporales, órganos o tejidos se ponen en contacto con una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos antisentido o las composiciones proporcionados aquí. Los fluidos corporales, órganos o tejidos se pueden poner en contacto con uno o más de los compuestos, dando como resultado la modulación de la expresión de un gen diana en las células de los fluidos corporales, órganos o tejidos. Una cantidad eficaz se puede determinar monitorizando el efecto modulador del compuesto antisentido o compuestos o composiciones sobre los ácidos nucleicos diana o sus productos mediante métodos rutinarios para el experto en la técnica.

Co-administración

En ciertas realizaciones, dos o más compuestos antisentido se administran de forma conjunta. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas incluyen uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Uno o más de dichos compuestos antisentido pueden ser un compuesto antisentido corto. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas incluyen dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana. Uno o más de dichos compuestos antisentido pueden ser un compuesto antisentido corto. Dos o más compuestos combinados se pueden usar juntos o de forma secuencial.

Administración conjunta

En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas se administran conjuntamente con uno o más agentes farmacéuticos distintos. En ciertas realizaciones, dichos uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar la misma enfermedad o afección a la de las una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. En ciertas realizaciones, dichos uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar una enfermedad o afección distinta a la de las una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. En ciertas realizaciones, dichos uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar un efecto indeseado de las una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran conjuntamente con otro agente farmacéutico para tratar un efecto indeseado de dicho otro agente farmacéutico. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más agentes farmacéuticos distintos se administran al mismo tiempo. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más agentes farmacéuticos distintos se administran en momentos diferentes. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más agentes farmacéuticos distintos se preparan juntos en una única formulación. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención y uno o más agentes farmacéuticos distintos se preparan por separado.

En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos que se pueden administrar de forma conjunta con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen agentes hipolipemiantes. En ciertas de tales realizaciones, los agentes farmacéuticos que se pueden administrar de forma conjunta con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, atorvastatina, simvastatina, rosuvastatina y ezetimiba. En ciertas de tales realizaciones, el agente hipolipemiante se administra antes de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas de tales realizaciones, el agente hipolipemiante se administra después de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas de tales realizaciones, el agente hipolipemiante se administra al mismo tiempo que la composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas de tales realizaciones, la dosis de un agente hipolipemiante coadministrado es la misma que la dosis que se administraría si el agente hipolipemiante se administrara solo. En ciertas de tales realizaciones, la dosis de un agente hipolipemiante coadministrado es menor que la dosis que se administraría si el agente hipolipemiante se administrara solo. En ciertas de tales realizaciones, la dosis de un agente hipolipemiante coadministrado es mayor que la dosis que se administraría si el agente hipolipemiante se administrara solo.

En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un inhibidor de la HMG-CoA reductasa. En ciertas de tales realizaciones, el inhibidor de la HMG-CoA reductasa es una estatina. En ciertas de tales realizaciones, la estatina se selecciona de atorvastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina y rosuvastatina. En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un inhibidor de la absorción de colesterol. En ciertas de tales realizaciones, el inhibidor de la absorción de colesterol es ezetimiba. En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un inhibidor de la HMG-CoA reductasa formulado conjuntamente con un inhibidor de la absorción de colesterol. En ciertas de tales realizaciones, el agente hipolipemiante formulado conjuntamente es ezetimiba/simvastatina. En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un inhibidor de la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal.

En ciertas realizaciones, un agente farmacéutico coadministrado es un secuestrante de ácidos biliares. En ciertas de tales realizaciones, el secuestrante de ácidos biliares se selecciona de colestiramina, colestipol y colestevlam.

En ciertas realizaciones, un agente farmacéutico coadministrado es un ácido nicotínico. En ciertas de tales realizaciones, el ácido nicotínico se selecciona de ácido nicotínico de liberación inmediata, ácido nicotínico de liberación extendida y ácido nicotínico de liberación sostenida.

En ciertas realizaciones, un agente farmacéutico coadministrado es un ácido fibríco. En ciertas de tales realizaciones, el ácido fibríco se selecciona de gemfibrozilo, fenofibrato, clofibrato, bezafibrato y ciprofibrato.

Otros ejemplos de agentes farmacéuticos que se pueden administrar de forma conjunta con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, corticosteroides, incluyendo, pero sin limitarse a, prednisona; inmunoglobulinas, incluyendo, pero sin limitarse a, inmunoglobulina intravenosa (IgIV); analgésicos (por ejemplo, acetaminofeno); agentes antiinflamatorios, incluyendo, pero sin limitarse a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, ibuprofeno, inhibidores de la COX-1 e inhibidores de la COX-2); salicilatos; antibióticos; antivirales; agentes antifúngicos; agentes antidiabéticos (por ejemplo, biguanidas, inhibidores de la glucosidasa, insulinas, sulfonilureas y tiazolidendionas); modificadores adrenérgicos; diuréticos; hormonas (por ejemplo, esteroides anabólicos, andrógenos, estrógenos, calcitonina, progestina, somatostatina y hormonas tiroideas); inmunomoduladores; relajantes musculares; antihistamínicos, agentes antiosteoporosis (por ejemplo, bisfosfonatos, calcitonina y estrógenos); prostaglandinas, agentes antineoplásicos; agentes psicoterapéuticos; sedantes; productos del roble venenoso del atlántico o de zumaque venenoso; anticuerpos; y vacunas.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de forma conjunta con una terapia hipolipemiante. En ciertas de tales realizaciones, una terapia hipolipemiante es un cambio terapéutico del estilo de vida. En ciertas de tales realizaciones, una terapia hipolipemiante es aféresis de LDL.

I. Kits, reactivos de investigación y diagnósticos

Los compuestos antisentido proporcionados aquí se pueden utilizar para diagnóstico y como reactivos y kits de investigación. Además, los compuestos antisentido que pueden inhibir la expresión génica o modular la expresión génica con especificidad, a menudo son usados por los expertos en la técnica para aclarar la función de genes concretos o distinguir entre funciones de varios miembros de una vía biológica.

- 5 Para usar en kits y diagnósticos, los compuestos antisentido descritos aquí, bien solos o en combinación con otros compuestos o terapéuticos, se pueden usar como herramientas en análisis diferencial y/o de combinación para aclarar los patrones de expresión de una porción o todo el complemento de genes expresados dentro de las células o tejidos. Los métodos de análisis de la expresión génica son bien conocidos por los expertos en la técnica.

J. Ciertas ventajas de los compuestos antisentido cortos

- 10 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen ventajas cuando se comparan con sus oligonucleótidos parentales. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen mayor afinidad por un ácido nucleico diana que su oligonucleótido parental. En ciertas realizaciones, compuestos antisentido cortos tienen mayor potencia in vitro que su oligonucleótido parental. En ciertas de tales realizaciones, la mayor potencia in vitro no está completamente explicada por su mayor afinidad. En ciertas de tales realizaciones, dicha mayor potencia in vitro se puede atribuir a un incremento de la capacidad de los compuestos antisentido cortos para penetrar en las células y/o a la mayor capacidad para acceder a los ácidos nucleicos diana en una célula. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen mayor potencia in vivo que sus oligonucleótidos parentales. En ciertas realizaciones, dicha mayor potencia in vivo no se puede atribuir al incremento de la potencia in vitro o al incremento de la afinidad. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido cortos tienen incluso mayor potencia in vivo en comparación con sus oligonucleótidos parentales de lo que se predeciría en base a sus potencias in vitro o en las afinidades. En ciertas realizaciones, dicho incremento de la potencia in vivo puede atribuirse al incremento de la biodisponibilidad, mejor penetración en la célula, mejor acceso al ácido nucleico diana una vez que está en la célula, o a otros factores.

- 25 En ciertas realizaciones, cabría esperar que los compuestos antisentido cortos fueran menos específicos de su ácido nucleico diana en comparación con sus oligonucleótidos parentales. En ciertas de tales realizaciones, cabría esperar un incremento de los efectos secundarios, incluido el potencial de efectos tóxicos, de los compuestos antisentido cortos. En ciertas realizaciones, dichos efectos secundarios adicionales no se observan. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos no diana a los que se puede unir un compuesto antisentido corto no están disponibles para el compuesto antisentido corto. En dichas realizaciones, los efectos secundarios, incluida la toxicidad, son menos problemáticos de lo que cabría esperar.

- 30 En ciertas realizaciones, debido a que son más pequeños, es menos probable que los compuestos antisentido cortos se unan a proteínas. En ciertas de tales realizaciones, dicha menor unión de proteínas tiene como resultado menor toxicidad, ya que la unión a proteínas puede tener consecuencias no deseadas. En ciertas realizaciones, dicha menor unión de proteínas da como resultado mayor potencia, ya que deja más compuesto antisentido disponible para el efecto terapéutico. En ciertas realizaciones, la menor unión de proteínas da como resultado una menor toxicidad por interacción farmacológica.

Ejemplo 1

Cultivo celular y tratamiento con compuestos antisentido cortos

- 40 El efecto de los compuestos antisentido cortos sobre la expresión del ácido nucleico diana se puede analizar en una cualquiera de una serie de estirpes celulares cultivadas o primarias. Las estirpes celulares se pueden obtener de fuentes disponibles para el público, tal como la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células se cultivan de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos normales en la técnica.

- 45 Cuando las células alcanzaron la confluencia adecuada, se trataron con oligonucleótido usando LIPOFECTIN®, según se describe. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 65-75% se trataron con oligonucleótido. El oligonucleótido se mezcló con LIPOFECTIN® Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) en medio Opti-MEM®-1 con reducción de suero (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) para alcanzar la concentración deseada del oligonucleótido y una concentración de LIPOFECTIN® de 2,5 ó 3 µg/ml por oligonucleótido 100 nM. Esta mezcla de transfección se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 0,5 horas. Para las células cultivadas en placas de 96 pocillos, las células se lavaron una vez con 100 µl de OPTI-MEM®-1 y después se trataron con 130 µl de la mezcla de transfección. Las células cultivadas en placas de 24 pocillos u otras placas de cultivo tisular estándar se trataron de forma similar, usando volúmenes adecuados de medio y de oligonucleótido. Las células se trataron, y los datos se obtuvieron por duplicado o por triplicado. Tras aproximadamente 4-7 horas de tratamiento a 37°C, el medio que contenía la mezcla de transfección se reemplazó con medio de cultivo fresco. Las células se recogieron 16-24 horas después del tratamiento con oligonucleótido.

- 55 Se usan oligonucleótidos control para determinar la concentración óptima del compuesto oligomérico para una estirpe celular concreta. Además, cuando los compuestos oligoméricos se analizan en experimentos de detección selectiva de compuestos oligoméricos o ensayos fenotípicos, los oligonucleótidos control se analizan en paralelo.

La concentración del oligonucleótido usado varía de una estirpe celular a otra estirpe celular. Para determinar la concentración óptima del oligonucleótido para una estirpe celular concreta, se trata a las células con un oligonucleótido control positivo a un intervalo de concentraciones. La concentración del oligonucleótido control positivo que da como resultado un 80% de inhibición del ARNm diana se usa después como concentración de detección selectiva para nuevos oligonucleótidos en experimentos posteriores para dicha estirpe celular. Si no se alcanza un 80% de inhibición, la concentración menor del oligonucleótido control positivo que da como resultado un 60% de inhibición del ARNm diana se usa después como concentración de detección selectiva del oligonucleótido en experimentos posteriores para dicha estirpe celular. Si no se alcanza 60% de inhibición, se estima que dicha estirpe celular concreta es inadecuada para los experimentos de transfección de oligonucleótidos. Las concentraciones de los oligonucleótidos antisentido usadas aquí son de 50 nM a 300 nM cuando el oligonucleótido antisentido se transfecta usando un reactivo de liposoma y 1 nM a 40 nM cuando el oligonucleótido antisentido se transfecta mediante electroporación.

Ejemplo 2: Análisis con PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de ARNm diana

La cuantificación de los niveles de ARNm diana se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7600, 7700, ó 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Antes del análisis de PCR cuantitativa, los equipos cebador-sonda específicos del gen diana que se está midiendo se evaluaron según su capacidad de “multiplexar” con una reacción de amplificación por GAPDH. Tras el aislamiento, el ARN se somete a reacción secuencia de transcriptasa inversa (RT) y PCR en tiempo real, ambas realizadas en el mismo pocillo. Los reactivos para RT y PCR se obtuvieron de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA). La PCR con RT en tiempo real se llevó a cabo en el mismo, añadiendo 20 µl de cóctel de PCR (2,5 x tampón de PCR menos MgCl₂, MgCl₂ 6,6 mM, 375 µM cada uno de dATP, dCTP, dGTP, 375 nM de cada cebador directo y cebador inverso, 125 nM de sonda, 4 unidades de inhibidor de RNasa, 1,25 unidades de PLATINUM® Taq, 5 unidades de transcriptasa inversa MuLV y 2,5 x pigmento de Rox) a placas de 96 pocillos que contienen 30 µl de disolución de ARN total (20-200 ng). La reacción de RT se llevó a cabo mediante incubación durante 30 minutos a 48°C. Tras una incubación de 10 minutos a 95°C para activar la PLATINUM® Taq, se llevaron a cabo 40 ciclos de un protocolo de PCR de dos etapas: 95°C durante 15 segundos (desnaturalización), seguido de 60°C durante 1,5 minutos (hibridación/extensión).

Las cantidades del gen diana obtenidos mediante PCR en tiempo real con RT se normalizaron usando el nivel de expresión de GAPDH, un gen cuya expresión es constante, o cuantificando el ARN total usando RiboGreen® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). La expresión de GAPDH se cuantificó mediante PCR en tiempo real con RT realizada simultáneamente con la diana, multiplexando, o por separado. El ARN total se cuantificó usando reactivo de cuantificación de ARN RiboGreen® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR).

En una placa de 96 pocillos que contenía 30 µl de ARN celular purificado se pipetearon 170 µl de reactivo de trabajo RiboGreen® (reactivo RiboGreen® diluido a 1:350 en Tris-Hcl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). La placa se leyó en un lector CytoFluor® 4000 (PE Applied Biosystems) con excitación de 485 nm y emisión a 530 nm.

Las sondas para PCR de GAPDH tiene JOE unido covalentemente en el extremo 5' y TAMRA o MGB unidos covalentemente al extremo 3', en el que JOE es el colorante indicador fluorescente y TAMRA o MGB es el colorante inactivador. En algunos tipos de células se usan cebadores y sondas diseñados para una secuencia de GAPDH de una especie diferente, para medir la expresión de GAPDH. Por ejemplo, un equipo de sonda y cebador para GAPDH humano se usa para medir la expresión de GAPDH en células y estirpes celulares derivadas de mono.

Las sondas y cebadores para uso en PCR en tiempo real se diseñaron para hibridar con los ácidos nucleicos diana a través de métodos de rutina. Por ejemplo, el software PrimerExpress® (Applied Biosystems, Foster City, CA) se usa de forma rutinaria para diseñar sondas y cebadores para uso en PCR en tiempo real. Los ejemplos de secuencias de cebadores y sondas y de los ácidos nucleicos diana con los que hibridan se presentan en la Tabla 3. Las sondas para PCR específicas de la diana tienen FAM unido covalentemente al extremo 5' y TAMRA o MGB unidos covalentemente al extremo 3', donde FAM es el colorante fluorescente y TAMRA o MGB es el colorante inactivador.

Tabla 3

Cebadores y sondas específicos de diana para uso en PCR en tiempo real				
Nombre de la diana	Especie	Descripción de la secuencia	Secuencia (5' a 3')	SEC ID NO
ApoB	Ratón	Cebador directo	CGTGGGCTCCAGCATTCTA	1524
ApoB	Ratón	Cebador inverso	AGTCATTTCTGCCTTTGCGTC	1525

ApoB	Ratón	Sonda	CCAATGGTCGGGCACTGCTCAA	1526
ApoB	Ratón	Cebador directo	GAAAATAGACTTCCTGAATAACTATGCATT	1527
ApoB	Ratón	Cebador inverso	ACTCGCTTGCCAGCTTGC	1528
ApoB	Ratón	Sonda	TTTCTGAGTCCCCGTGCCCAACA	1529
GCGR	Ratón	Cebador directo	TGAGCCTTGCCACCTTCTCT	1530
GCGR	Ratón	Cebador inverso	GCGCACCCCAGCCAA	1531
GCGR	Ratón	Sonda	AGAGGAGCTTCTTTTCCCTCTACCTGGGC	1532
GCGR	Ratón	Cebador directo	ATTTCTGCCCTGGTACCT	1533
GCGR	Ratón	Cebador inverso	CGGGCCACACCTCTTG	1534
GCGR	Ratón	Sonda	CCACAAAGTGCAGCACCGCCTAGTGT	1535
PTEN	Ratón	Cebador directo	GCCACAGGCTCCCAGACAT	1536
PTEN	Ratón	Cebador inverso	TCCATCCTCTTGATATCTCCTTTTG	1537
PTEN	Ratón	Sonda	ACAGCCATCATCAAAGAGATCGTTAGCAGAA	1538
PTEN	Ratón	Cebador directo	ATGACAATCATGTTGCAGCAATTC	1539
PTEN	Ratón	Cebador inverso	CGATGCAATAAATATGCACAAATCA	1540
PTEN	Ratón	Sonda	CTGTAAAGCTGGAAAGGGACGGACTGGT	1541

Ejemplo 3: Compuestos antisentido cortos dirigidos a un ácido nucleico de ApoB y que tiene modificaciones 2'-MOE o metilenoxi (4'-CH₂O-2') BNA

5 En ratones Balb/c machos de seis semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) se inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) compuestos antisentido dirigidos a ApoB, a una frecuencia de dos veces a la semana durante tres semanas. Las dosis de compuestos antisentido incluyeron 2,4, 1,2, 0,6, 0,3 y 0,15 $\mu\text{mol/kg}$. Para los compuestos antisentido de 14 nucleótidos de longitud, estas dosis corresponden a aproximadamente 12, 6, 3, 1,5 ó 0,75 mg/kg, respectivamente. En la Tabla 4 se muestran las secuencias y motivos de los compuestos antisentido usados en este estudio. Los compuestos antisentido tienen una longitud de 20 ó 14 nucleótidos, y tienen una región de “salto” central que consiste en diez 2'-desoxinucleótidos flanqueados por alas que tienen “alas” modificadas con 2'-O-metoxietilo (2'-MOE) o BNA. Por ejemplo, el motivo del gámpero 2-10-2 MOE indica un compuesto antisentido con un salto de diez nucleótidos flanqueado por alas de 2 nucleótidos con modificaciones 2'-MOE. Los residuos en **negrita** indican restos 2'-O-metoxietilo, y los residuos en *cursiva* indican metilenoxi (4'-CH₂O-2') BNAs. Los enlaces internucleosídicos de cada compuesto son, en todos, fosforotioato. Todos los residuos de citosina de ISIS 147764 e ISIS 372938 se reemplazan con 5-metilcitosinas. Para ISIS 387462, sólo el residuo de citosina en el ala del compuesto está sustituido por 5-metilcitosina. Los compuestos antisentido para ApoB están dirigidos a las secuencias de ApoB-100 disponibles públicamente, incluido el número de acceso en Genbank XM_137955.5 (SEC ID NO: 2).

Tabla 4: Compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de ApoB

Nº ISIS	SEC ID NO de la diana	Sitio diana en 5'	Secuencia (5'-3')	Motivo gámpero	SEC ID NO
147764	2	8865	GTCCCTGAAGATGTCAATGC	5-10-5 MOE	1561
372938	2	8235	GGTACATGGAAGTC	2-10-2 MOE	190
387462	2	8235	GGTACATGGAAGTC	2-10-2 metilenoxi (4'-CH ₂ O-2') BNA	190

20

5 Cuarenta y ocho horas después de la inyección final, se sacrificó a los ratones para evaluar las transaminasas (Tabla 5); el peso del hígado y los riñones (Tabla 6); los niveles de triglicéridos, LDL, HDL y ácidos grasos libres (Tabla 7); niveles de ARNm diana en el hígado (Tabla 8); niveles de proteína diana en plasma; y concentración de oligonucleótidos en tejido (Tabla 9). Estos criterios de valoración se determinaron usando métodos descritos aquí y son muy conocidos por los expertos en la técnica.

Tabla 5: Niveles de ALT y AST (U/l)

Nº ISIS	Dosis $\mu\text{mol/kg}$	ALT	AST
Disolución salina	N/A	27,8	46,3
147764	2,4	29,5	64,0
372938	2,4	26,0	49,0
372938	1,2	24,8	49,5
372938	0,6	28,0	79,3
372938	0,3	28,3	60,0
372938	0,15	28,3	50,3
387462	2,4	41,3	84,0
387462	1,2	35,3	63,5
387462	0,6	32,0	77,3
387462	0,3	27,8	55,0
387462	0,15	29,3	68,3

Tabla 6: Peso del hígado y los riñones (% de disolución salina control)

Nº ISIS	Dosis $\mu\text{mol/kg}$	Hígado	Riñón
Disolución salina	N/A	100	100
147764	2,4	102	105
372938	2,4	100	100
372938	1,2	90	101
372938	0,6	96	112
372938	0,3	91	107
372938	0,15	96	98
387462	2,4	116	90
387462	1,2	113	90
387462	0,6	106	97
387462	0,3	101	126
387462	0,15	95	100

El peso corporal total y el consumo de alimentos no difirieron significativamente entre los animales tratados con disolución salina o con oligonucleótidos. Los niveles de glucosa también fueron similares en todos los grupos de tratamiento.

Tabla 7: Niveles de triglicéridos (TRIG), colesterol total (COL), HDL, LDL y ácidos grasos libres (AGL)

Nº ISIS	Dosis $\mu\text{mol/kg}$	TRIG (mg/dl)	COL (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	AGL (mg/dl)
Disolución salina	N/A	167	107	81,8	11,0	1,76
147764	2,4	167	107	81,3	10,3	1,29
372938	2,4	153	104	79,0	10,3	1,28
372938	1,2	136	101	77,8	9,5	1,70
372938	0,6	184	110	83,3	10,8	1,66
372938	0,3	138	109	84,3	11,0	1,53
372938	0,15	151	106	82,8	10,8	1,57
387462	2,4	49	14	9,0	1,5	0,74
387462	1,2	71	23	16,5	2,0	0,76
387462	0,6	150	55	39,3	3,7	1,43
387462	0,3	136	92	72,8	7,5	1,14
387462	0,15	163	104	81,5	9,3	1,47

5

Tabla 8: % de niveles de ARNm de ApoB (respecto a la disolución salina control)

Nº ISIS	2,4 $\mu\text{mol/kg}$	1,2 $\mu\text{mol/kg}$	0,6 $\mu\text{mol/kg}$	0,3 $\mu\text{mol/kg}$	0,15 $\mu\text{mol/kg}$
147764	57,7	ND	ND	ND	ND
372938	77,0	90,0	87,3	92,6	93,1
387462	1,5	8,5	27,4	58,9	75,8

10

El tratamiento con ISIS 387462 dio como resultado una significativa reducción dependiente de la dosis de los niveles de triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL y ácidos grasos libres. De acuerdo con estos hallazgos fenotípicos, el tratamiento con ISIS 387462 también condujo a una reducción dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de ApoB (Tabla 8) y de proteínas (no mostrado) en plasma de ratón. Para determinar si el incremento observado en la eficiencia con el gámpero metilenoxi (4'-CH₂O-2') BNA se debe a un incremento de la acumulación de oligonucleótidos, se determinó la concentración de los oligonucleótidos de longitud completa y totales en hígado y riñón.

15

Tabla 9: Concentración tisular de compuestos antisentido de longitud completa y total (μM) respecto al nivel de ARNm de ApoB (% de disolución salina control)

Nº ISIS	Dosis $\mu\text{mol/kg}$	Longitud completa en riñón	Longitud completa en hígado	Total en riñón	Total en hígado	ARNm de ApoB
147764	2,4	28,6	22,9	33,5	31,3	58
372938	2,4	32,0	5,49	34,0	7,76	77
387462	2,4	37,2	5,69	38,9	7,31	1,5

387462	1,2	29,8	3,71	31,3	4,91	8,5
387462	0,6	18,9	1,97	20,0	2,57	27
387462	0,3	9,11	0,73	9,49	0,78	59
387462	0,15	6,97	0,19	7,43	0,24	76

5 Los niveles del gápmo 2-10-2 metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA fueron similares a los de los gápmos 5-10-5 y 2-10-2 MOE en el riñón, pero se redujeron significativamente en el hígado. La EC₅₀ para ISIS 387462 en el hígado se determinó comparando la concentración del oligonucleótido en el hígado con la inhibición de ARNm de ApoB. La EC₅₀ aproximada para ISIS 387462 es 1 μM. Por el contrario, un compuesto gápmo eficaz 5-10-5 MOE tiene típicamente una EC₅₀ de aproximadamente 15 μM en el hígado.

10 Tomados juntos, estos resultados demuestran que el gápmo corto de ApoB que tiene metilenoxi (4'-CH₂-O-2') en las alas es un potente inhibidor de la expresión de ARNm diana y puede reducir de forma eficaz los niveles de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos libres. La potencia del compuesto antisentido corto no parece ser el resultado del incremento de la acumulación en tejido, ya que se han observado niveles similares del compuesto en el riñón y en el hígado se encontraron niveles reducidos en relación con el gápmo 5-10-5 MOE. Además, el gápmo metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA exhibió pocos o ningún efecto secundario adverso.

Ejemplo 4. Estudio de respuesta a la dosis de administración de una sola dosis con compuestos antisentido cortos dirigidos a ácidos nucleicos de ApoB y de PTEN

15 En ratones Balb/c machos de seis semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) se administró una única inyección intraperitoneal (i.p.) del compuesto antisentido a una dosis de 8, 4, 2 ó 1 μmol/kg. Cada grupo de dosis estaba constituido por cuatro animales. En la Tabla 10 se muestran la secuencia, la química del ala, y los motivos de cada compuesto antisentido usados en este estudio. Los residuos en cursiva indican las modificaciones metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, los residuos subrayados indican las modificaciones N-metil-oxiamino (4'-CH₂-N(CH₃)-O-2') BNA, 20 y los residuos en recuadros indican las modificaciones α-L-metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA. Todos los compuestos antisentido comprenden enlaces fosforotioato en cada posición. Cada citosina de ISIS 116847 y los residuos de citosina en las alas con metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA de ISIS 392063 están sustituidas con 5-metilcitosinas, mientras que los residuos de timidina en las alas con metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA de ISIS 392745 están sustituidas con 5-metilimidinas. Los compuestos antisentido de PTEN están dirigidos a los ácidos nucleicos de PTEN publicados, 25 incluido el número de acceso en Genbank U92437.1 (SEC ID NO: 13). Los compuestos antisentido de ApoB están dirigidos a los ácidos nucleicos de ApoB publicados, incluido el número de acceso en Genbank XM_137955.5 (SEC ID N°: 2).

Tabla 10: Compuestos antisentido cortos dirigidos a ácidos nucleicos de ApoB y de PTEN

N° ISIS	Diana	SEC ID de la diana	Sitio diana en 5'	SECUENCIA	Gápmo	SEC ID NO
387462	ApoB	19	8235	GGTACATGGAAGTC	2-10-2 Metilenoxi BNA	193
392063	PTEN	29	3099	CTAAGCACTGGCCt	2-10-2 Metilenoxi BNA	1226
396565	PTEN	29	3099	<u>C</u> UTAGCACTGGCC <u>U</u>	2-10-2 N-Me-oxiamino BNA	1126
396006	PTEN	29	3099	C UTAGCACTGGCC C	2-10-2 α-L-metilenoxi BNA	1226

30 Tabla 11: % de reducción de ARNm de ApoB y PTEN (respecto a la disolución salina control)

N° ISIS	Dosis (μmol/kg)	% de reducción de ARNm de ApoB (respecto a la disolución salina)	% de reducción de ARNm de PTEN (respecto a la disolución salina)
387462	8	0,62	92,8
	4	6,55	103

	2	18,6	105
	1	42,0	98,0
392063	8	126	6,79
	4	111	18,1
	2	112	42,4
	1	114	62,3
396565	8	116	23,8
	4	1,04	46,6
	2	94,4	76,1
	1	115	89,5
396006	8	94,3	62,9
	4	101	18,2
	2	79,7	52,4
	1	111	82,4

5 Como se muestra en la Tabla 11, cada compuesto antisentido corto que tiene modificaciones metilenoxi BNA demostró una reducción dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de la diana. Cabe destacar que el compuesto antisentido corto con las alas N-metil-oxiamino BNA (ISIS 396565) también demostró una reducción dependiente de la dosis de la expresión de PTEN similar a la de los compuestos antisentido cortos con β -D-metilenoxi BNA y α -L-metilenoxi BNA. Después se calcularon las concentraciones ED₅₀ estimadas para cada antisentido usando Graphpad Prism. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 12.

Tabla 12: Concentraciones ED₅₀ estimadas

Química del ala	Nº ISIS	ED ₅₀ (μ mol/kg)	ED ₅₀ (mg/kg)
Metilenoxi BNA	387462	0,8	3,9
Metilenoxi BNA	392063	1,5	7
N-Me-oxiamino BNA	396565	3,8	17,4
α -L-metilenoxi BNA	396006	2,1	9,3

10 Ejemplo 5: Inhibición antisentido de ApoB por compuestos antisentido cortos

15 Los compuestos antisentido cortos mostrados en la Tabla 13 se analizaron en busca de sus efectos in vivo. En ratones Balb/c machos de seis semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) se administraron dosis intraperitoneales de 3,2, 1, 0,32, ó 0,1 μ mol/kg dos veces a la semana durante tres semanas. Se usó un gámpero 5-10-5 MOE como tratamiento control. Se sacrificó a los ratones aproximadamente 48 horas después de la última dosis. Se recogió tejido hepático para aislar el ARN, y se recogió sangre para análisis químico en suero. Los niveles de ARNm de ApoB se midieron usando PCR cuantitativa en tiempo real, tal como se ha descrito aquí. Los niveles de ARNm de ApoB se normalizaron con los niveles de ARN determinado mediante RIBOGREEN y se presentan en la Tabla 14 como el porcentaje de inhibición respecto a los niveles de ARNm de ApoB en animales control tratados con disolución salina.

20

Tabla 13: Compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de ApoB

Nº ISIS	Secuencia (5'-3')	Motivo gápmero	SEC ID Nº
387462	GGTACATGGAAGTC	2-10-2 metilenoxi BNA	190
398296	GGTACATGGAAGTC	2-10-2 6'-(S)-metil metilenoxi BNA	190

Tabla 14: Inhibición antisentido de ApoB por compuestos antisentido cortos que comprenden BNA

Nº ISIS	Dosis (umol/kg)	% Inhib
379818	1	56
387462	0,1	33
	0,32	57
	1	93
	3,2	99
398296	0,1	17
	0,32	35
	1	80
	3,2	98

- 5 La Tabla 14 muestra que los niveles de ARNm de ApoB se reducían de un modo dependiente de la dosis tras tratamiento con compuestos antisentido cortos que tienen un motivo de gápmero 2-10-2 y modificaciones de BNA en las alas. A la dosis de 1 umol/kg, la inhibición de ApoB por los compuestos antisentido cortos fue mayor de lo observado con un gápmero 5-10-5 MOE a una dosis equivalente. El colesterol se redujo a las dosis de 1 y 3,2 umol/kg de compuesto antisentido corto.
- 10 Los compuestos antisentido cortos exhibían pocos o ningún efecto secundario adverso, como se juzgó por los pesos de los órganos y del cuerpo, los niveles de transaminasas en suero, de bilirrubina, nitrógeno ureico en sangre y creatinina.

Ejemplo 6: Administración de una sola dosis de compuestos antisentido cortos que comprenden modificaciones BNA

- 15 En ratones Balb/c machos de seis semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) se administró una única inyección intraperitoneal del compuesto antisentido a una dosis de 8, 4, 2 ó 1 μmol/kg. Los compuestos antisentido cortos analizados fueron ISIS 387462 e ISIS 398296. Cada grupo de dosis estaba constituido por cuatro animales. Se usó un gápmero 5-10-5 MOE como tratamiento control. Se sacrificó a los ratones aproximadamente 48 horas después de la última dosis. Se recogió tejido hepático para aislar el ARN y se recogió sangre para análisis químico
- 20 en suero. Los niveles de ARNm de ApoB se midieron usando PCR cuantitativa en tiempo real, tal como se ha descrito aquí. Los niveles de ARNm de ApoB se normalizaron con los niveles de ARN determinado mediante RIBOGREEN, y se presentan en la Tabla 15 como el porcentaje de inhibición respecto a los niveles de ARNm de ApoB en animales control tratados con disolución salina.

Tabla 15: Inhibición antisentido de ApoB por compuestos antisentido cortos que comprenden BNA

Nº ISIS	Dosis (umol/kg)	% Inhib
379818	8	77
387462	8	99
	4	93

	2	81
	1	58
398296	8	97
	4	81
	2	54
	1	19

La Tabla 15 muestra que los niveles de ARNm de ApoB se reducían de un modo dependiente de la dosis tras una única administración de compuestos antisentido cortos que tienen un motivo de gápmero 2-10-2 y modificaciones de BNA en las alas. A la dosis de 8 umol/kg, la inhibición de ApoB por los compuestos antisentido cortos fue mayor de lo observado con un gápmero 5-10-5 MOE a una dosis equivalente. La ED₅₀ de ISIS 387462 fue 3,9 mg/kg y la ED₅₀ de ISIS 398296 fue 8,7 mg/kg. El colesterol también se redujo de un modo dependiente de la dosis. Los triglicéridos se redujeron a la dosis más elevada.

Los compuestos antisentido cortos exhibían pocos o ningún efecto secundario adverso, como se juzga por los pesos de los órganos y del cuerpo, los niveles de transaminasas en suero, de bilirrubina, nitrógeno ureico en sangre y creatinina.

Ejemplo 7: Inhibición antisentido de ApoB por compuestos antisentido cortos que comprenden conjugados de ácido palmítico

Se administró una única inyección intraperitoneal del compuesto antisentido a una dosis de 2,5, 1,0, 0,4 y 0,16 umol/kg a ratones Balb/c machos de seis semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Cada grupo de dosis estaba constituido por cuatro animales. Los compuestos analizados se muestran en la Tabla 16. Se usó un gápmero 5-10-5 MOE como tratamiento control. Se sacrificó a los ratones aproximadamente 48 horas después de la última dosis. Se recogió tejido hepático para aislar el ARN y se recogió sangre para análisis químico en suero. Los niveles de ARNm de ApoB se midieron usando PCR en tiempo real, tal como se ha descrito aquí. Los niveles de ARNm de ApoB se normalizaron con los niveles de ARN determinado mediante RIBOGREEN, y se presentan en la Tabla 17 como el porcentaje de inhibición respecto a los niveles de ARNm de ApoB en animales control tratados con disolución salina.

Tabla 16: Compuestos antisentido cortos que comprenden conjugados de palmítico

Nº ISIS	Secuencia (5'-3')	Motivo gápmero	SEC ID NO
387462	GGTACATGGAAGTC	2-10-2 metilenoxi BNA	190
391871	GGTACATGGAAGTC	1-1-10-2 2'-(butilacetomido)-palmitamida/MOE/MOE citosinas no modificadas en el salto (es decir, 2-10-2 MOE con 2'-(butilacetomido)-palmitamida substituida en el nucleótido en 5')	190
391872	GGTACATGGAAGTC	1-1-10-2 2'-(butilacetomido)-palmitamida metilenoxi BNA/metilenoxi BNA citosinas no modificadas en el salto (es decir, 2-10-2 metilenoxi BNA con 2'-(butilacetomido)-palmitamida substituida en el nucleótido en 5')	190

Tabla 17: Inhibición antisentido por los compuestos antisentido cortos que comprenden conjugados de ácido palmítico

Nº ISIS	Dosis (umol/kg)	% Inhib
5-10-5	2,5	54
387462	2,5	99
	1,0	91
	0,4	65

	0,16	16
391871	2,5	49
	1,0	18
	0,4	5
	0,16	0
391872	2,5	99
	1,0	92
	0,4	50
	0,16	18

5 La Tabla 17 muestra que los niveles de ARNm de ApoB se reducían de un modo dependiente de la dosis tras
tratamiento con compuestos antisentido cortos que tienen un conjugado de ácido palmítico (C16). A la dosis de 2,5
umol/kg, la inhibición de ApoB por los compuestos antisentido cortos fue mayor de lo observado con un gápmer 5-
10-5 MOE a una dosis equivalente. En este estudio, las ED₅₀ estimadas fueron 1,5 mg/kg para ISIS 387462, 13,1
mg/kg para ISIS 391871 y 1,9 mg/kg para ISIS 391872. Las ED₅₀ estimada para el gápmer 5-10-5 MOE fue 17,4
mg/kg. Los triglicéridos se redujeron a las dosis de 2,5 y 1,0 mg/kg de ISIS 387462 e ISIS 391872. ISIS 387462 e
ISIS 391872 redujeron marcadamente el colesterol total, HDL-C y LDL-C de un modo dependiente de la dosis, la
10 reducción de LDL-C era tan marcada que estaba por debajo del límite de detección. En general, los compuestos
antisentido cortos exhibieron pocos o ningún efecto secundario adverso.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc. Sanjay Bhanot Richard S. Geary Robert McKay Brett P. Monia Punit P. Seth
Andrew M. Siwkowski Eric E. Swayze Edward Wancewitz

<120> COMPUESTOS Y PROCEDIMIENTOS PARA MODULAR LA EXPRESIÓN DE APOB

15 <130> CORE0061WO8

<150> PCT/US2007/061183

<151> 2007-01-27

<150> 60/746,631

<151> 2006-05-05

20 <150> 60/747,059

<151> 2006-05-11

<150> 60/805,660

<151> 2006-06-23

<150> 60/864,554

25 <151> 2006-11-06

<160> 2

<170> Fast SEQ para Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 14121

30 <212> ADN

<213> H. sapiens

ES 2 471 978 T3

<400> 1

```

attcccaccg ggacctgcgg ggctgagtgc ctttctcggt tgctgccgct gaggagcccg 60
cccagccagc cagggccgcg aggccgaggc cagggccgag cccaggagcc gccccaccgc 120
agctggcgat ggaccgccc aggcccgcgc tgctggcgct gctggcgctg cctgcgctgc 180
tgctgctgct gctggcgggc gccagggccg aagaggaaat gctggaaaat gtcagcctgg 240
tctgtccaaa agatgcgacc cgattcaagc acctccggaa gtacacatac aactatgagg 300
ctgagagttc cagtggagtc cctgggactg ctgattcaag aagtgccacc aggatcaact 360
gcaaggttga gctggagggt ccccagctct gcagcttcat cctgaagacc agccagtgca 420
ccctgaaaga ggtgtatggc ttcaaccctg agggcaaagc cttgctgaag aaaaccaaga 480
actctgagga gtttgctgca gccatgtcca ggtatgagct caagctggcc attccagaag 540
ggaagcaggt tttcctttac cgggagaaag atgaacctac ttacatcctg aacatcaaga 600
ggggcatcat ttctgccctc ctggttcccc cagagacaga agaagccaag caagtgtgtg 660
ttctggatac cgtgtatgga aactgctcca ctcaacttac cgtcaagacg aggaagggca 720
atgtggcaac agaaatatcc actgaaagag acctggggca gtgtgatcgc ttcaagccca 780
tccgcacagg catcagccca cttgctctca tcaaaggcat gacccgcccc ttgtcaactc 840
tgatcagcag cagccagtcc tgtcagtaca cactggacgc taagaggaag catgtggcag 900
aagccatctg caaggagcaa cacctcttcc tgcccttttc ctacaacaat aagtatggga 960
tggtagcaca agtgacacag actttgaaac ttgaagacac accaaagatc aacagccgct 1020
tctttggtga aggtactaag aagatgggcc tcgcatttga gagcaccaaa tccacatcac 1080

```

ES 2 471 978 T3

ctccaaagca ggccgaagct gttttgaaga ctctccagga actgaaaaaa ctaaccatct 1140
ctgagcaaaa tatccagaga gctaactctt tcaataagct ggttactgag ctgagaggcc 1200
tcagtgatga agcagtcaca tctctcttgc cacagctgat tgagggtgcc agccccatca 1260
ctttacaagc cttggttcag tgtggacagc ctcagtgctc cactcacatc ctccagtggc 1320
tgaaacgtgt gcatgccaac ccccttctga tagatgtggt cacctacctg gtggccctga 1380
tccccgagcc ctccagcacag cagctgcgag agatcttcaa catggcgagg gatcagcgca 1440
gccgagccac cttgtatgcy ctgagccacg cgggtcaaaa ctatcataag acaaacctca 1500
cagggaccca ggagctgctg gacattgcta attacctgat ggaacagatt caagatgact 1560
gcactgggga tgaagattac acctatttga ttctgctggg cattggaaat atgggcaaaa 1620
ccatggagca gtttaactcca gaactcaagt cttcaatcct caaatgtgtc caaagtacaa 1680
agccatcact gatgatccag aaagctgcca tccaggctct gcggaatg gagcctaaag 1740
acaaggacca ggaggttctt cttcagactt tcccttgatga tgcttctccg ggagataagc 1800
gactggctgc ctatcttatg ttgatgagga gtccttcaca ggcagatatt aacaaaattg 1860
tcccaattct acctgggaa cagaatgagc aagtgaagaa ctttggggct tcccatattg 1920
ccaatatctt gaactcagaa gaattggata tccaagatct gaaaaagtta gtgaagaag 1980
ctctgaaaga atctcaactt ccaactgtca tggacttcag aaaattctct cggaaactatc 2040
aactctacaa atctgtttct cttccatcac ttgaccagc ctccagccaaa atagaaggga 2100
atcttatatt tgatccaaat aactaccttc ctaaagaaag catgctgaaa actaccctca 2160
ttgaccttgg atttgcttca gctgacctca tccgagattgg ctggaaagga ctaggctttg 2220
agccaacatt ggaagctctt tttgggaagc aaggattttt cccagacagt gtcaacaaag 2280
ctttgtactg ggttaatggt caagtccctg atgggtctct taaggctctta gtggaccact 2340
ttggctatac caaagatgat aaacatgagc aggatatggt aaatggaata atgctcagtg 2400
ttgagaagct gattaaagat ttgaaatcca aagaagctcc ggaagccaga gcctaccctc 2460
gcatcttggg agaggagctt ggttttgcca gtctecatga cctccagctc ctgggaaagc 2520
tgcttctgat ggggtcccgc actctgcagg ggatccccca gatgattgga gaggtcatca 2580
ggaaggctc aaagaatgac tttttcttc actacatctt catggagaat gcctttgaac 2640
tcccactgg agctggatta cagttgcaaa tatcttcac tggagtcatt gctccggag 2700
ccaaggctgg agtaaaactg gaagtagcca acatgcaggc tgaactggtg gcaaaaccct 2760
ccgtgtctgt ggagtttgtg acaaatatgg gcatcatcat tccggacttc gctaggagtg 2820
gggtccagat gaacaccaac ttcttccacg agtcgggtct ggaggctcat gttgccctaa 2880
aagctgggaa gctgaagttt atcatctctt ccccaaagag accagtcaag ctgctcagtg 2940
gaggcaacac attacatttg gtctctacca ccaaaacgga ggtgatccca cctctcattg 3000
agaacaggca gtccctggca gtttgcaagc aagtctttcc tggcctgaat tactgcacct 3060
cagggcctta ctccaacgcc agctccacag actccgcctc ctactatccg ctgaccgggg 3120
acaccagatt agagctggaa ctgaggccta caggagagat tgagcagtat tctgtcagcg 3180
caacctatga gctccagaga gaggacagag ccttgggtgga taccctgaag tttgtaactc 3240
aagcagaagg tgcgaagcag actgaggcta ccatgacatt caaatataat cggcagagta 3300
tgacctgtc cagtgaagtc caaatccgg attttgatgt tgacctcgga acaatcctca 3360
gagttaatga tgaatctact gaggggcaaaa cgtcttacag actcacctg gacattcaga 3420
acaagaaaat tactgagtc gccctcatgg gccacctaaq ttgtgacaca aaggaagaaa 3480
gaaaaatcaa ggggtgttatt tccatacccc gtttgcaagc agaagccaga agtgagatcc 3540
tcgcccactg ttcgctgcc aaactgcttc tccaaatgga ctcatctgct acagcttatg 3600
gctccacagt ttccaagagg gtggcatggc attatgatga agagaagatt gaatttgaat 3660
ggaacacagg caccaatgta gataccaaaa aaatgacttc caatttcctt gtggatctct 3720
ccgattatcc taagagcttg catatgatg ctaatagact cctggatcac agagtccctg 3780
aaacagacat gactttccgg cacgtgggtt ccaaattaat agttgcaatg agctcatggc 3840
ttcagaaggc atctgggagt cttccttata cccagacttt gcaagaccac ctcaatagcc 3900
tgaaggagtt caacctccag aacatgggat tgccagactt ccacatccca gaaaacctct 3960
tcttaaaaag cgatggccgg gtcaaatata ccttgaacaa gaacagtttg aaaattgaga 4020
ttcctttgcc ttttgggtggc aaatcctcca gagatctaaa gatgttagag actgttagga 4080
caccagccct ccacttcaag tctgtgggat tccatctgcc atctcgagag ttccaagtcc 4140
ctacttttac cattcccaag ttgtatcaac tgcaagtgcc tctcctgggt gttctagacc 4200
tctccacgaa tgtctacagc aacttgtaaa actggctccg ctctacagt ggtggcaaca 4260
ccagcacaga ccatttcagc cttcgggctc gttaccacat gaaggctgac tctgtggttg 4320
acctgcttc ctacaatgcy caaggatctg gagaacaac atatgaccac aagaatacgt 4380
tcacactatc atgtgatggg tctctacgcc acaaatctct agattcgaat atcaaatca 4440
gtcatgtaga aaaacttggg aacaaccag tctcaaaagg tttactaata ttcgatgcat 4500
ctagttcctg gggaccacag atgtctgctt cagttcattt ggactccaaa aagaacacgc 4560
atgtgttggc caaagaagtc aagattgatg ggcagttcag agtctctctg ttctatgcta 4620
aaggcacata tggcctgtct tgtcagaggg atcctaacac tggccggctc aatggagagt 4680
ccaacctgag gtttaactcc tcctacctcc aaggcaccaa ccagataaca ggaagatag 4740

ES 2 471 978 T3

aagatggaac cctctccctc acctccacct ctgatctgca aagtggcatc attaaaaata 4800
ctgcttcctt aaagtatgag aactacgagc tgactttaa atctgacacc aatgggaagt 4860
ataagaactt tgccacttct aacaagatgg atatgacctt ctctaagcaa aatgactgc 4920
tgcgttctga atatcaggct gattacgagt cattgaggtt cttcagcctg ctttctggat 4980
cactaaattc ccatggctt gagttaaag ctgacatctt aggcactgac aaaattaata 5040
gtggtgctca caaggcgaca ctaaggattg gccaaagatgg aatatctacc agtgaacga 5100
ccaactgaa gtgtagtctc ctggtgctgg agaatgagct gaatgcagag cttggcctct 5160
ctggggcatc tatgaaatta acaacaaatg gccgcttcag ggaacacaat gcaaaattca 5220
gtctggatgg gaaagccgcc ctcacagagc tatcactggg aagtgcttat caggccatga 5280
ttctgggtgt cgacagcaaa aacatthttca acttcaaggt cagtcaagaa ggacttaagc 5340
tctcaaatga catgatgggc tcatatgctg aaatgaaatt tgaccacaca aacagtctga 5400
acattgacgg ctatcactg gacttctctt caaaacttga caacatttac agctctgaca 5460
agttttataa gcaaactggt aatttacagc tacagcccta ttctctggtta actactttaa 5520
acagtgacct gaaatacaat gctctggatc tcaccaacaa tgggaaacta cggctagaac 5580
ccctgaagct gcatgtggct ggtaacctaa aaggagccta ccaaaaataat gaaataaaac 5640
acatclatgc catctcttct gctgccttat cagcaagcta taaagcagac actgttgcta 5700
aggttcaggg tgtggagtth agccatcggc tcaacacaga catcgctggg ctgcttcag 5760
ccattgacat gagcacaaac tataattcag actcactgca tttcagcaat gtcttccgtt 5820
ctgtaatggc cccgtttacc atgaccatcg atgcacatac aaatggcaat gggaaactcg 5880
ctctctgggg agaacatact gggcagctgt atagcaaat cctgttgaaa gcagaacctc 5940
tggcatttac ttctctcat gattacaaag gctccacaag tcatcatctc gtgtctagga 6000
aaagcatcag tgcagctctt gaacacaaag tcagtgccct gcttactcca gctgagcaga 6060
caggcaacct gaaactcaag acccaattta acaacaatga atacagccag gacttggatg 6120
cttacaacac taagataaaa attggcgtgg agcttactgg acgaactctg gctgacctaa 6180
ctctactaga ctcccaatt aaagtgccac ttttactcag tgagcccatc aatcatttg 6240
atgctttaga gatgagagat gccgttgaga agcccaaga atttacaatt gttgcttttg 6300
taaagtatga taaaaaccaa gatgttcact ccattaacct cccatttttt gagacctgac 6360
aagaatattt tgagaggaat cgacaaacca ttatagttgt agtggaaaac gtacagagaa 6420
acctgaagca catcaatatt gatcaatttg taagaaaata cagagcagcc ctgggaaaac 6480
tcccacagca agctaattgat tatctgaatt cattcaattg ggagagacaa gtttcacatg 6540
ccaaggagaa actgactgct ctcaaaaaaa agtatagaat tacagaaaat gatatacaaa 6600
ttgcattaga tgatgccaaa atcaacttta atgaaaaact atctcaactg cagacatata 6660
tgatacaatt tgatcagtat attaaagata gttatgattt acatgatttg aaaatagcta 6720
ttgctaatat tattgatgaa atcattgaaa aattaaagag tcttgatgag cactatcata 6780
tccgtgtaaa tttagtaaaa acaatccatg atctacattt gtttattgaa aatattgatt 6840
ttaacaaaag tggaaagtgt actgcatcct ggattcaaaa tgtggatact aagtaccaaa 6900
tcagaatcca gatacaagaa aaactgcagc agcttaagag acacatacag aatatagaca 6960
tccagcacct agctggaaag ttaaacaacac acattgaggc tattgatgtt agagtgcttt 7020
tagatcaatt gggaactaca atttcatttg aaagaataaa tgatgttctt gagcatgtca 7080
aacactttgt tataaatctt attggggatt ttgaaagtgc tgagaaaatc aatgccttca 7140
gagccaaagt ccatgagtta atcgagaggt atgaagtaga ccaacaaatc caggttttta 7200
tgataaatt agtagagttg acccaccat acaagttgaa ggagactat cagaagctaa 7260
gcaatgtcct acaacaagtt aagataaaaag attactttga gaaattgggt ggatttattg 7320
atgatgctgt gaagaagctt aatgaattat cttttaaaac attcattgaa gatgttaaca 7380
aatctcttga catggtgata aagaatttaa agtcatttga ttaccaccag tttgtagatg 7440
aaaccaatga caaaatccgt gaggtgactc agagactcaa tgggtgaaat caggctctgg 7500
aactaccaca aaaagctgaa gcattaaaac tggttttaga ggaaccaag gccacagttg 7560
cagtgatctt ggaaagccta caggacacca aaataacctt aatcatcaat tgggtacagg 7620
aggctttaag ttcagcatct ttggctcaca tgaaggccaa attccgagag actctagaag 7680
atacacgaga ccgaatgtat caaatggaca ttcagcagga acttcaacga tacctgtctc 7740
tgytaggcca ggtttatagc acacttgta cctacatttc tgattgggtg actcttgetg 7800
ctaagaacct tactgacttt gcagagcaat attctatcca agattgggct aaacgtatga 7860
agatctggg agagcaaggg ttcactgttc ctgaaatcaa gaccatcctt gggaccatgc 7920
ctgcctttga agtcagctct caggctcttc agaaagctac ctccagaca cctgatttta 7980
tagtccccct aacagatttg aggattccat cagttcagat aaacttcaa gacttaaaaa 8040
atataaaat cccatccagg tttccacac cagaatttac catcctaac acctccaca 8100
ttccttctt tacaattgac tttgtcgaaa tgaaagtaaa gatcatcaga accattgacc 8160
agatgcagaa cagtgagctg cagtggcccg ttccagatat atatctcagg gatctgaagg 8220
tggaggacat tcctctagcg agaatcacc tgcagactt ccgtttacca gaaatcgcaa 8280
ttocagaatt cataatcca actctcaacc ttaatgattt tcaagttcct gacctcaca 8340
taccagaatt ccagcttccc cacatctcac acacaattga agtacctact tttggcaagc 8400

ES 2 471 978 T3

tatacagtat tctgaaaatc caatctctct ttttcacatt agatgcaaat gctgacatag 8460
 ggaatggaac cacctcagca aacgaagcag gtatcgcagc ttccatcact gccaaaggag 8520
 agtccaaatt agaagtctct aattttgatt ttcaagcaaa tgcacaactc tcaaacccta 8580
 agattaatcc gctggctctg aaggagtcag tgaagttctc cagcaagtac ctgagaacgg 8640
 agcatgggag tgaatgctg ttttttgaa atgctattga gggaaaatca aacacagtgg 8700
 caagtttaca cacagaaaaa aatacactgg agcttagtaa tggagtgatt gtcaagataa 8760
 acaatcagct taccctggat agcaacacta aatacttcca caaattgaac atccccaaac 8820
 tggacttctc tagtcaggct gacctgcgca acgagatcaa gacactgttg aaagctggcc 8880
 acatagcatg gacttcttct ggaaaagggt catggaaatg ggcctgcccc agattctcag 8940
 atgagggaac acatgaatca caaattagtt tcaccataga aggaccctc acttcccttg 9000
 gactgtccaa taagatcaat agcaaacacc taagagtaaa ccaaaacttg gtttatgat 9060
 ctggctccct caacttttct aaacttgaaa ttcaatcaca agtgcattcc cagcatgtgg 9120
 gccacagtgt tctaactgct aaaggcatgg cactgtttgg agaagggaag gcagagttta 9180
 ctggggaggc tgatgctcat ttaaatggaa aggttattgg aactttgaaa aattctcttt 9240
 tcttttcagc ctagcatttt gagatcacgg catccacaaa caatgaaggg aatttgaaag 9300
 lllcgttttcc attaaggtta acagggaaaga tagacttctc gaataactat gcactgtttc 9360
 tgagtcccag tgcccagcaa gcaagttggc aagtaagtgc taggttcaat cagtataagt 9420
 acaacaaaaa tttctctgct ggaacaacag agaacattat ggaggcccat gtaggaataa 9480
 atgagaagc aaatctggat ttcttaaac ttcttttaac aattcctgaa atgcgtctac 9540
 cttacacaat aatcacaact cctccaactga aagatttctc tctatgggaa aaaacaggct 9600
 tgaaggaatt cttgaaaacg acaagcaat catttgattt aagtgtaaaa gctcagtata 9660
 agaaaaacaa acacaggcat tccatcacia atcttttggc tgtgctttgt gagtttatca 9720
 gtcagagcat caaatccttt tgacagcatt ttgaaaaaaa cagaaacaat gcattagatt 9780
 ttgtcaccaa atctcataat gaacaaaaa ttaagtttga taagtacaaa gctgaaaaat 9840
 ctcacgacga gctcccagc acctttcaaa ttctgggata cactgttcca gttgtcaatg 9900
 ttgaagtgtc tccattcacc atagagatgt cggcattcgg ctatgtgttc ccaaaaagcag 9960
 tcagcatgcc tagtttctcc atcctaggtt ctgacgtccg tgtgccttca tacacattaa 10020
 tcctgccatc attagagctg ccagtcctc atgtccctag aaatctcaag ctttctctc 10080
 cacatttcaa ggaattgtgt accataagcc atatttttat tcctgccatg ggcaatatta 10140
 cctatgattt ctcctttaa tcaagtgta tcacactgaa taccaatgct gaacttttta 10200
 accagtcaga tattgttgt catctcctt cttcatctc atctgtcatt gatgactgc 10260
 agtacaatt agagggcacc acaagattga caagaaaaag gggattgaag ttagccacag 10320
 ctctgtctct gagcaacaaa tttgtggagg gtatgataa cagtactgtg agcttaacca 10380
 cgaaaaatat ggaagtgtca gtggcaaaaa ccacaaaagc cgaaattcca attttgagaa 10440
 tgaatttcaa gcaagaactt aatggaaata ccaagtcaaa acctactgtc tcttctcca 10500
 tggaaatttaa gtatgatctt aatcttcaa tgctgtactc taccgctaaa ggagcagttg 10560
 accacaagct tagcttgaa agcctcacct cttacttttc cattgagtca tctaccaag 10620
 gagatgtcaa gggttcgggt ctttctcggg aatattcagg aactattgct agtgaggcca 10680
 acacttactt gaattccaag agcacacggt cttcagtga gctgcagggc acttccaaa 10740
 ttgatgatc ctggaacctt gaagtaaaag aaaattttgc tggagaagcc acactccac 10800
 gcatatattc cctctgggag cacagtacga aaaaccactt acagctagag ggcctcttt 10860
 tcaccaacgg agaacataca agcaagcca ccctggaact ctctccatgg caaatgtcag 10920
 ctcttgttca ggtccatgca agtcagccca gttccttcca tgatttccct gacctggcc 10980
 gggaagtggc cctgaatgct aacactaaga accagaagat cagatggaaa aatgaagtc 11040
 ggattcattc tgggtcttcc cagagccagg tgcagctttc caatgaccaa gaaaaggcac 11100
 acctgacat tgcaggatcc ttagaaggac acctaaaggtt cctcaaaaat atcatcctac 11160
 cagtctatga caagagctta tgggatttcc taaagctgga tghtaacacc agcatttgta 11220
 ggagacagca tcttctgtgt tcaactgect ttgtgtacac caaaaacccc aatggctatt 11280
 catttccat cctgtaaaa gttttggctg ataaattcat tactcctggg ctgaaactaa 11340
 atgatctaaa ttcagttctt gtcagccta cgttccatgt cccatttaca gatcttcagg 11400
 ttccatcgtg caaacttgac ttcagagaaa tacaatcta taagaagctg agaacttcat 11460
 catttgccct caacctacca acactcccc aggtaaaatt ccctgaagtt gatgtgttaa 11520
 caaaatattc tcaaccagaa gactccttga ttccctttt tgagataacc gtgcccgaat 11580
 ctcagttaac tgtgtccag ttcacgctc caaaaagttt ttcagatggc attgctgctt 11640
 tggatctaaa tgcagtagcc aacaagatcg cagactttga gttgccacc atcatcgtgc 11700
 ctgagcagac cattgagatt ccctccatta agttctctgt acctgctgga attgtcattc 11760
 cttcctttca agcactgact gcacgctttg aggtagactc tcccgtgtat aatgccactt 11820
 ggagtgccag tttgaaaaac aaagcagatt atgttgaac agtcctggat tccacatgca 11880
 gctcaaccgt acagttccta gaatatgaac taaatgtttt gggaacacac aaaatcgaag 11940
 atggtacggt agcctctaag actaaaggaa cacttgcaca ccgtgacttc agtgcagaat 12000
 atgaagaaga tggcaaattt gaaggacttc aggaatggga aggaaaagcg cacctcaata 12060

ES 2 471 978 T3

tcaaaagccc agcggttcacc gatctccatc tgcgctacca gaaagacaag aaaggcatct 12120
 ccacctcagc agcctcccca gccgtaggca ccgtgggcat ggat atggat gaagatgacg 12180
 acttttctaa atggaacttc tactacagcc ctcagtcctc tccagataaa aaactcacca 12240
 tattcaaaac tgagttgagg gtccgggaat ctgatgagga aactcagatc aaagttaatt 12300
 gggagaaga ggcagcttct ggcttgctaa cctctctgaa agacaacgtg cccaaggcca 12360
 caggggtcct ttatgattat gtcaacaagt accactggga acacacaggg ctcaccctga 12420
 gagaagtgtc ttcaaagctg agaagaaatc tgcagaacaa tgctgagtgg gtttatcaag 12480
 gggccattag gcaaattgat gatatcgacg tgaggttcca gaaagcagcc agtggcacca 12540
 ctgggacctc ccaagagtgg aaggacaagg cccagaatct gtaccaggaa ctggtgactc 12600
 aggaaggcca agccagtttc cagggactca aggataacgt gtttgatggc ttggtacgag 12660
 ttactcaaaa attccatagc aaagtcaagc atctgattga ctcaactcatt gattttctga 12720
 acttccccag attccagttt ccggggaaac ctgggatata cactagggag gaactttgca 12780
 ctatgttcat aagggaggtg gggacggtac tgtcccaggc atattcgaaa gtccataatg 12840
 gttcagaaat actgttttcc tatttccaag acctagtgat tacacttcct ttcgagttaa 12900
 ggaacataa actaatagat gtaatctcga tgtatagggg actggtgaaa gatttatcaa 12960
 aagaagccca agaggtattt aaagccattc agtctctcaa gaccacagag gtgctacgta 13020
 atctcaggga ccttttcaaa ttcattttcc aactaataga agataacatt aaacagctga 13080
 aagagatgaa atttacttat cttattaatt atatccaaga tgagatcaac acaactctca 13140
 atgattatat cccatagtgt tttaaattgt tgaagaaaa cctatgcctt aatcttcata 13200
 agttcaatga atttattcaa aacgagcttc aggaagcttc tcaagagtta cagcagatcc 13260
 atcaatcat tatggccctt cgtgaagaat atttgatcc aagtatagtt ggctggacag 13320
 tgaatatta tgaacttgaa gaaaagatag tcagtctgat caagaacctg ttagtgtctc 13380
 ttaaggactt ccattctgaa tatattgtca gtgcctctaa ctttacttcc caactctcaa 13440
 gtcaagttga gcaatttctg cacagaaata ttcaggaata tcttagcatc cttaccgatc 13500
 cagatggaaa agggaaagag aagattgcag agctttctgc cactgctcag gaaataatta 13560
 aaagccaggc cattgcgacg aagaaaaata tttctgatta ccaccagcag tttagatata 13620
 aactgcaaga tttttcagac caactctctg attactatga aaaatttatt gctgaatcca 13680
 aaagattgat tgacctgtcc attcaaaact accacacatt tctgatatac atcacggagt 13740
 tactgaaaaa gctgcaatca accacagctc tgaaccccta catgaagctt gctccaggag 13800
 aacttactat catcctctaa ttttttaaaa gaaatcttca tttattcttc tttccaatt 13860
 gaactttcac atagcacaga aaaaattcaa actgcctata ttgataaaac catacagta 13920
 gccagccttg cagtaggcag tagactataa gcagaagcac atatgaactg gacctgcacc 13980
 aaagctggca ccagggctcg gaaggtctct gaactcagaa ggatggcatt ttttgcaagt 14040
 taaagaaat caggatctga gttatttgc taaactggg ggaggaggaa caaataaatg 14100
 gagtctttat tgtgtatcat a 14121

<210> 2

<211> 13928

<212> ADN

5 <213> *Mus musculus*

<400> 2

atcagtgcct gcagtgatc aagtacctgc ctgagctccg cctccgaaga ccctgtagag 60
 caagcagcag gggctaggcc cgtggccagg ccacagccag gaagccacc caccatccat 120
 ccgccatggg cccacgaaag cctgccctgc ggacgccgtt actgctgctg ttctgctac 180
 tgttcttggg caccagcgtc tgggtcaag atgaagtctt ggaaaactta agcttcagct 240
 gtccaaaaga tgcaactcga ttcaagcacc tccgaaagta cgtgtacaac tatgaagctg 300
 aaagttccag cgggtgccag ggcacagctg actccagaag cgccaccaag atcaactgta 360
 aggtagagct ggaggtcccc caaatctgtg gtttcatcat gaggaccaac cagtgtacc 420
 ttaaagaggt gtaggcttc aacctgagg gcaaggcctt gatgaagaaa accaagaact 480
 ctgaagagtt tgcagctgcc atgtccaggt acgaactcaa gctggccatt cctgaaggga 540
 aacaaattgt tctttaccct gacaaggatg aacctaaata tctctgaac atcaagaggg 600
 gcatcatctc tgctctctcgt gttccccag agacagaaga ggaccaacaa gagttgttcc 660
 tggataccgt gtatggaac tgctcaactc aggttaccgt gaattcaaga aagggaaacc 720
 taccacaga aatgtccaca gagagaacc tgcagcaatg tgacggcttc cagccatca 780
 gtacaagtgt cagccctctc agctctcatca aaggcctggc ccacccttg tcaactctta 840
 tcagcagcag ccaaacttgc cagtacacct tggatcctaa gaggaagcat gtgtctgaag 900
 ctgtctgtga tgagcagcat ctttctctgc ctttctccta caagaataag tatgggatca 960
 tgacacgtgt tacacagaaa ctgagctctg aagacacacc taagatcaac agtgcgttct 1020
 tcagtgaagg taccacaccg atgggtctgg cctttgagag caccaagctc acgtcatccc 1080
 caagcagcc tgatgctgtt ttgaagacc tcaagaact gaaaaattg tccatctcag 1140

ES 2 471 978 T3

agcagaatgc tcagagagca aatctcttca ataaactggt tactgagctg agaggcctca 1200
 ctggtgaagc aatcacatcc ctcttgccac agctgattga agtgtccagc cccatcactt 1260
 tacaagcctt ggttcagtggt ggacagccac agtgctatac tcacatcctc cagtggtgta 1320
 aaactgagaa ggctcaccct ctectggttg acattgtcac ctacctgatg gctctgatcc 1380
 caaatccctc aacacagagg ctgcaggaaa tctttaatac tgccaaggag cagcagagcc 1440
 gagccactct gtatgactg agccacgcag ttaacagcta ttttgatgtg gaccattcaa 1500
 ggagcccagt tctgcaggat atcgtcggtt acctgtgaa acagatcgac aatgaatgca 1560
 cgggcaatga agaccacacc ttcttgattc tgagggcatc tggaaatatg ggaagaacca 1620
 tggacaagt aatgccagcc ctcaagtcct cagtcctgag ctgtgtacga agtacaaaac 1680
 catctctgct gattcagaaa gctgctctcc aggcctgag gaagatggaa ctggaagatg 1740
 aggtccggac gatccttttt gatacatttg taaatggtgt cgctcccgtg gagaagagac 1800
 tggctgccta tctcttgctg atgaagaacc ctctctcatc agatattaac aaaatgccc 1860
 aactttctcca atgggaacag agtgagcagg tgaagaactt cgtggcatct cacattgcca 1920
 acatcttgaa ctcggaagaa ctgtatgtcc aagatctgaa agttttgatc aaaaatgctc 1980
 tggagaattc tcaatttcca acgatcatgg acttcagaaa attttcccga aactatcaga 2040
 ttccaaatc tgcctctctc ccaatgttcg acccagctc agtcaaaaata gaagggatc 2100
 ttatatttga tccaagcagt tatcttccca gagaaagctt gctgaaaaca accctcacag 2160
 tctttggact tgcttcaact gatctctttg agattggttt agaagggaaa gggtttgagc 2220
 caactagtaa agctcttttt ggttaagcaag gattcttccc agacagtgtc aacaaggctc 2280
 tgtattgggt caatggccga gttccagatg gtgtctccaa ggtcttgggt gaccactttg 2340
 gctatactac agatggcaag catgaacagg acatggtgaa tggaaatcatg cccattgtgg 2400
 acaagttgat caaagatctg aaatctaaag aaattcctga agccagggcc tatctccgca 2460
 tcttaggaaa agagctaaagc tttgtcagac tccaagacct ccaagtctct ggaagctgt 2520
 tgctgagtggt gcacaaaact ttgcagggaa tccccagat ggttgtacag gccatcagag 2580
 aagggcctc gaatgacttg tttctccact acatcttcat ggacaatgcc ttgagctcc 2640
 cactggagc agggttacag ctgcaagtgt cctcgtctgg agtcttcacc cccgggatca 2700
 aggtggtgt aagactggaa ttagccaaca tacaggcaga gctagtggca aagcctctg 2760
 tgtccttggg gtttgtgaca aatagggca tcatcatccc agacttcgct aagagcagtg 2820
 tccagatgaa caccaacttc ttccacagat caggcctgga ggcgcgagtg gccctgaagg 2880
 ctgggcagct gaaggtcatc attccttctc caaagaggcc agtcaagctg ttcagtggca 2940
 gcaaccacat gcatctggtc tctaccacca aaacagaagt gatcccact ctggttgaga 3000
 acagcagctc ctggccaact tgcaagcctc tcttcaactg aatgaactac tgtaccacag 3060
 gagcttactc caacgccagc tccacggagt ctgcctctta ctaccactg acaggggaca 3120
 caaggtatga gctggagctg aggccaccgg gagaagtggg gcagtatctt gccactgcaa 3180
 cctatgaact cctaaaagag gacaagtctt tggttgacac attgaagttc ctagtccaag 3240
 cagaaggagt gcagcagtct gaagctactg tactgttcaa atataatcgg agaagcagga 3300
 ccttatctag tgaagtctta attccagggt ttgatgtcaa cttcgggaca atactaagag 3360
 ttaatgatga atctgctaag gacaaaaaca cttacaaact catcctggac attcagaaca 3420
 agaaaaatcac tgaggtctct ctcgtgggcc acttgagtta tgataaaaag ggagatggca 3480
 agatcaaaag tgttgtttcc ataccacggt tgcaagcaga agccaggagt gaggccaca 3540
 cccactggtc ctccacaaa ctgctcttcc aaatggactc atctgctaca gcttacggct 3600
 caacaatttc caagagagtg acatggcgtt acgataatga gataatagaa tttgattgga 3660
 acacgggaac caatgtggat accaaaaaag tggcctccaa tttccctgtg gatctttccc 3720
 attatcctag aatgttgcag gagtatgcca atggtctcct ggatcacaga gtcctcaca 3780
 cagatgtgac tttcgggac atgggttcca aattaattgt tgcaacaaac acatggctc 3840
 agatggcaac caggggtctt ccttaccctc aaactctaca ggatcacctc aatagcctc 3900
 cagagttgaa cctcctgaaa atgggactgt ctgacttoca tattccagac aaactcttcc 3960
 taaagactga tggcagagtc aaatacacia tgaacaggaa caaaataaac attgacatcc 4020
 ctttgctttt ggggtgcaag tcttcaaaag acctcaagat gccagagagt gtgaggcac 4080
 cagcctcaa cttcaagtct gtgggattcc atctgccatc tcgagaggtc caggtcccca 4140
 ctllttacaat cccaagaca catcagcttc aagtgcctct cttgggtgt ctagacctt 4200
 ccacaaatgt ctacagcaat ttgtacaact ggtcagcctc ctacactggt ggcaacacca 4260
 gcagagacca cttcagcctt caggctcagt accgatgaa gactgactct gtggttgacc 4320
 tgttttctca cagtgtgcaa ggtctggag aaacaacata tgacagcaag aacacattta 4380
 cattgtctct tgatggatct ctacaccata aatttctaga ctcaaaattc aaagtcaacc 4440
 acgtagaaaa atttggaac agcccagctc caaaagggtt actaacattt gaacatcta 4500
 gtgcttggg accacagatg tctgctactg ttcacctaga ctcaaaaaag aaacaacatc 4560
 tatacgtcaa agatatcaag gttgatggac agttcagagc ttcttcattt tatgctcaag 4620
 gcaaatatgg cctgtcttgt gagagagatg ttacaactgg ccagctgagc ggcaaatcca 4680
 acatgagatt taactccacc tacttccagc gcaccaacca gatcgtggga atgtaccag 4740
 atggagcctt gtccatcacc tccacttctg acctgcaaga tggcatattc aagaacacag 4800

ES 2 471 978 T3

cttccttgaa atatgaaaac tatgagctga ctctgaaatc tgatagcagt gggcagtatg 4860
agaacttcgc tgcttccaac aagctggatg tgaccttctc tacgcaaagt gcactgctgc 4920
gttctgaaaca ccaggccaat tacaagtccc tgaggcttgt cacccttctt tcaggatccc 4980
tcacttccca ggggtgtagaa ttaaatgctg acatcttggg cacagacaaa attaatactg 5040
gtgctcaciaa ggcaacacta aagattgcac gtgatggact atcaaccagt gcgaccacca 5100
acttgaagta cagccccctg ctgctggaga atgagttgaa tgcagagctt gggctctctg 5160
gggcatccat gaaattatca acaaacggcc gcttcaaaga acaccatgca aaattcagtc 5220
ttgatgggag agctgccctc acagagggtg cactggggag catttaccag gccatgattc 5280
tgggtgcaga cagcaaaaaac atcttcaact tcaaactcag ccgagaaggg ctgaggctgt 5340
ccaatgattt gatgggctcc tatgctgaga tgaaacttga ccacacacac agtctgaaca 5400
ttgcaggtct ctactggac ttcttctcaa aaatggacaa tatttacagt ggagacaagt 5460
tctataagca gaattttaac ttacagctac agccctattc ttccataact actttaagca 5520
acgacctgag atatggtgct ctagatttga ccaacaatgg aaggttctcg ctggagccac 5580
tgaagctgaa tgtgggtggc aaactttaaag gaacctatca aaataatgag ctgaaacata 5640
tctataccat atcttatact gacctggtag tagcaagtta cagagcagac actgtggcta 5700
aygttccaggg tctcgaattc agccataggc taaatgcaga cattgaagga ctgacttctc 5760
ctggtgatgt cactaccagc tacaattcag atccactgca ttttaacaat gttttccact 5820
tttctctggc accttttacc ttgggcatcg acacacatac aagtgggtgat gggaaactgt 5880
ccttctgggg agaacacact gggcagctat atagtaagtt tctggtgaaa gcagaacctc 5940
tggcacttat tgtctctcat gactacaaag gatccacaag ccacagtctc ccgtacgaga 6000
gcagcatcag cacggctctt gaacacacag tcagtgcctt gctgacgcca gctgagcaga 6060
caagcacctg gaaattcaag accaaactga atgacaaagt atacagccag gactttgagg 6120
cctacaacac taagacaaa atcgggtgtg agcttagtgg acgggctgac ctctctgggc 6180
tgtattctcc aattaaacta ccgtttttct acagtgagcc tgtcaatgtc cttaatggct 6240
tagaggtaaa tgatgctgtt gacaagcccc aagaattcac aattattgct gtggtgaagt 6300
acgataagaa ccaggatggt cacaccatca acctccatt cttcaaaagc ctgccagact 6360
atttggagag aaatcgaaga ggaatgataa gtctactgga agccatgca ggggaattgc 6420
aacgcctcag tgttgatcag tttgtgagga aatacagagc ggcctgagc agacttctc 6480
agcagattca tcattatctg aatgcatctg actgggagag acaagttagt ggtccaagg 6540
aaaaataaac ttctttcatg gaaaattata gaattacaga taatgatgta ctaattgcc 6600
tagatagtgc caaaatcaac ttcaatgaaa aactctctca acttgagaca tacgcgatac 6660
aatttgatca gtatattaaa gataattatg atccacatga cttaaaaaga actattgctg 6720
agattattga tcgaatcatt gaaaagttaa aaattcttga tgaacagtat catatccgtg 6780
taaattctagc aaaatcaatc cataatctct atttatttgt tgaaaacgtt gatcttaacc 6840
aagttagtag tagtaacacc tcttggatcc aaaatgtgga ttccaattat caagtcaaga 6900
tccaaattca agaaaaacta cagcagctca ggacacaaat tcagaatata gacattcagc 6960
agcttctctc agaggtaaaa cgacagatgg acgctattga tgtcacaatg catttagatc 7020
aattgagaac tgcaattcta ttccaaagaa taagtgcata tattgaccgt gtcaataact 7080
ttgttatgaa tcttattgaa gattttaaag taactgagaa aatcaatact tttagagtta 7140
tagtccgtg gctaattgag aaatatgaag tagaccaaca catccaggtt ttaatggata 7200
aatcagtaga gttggcccac agatatagcc tgagcagacc tcttcagaaa ctcagtaatg 7260
tgctacagcg aattgagata aaagattact atgagaatt ggttgggttt attgatgata 7320
ctggttagtg gcttaaaagca ttgtctttca aaaataccat tgaagaacta aatagattga 7380
ctgacatggt ggtgaagaag ttgaaagcat ttgattatca ccagtttcta gacaaaacca 7440
acagcaaaat ccgtgagatg actcagagaa tcaatgctga aatccaagct ctcaacttc 7500
cacaataaat ggaagcatta aaactgttgg tagaagactt caaaaccaca gtctccaatt 7560
ccctggaag actcaaggac accaaagtaa ctgtggtcat tgattggctg caggatattt 7620
tgactcaaat gaaagaccat ttccaagata ctctggaaga tgtaagagac cgaatttatc 7680
aaatggacat tcagagggaa ctggagcact tcttctctct ggtaaaccaa gtttacagta 7740
cactggtcac ctatatgtct gactggtgga ctctgactgc taaaaacata acagactttg 7800
cagagcaata ttccatccaa aactgggctg agagtataaa agtactggtg gaacaaggat 7860
tcatagttcc tgaatgcaa acatttctgt ggaccatgcc tgcttttgag gtcagtctcc 7920
gtgctctcca agaaggtaac tttcagacc ctgtctttat agtcccctg acagatttga 7980
ggattccatc aattcggata aactttaaaa tggtaaagaa tataaaaaatc ccatttgagat 8040
tttccactcc agaattcact cttctcaaca ccttccatgt ccattccttt acaattgact 8100
tgctggaat aaaagcaaaag atcattagaa ctatcgacca aattttgagc agtgagctac 8160
agtgccctc tccagaaatg tatttgagag acctggatgt agtgaacatt cctcttgcaa 8220
gactgactct gccagacttc catgtaccag aaatcacaat tccagaattc acaatcccaa 8280
atgtcaatct caaagattta cacgttctg atcttcacat accagaattc caacttctc 8340
acctctcaca tacaattgaa atacctgctt ttggcaaaact gcatagcatc ctttaagatcc 8400
aatctcctct ctttatatta gatgctaag ccaacatata gaatgtaaca acttcagga 8460

ES 2 471 978 T3

acaaagcaga gattgtggct tctgtcactg ctaaaggaga gtcccaattt gaagctctca 8520
 attttgattt tcaagcacia gctcaattcc tggagttaaa tcctcatcct ccagtcctga 8580
 aggaatccat gaacttctcc agtaagcatg tgagaatgga gcatgagggg gagatagtat 8640
 ttgatggaaa ggccattgag gggaaatcag acacagtcgc aagtttacac acagagaaaa 8700
 atgaagtaga gtttaataat ggtatgactg tcaaagttaa caatcagctc acccttgaca 8750
 gtcacacaaa gtacttccac aagttgagtg ttcttaggct ggacttctcc agtaaggctt 8820
 ctcttaataa tgaaatcaag acactattag aagctggaca tgtggcattg acatctcag 8880
 ggacagggtc atggaactgg gcctgtccca acttctcgga tgaaggcata cattcgtccc 8940
 aaattagctt tactgtggat ggtcccattg cttttgttgg actatccaat aacataaatg 9000
 gcaaacactt acgggtcatc caaaaactga cttatgaatc tggtctcctc aactattcta 9060
 agtttgaagt tgagtcaaaa gttgaatctc agcacgtggg ctccagcatt ctaacagcca 9120
 atggctcggc actgctcaag gacgcaagg cagaatgac tgggtagcac aatgccact 9180
 taaatggaaa agttattgga actttgaaaa attctctctt cttttcagca caaccatttg 9240
 agattactga atccacaat aatgaaggaa atttgaaggt gggttttcca ctaaagctga 9300
 ctgggaaaat agacttctg aataactatg cattgtttct gagtccccgt gcccaacaag 9360
 caagctggca agcagtagc agattcaatc agtacaata caatcaaac ttttctgcta 9420
 taaacaatga acacaacata gaagccagta taggaatgaa tggagatgcc aacctggatt 9480
 tcttaaacat acccttaaca attcctgaaa ttaacttgcc ttacacggag ttcaaaactc 9540
 ccttactgaa taagtttctc atatgggaa gaaacaggctt gaaagaattt tgaagcaaa 9600
 caaagcaatc atttgatgg agtgtaaagg ctcaatataa aaagaacagt gacaagcatt 9660
 ccattgttgt ccctctgggt atgttttatg aatttattct caacaatgct aattcctggg 9720
 acagaaaaat tgagaaagtc agaaacaatg ctttacattt tcttaccacc tctataatg 9780
 aagcaaaaaa taagttgat aagtacaaaa ctgaaaattc ccttaatcag cctctggga 9840
 cctttcaaaa tcatggctac actatcccag ttgtcaacat tgaagtatct ccatttctg 9900
 tagagacact ggcttccagc catgtgatcc ccacagcaat aagcacccca agtgtcacia 9960
 tccctggctc taacatcatg gtgccttcat acaagttagt gctgccacc ctggagttgc 10020
 cagttttcca tggctctggg aatctattca agttttctc ccagatttc aagggattc 10080
 acactattga caatatttat attccagcca tgggcaactt tacctatgac ttttcttta 10140
 aatcaagtg catcactg aataccaatg ctggacttta taaccaatca gatatcgtg 10200
 cccatttctt ttcttctct tcatttgtca ctgacgacct gcagtacaaa ttagagggaa 10260
 catcagctc gatgcaaaa aggggatgaa aactagccac agctgtctc taaactaaca 10320
 aatttgtaaa gggcagtcac gacagcaca ttagtttaac caagaaaaac aagagttcct 10380
 cagtgagaac aactgccaac ctccatgctc ccatattctc aatgaactc aagcaggaac 10440
 ttaatggaaa tacciaagtca aaacccactg tttcatcatc cattgaaacta aactatgact 10500
 tcaattctc aaagctgca tctactgcaa caggaggcat tgatcacaag ttcagcttag 10560
 aaagtctcac ttcctacttt tcatttgagt cctcaccaa aggaaatc aagagttcct 10620
 tctttctca ggaatattca ggaagtgtt ccaatgaagc caatgtatct ctgaattcca 10680
 agggactcgt gtcttcagtg aggtacaag gagcttccaa agttgatgg atctggaagc 10740
 ttgaagtagg agaaaaat tggcaggtat atagctactt ccacctcca acgcatctac accacatggg 10800
 agcacaatat gaaaaacat ttgcaggtat ctctccccat ggaccatgct aaccttgcta caggttcatg 10860
 catgacagc tactttggag ctctccccat ggaccatgct aaccttgcta caggttcatg 10920
 tgagtcaact cagttccctc ctgacctcc atcactttga ccaggagtg atcctaaaag 10980
 ctaacactaa gaaccagaag atcagctgga aaggtgggg ccaggttgaa tcacgggtt 11040
 ttcagacaaa tgcacagttc tccaatgacc aagaagaaat acggcttgac cttgcaggat 11100
 ccttagacgg acagctgtgg gaccttgaag ctatctttt accagtatat ggcaagagct 11160
 tgcaggaact cctacaaatg gatggaaagc gacagtatct tcaagcttca acttctctt 11220
 tatatacaca aaacccta atggctatctcc tctcactccc cgtgcaagaa ctggctgata 11280
 gatttattat accagggata aaactaaatg acttcagtg agtaaaaatc tataaagaat 11340
 taagtacttc accatttggc ctcaacctaa caatgctccc caaagtaaaa tcccctggga 11400
 ttgatctgtt aacacagtac tctacaccag agggctctc tgtccctatt tttgagga 11460
 ctatacctga aattcattta actgtatccc agtttacact tccaaagagc cttccagttg 11520
 gcaacacagt ctttgatctg aataagttgg ccaacatgat tgccgatgt gacctgcta 11580
 gtgtcaccct gcctgagcag actattgtaa tcccaccctt ggagttctc tgcctgctg 11640
 ggatttttat tcccttctt ggagaactga ctgacagtc tgggatggct tctcccctgt 11700
 ataatgtcac ttggagcgt ggttgaaaa ccaaagcaga tcatgttgaa acgttcttag 11760
 attccatgtg cacttcaacc ttgcagtttc tggagtatgc tttaaaagtt gtgaaacac 11820
 acaaaattga agaagatctg ttaacctata atatcaaagg aacacttcaa cactgtgact 11880
 tcaatgtgga gtataatgaa gatggctat ttaaaggact ttgggactgg cagggagagg 11940
 ctcacctgga catcaccagc ccagcactga ctgacttca tctgtactac aaagaagaca 12000
 agacaagtct gtctgcctca gcagcctcct cgaccatcgg cactgtgggt ctggattcga 12060
 gcacagatga ccagagtgtg gagctgaatg tctacttcca cccacagtc cctccagaga 12120

ES 2 471 978 T3

agaaactcag catattcaaa actgagtgga ggtacaagga gtctgatggt gaaaggtaca 12180
 tcaaaattaa ttggaagaa gaggcagctt ccagattgct aggctcccta aaaagcaatg 12240
 tgccaaggc ttctaaggct atttatgatt atgccaataa gtaccacctg gaatcagttt 12300
 cttcagaact aagaaaaagt ctacaggtca atgctgaaca tgccagaagg atggttgatg 12360
 aatgaaacat gagtttccag agagttagcc gtgataccta ccagaatctc tatgaggaga 12420
 tgttggtcga gaagagcctg agcatccctg agaatctcaa gaagaggggtg ttagacagta 12480
 tagtacatgt tactcagaag taccacatgg cagtcatgtg gctgatggac tcatcattc 12540
 attttctgaa attcaataga gtccagttcc cagggtacgc tggaacatat actgtggacg 12600
 aactctacac tatagtcatg aaggaaacca agaagtcact gtctcagctg tttaatgggt 12660
 taggaaacct actttcctac gttcaaaacc aagtagagaa atcaagatta atcaatgaca 12720
 taacatttaa atgtcctttt ttctcaaac cttgtaaact aaaagatctc atattgattt 12780
 tcaggggagg gttaaacatt ttatcaaaaca taggccaaca ggatatcaag tttacaacaa 12840
 tactaagtag tcttcagggc tttttggaga gagtthttaga catcatagaa gaacaaatta 12900
 aatgcctaaa ggacaatgaa tctacttgtg ttgctgacca tatcaacatg gttttcaaaa 12960
 tacaggctcc atatgctttt aaatccctaa gagaagacat atactttgtc ctccggtgagt 13020
 tcaatgactt tcttcaatcc atacttcagg aggggtccta caagctacag cagggtccatc 13080
 agtatatgaa ggccttcgt gaagagtatt ttgatccgag catggttggg tggacagtga 13140
 aatattatga aatagaagaa aatatggtg agctgatcaa gacccttta gtttccttta 13200
 gggatgtcta ctctgaatat agtgtgacag ctgctgattt tgcttcaaaa atgtcaactc 13260
 aagttgaaca atttgtgtcc agggatatca gagagtatct tagcatgctt actgatataa 13320
 atggaaaagt gatggaaaag attgcagagc tttctattgt ggcaaaggaa acaatgaaaa 13380
 gctgggtcac tgcctgggcc aaaataatgt ctgattacc ccagcagttc cactccaatc 13440
 tgcaggattt ttcagaccaa ctctctagct actatgaaaa atttgttggg gagtccacaa 13500
 gattgattga cctgtccatt caaaactacc acgtgtttct cagatacatc accgagttac 13560
 tgagaaaagt gcaggtggcc acagccaata atgtgagccc ctatataaag cttgctcaag 13620
 gagagctgat gatcaccttc tgattcatct actaacaat tcaattaaa ccttcacata 13680
 gtaggagact ttgtagacta ctataaagac catcctgagc cagacctgca gtcaacagca 13740
 agagcaagaa gcacatagga actataacct caaccaagct ggcataagaa ccaagacctt 13800
 caaagcagcc tgaactcaag atgacatatt ttacaagtta gagttaaagtc aagagctgag 13860
 ttgtttgtc caactcagga tggaggagg gagggaaggg gaaataaata aatacttctc 13920
 tattgtgc 13928

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto antisentido corto de 10 a 14 monómeros de longitud, que comprende una región salto de 2'-desoxirribonucleótido flanqueada por cada lado por un ala, en el que cada ala comprende de forma independiente 1 a 3 monómeros modificados de alta afinidad que son nucleótidos modificados con azúcar que comprenden un puente entre la posición 4' y 2' del azúcar, y en el que el compuesto antisentido corto está dirigido a un ácido nucleico que codifica ApoB para uso en terapia.
2. El compuesto antisentido corto de la reivindicación 1, para uso en:
- (i) tratar un trastorno o enfermedad metabólica o cardiovascular;
 - (ii) reducir el riesgo de cardiopatía coronaria (CPC) o prevenir CPC en un sujeto;
 - (iii) ralentizar o detener la progresión de aterosclerosis en un sujeto, o prevenir la aterosclerosis; o
 - (iv) tratar hipercolesterolemia, hipercolesterolemia no familiar, hipercolesterolemia familiar, hipercolesterolemia familiar heterocigótica, hipercolesterolemia familiar homocigótica, dislipidemia mixta, aterosclerosis, un riesgo de desarrollar aterosclerosis, cardiopatía coronaria, antecedentes de cardiopatía coronaria, cardiopatía coronaria de inicio precoz, uno o más factores de riesgo de cardiopatía coronaria, diabetes de tipo II, diabetes de tipo II con dislipidemia, dislipidemia, hipertrigliceridemia, hiperlipidemia, hiperacidemia grasa, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica, o enfermedad de hígado graso no alcohólica.
3. Uso de un compuesto antisentido corto de 10 a 14 monómeros de longitud, que comprende una región salto de 2'-desoxirribonucleótido flanqueada por cada lado por un ala, en el que cada ala comprende de forma independiente 1 a 3 monómeros modificados de alta afinidad que son nucleótidos modificados con azúcar que comprenden un puente entre la posición 4' y 2' del azúcar, y en el que el compuesto antisentido corto está dirigido a un ácido nucleico que codifica ApoB, en la fabricación de un medicamento para:
- (i) tratar un trastorno o enfermedad metabólica o cardiovascular;
 - (ii) reducir el riesgo de cardiopatía coronaria (CPC) o prevenir CPC en un sujeto;
 - (iii) ralentizar o detener la progresión de aterosclerosis en un sujeto, o prevenir la aterosclerosis; o
 - (iv) tratar hipercolesterolemia, hipercolesterolemia no familiar, hipercolesterolemia familiar, hipercolesterolemia familiar heterocigótica, hipercolesterolemia familiar homocigótica, dislipidemia mixta, aterosclerosis, un riesgo de desarrollar aterosclerosis, cardiopatía coronaria, antecedentes de cardiopatía coronaria, cardiopatía coronaria de inicio precoz, uno o más factores de riesgo de cardiopatía coronaria, diabetes de tipo II, diabetes de tipo II con dislipidemia, dislipidemia, hipertrigliceridemia, hiperlipidemia, hiperacidemia grasa, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica, o enfermedad de hígado graso no alcohólica.
4. El compuesto antisentido corto o uso de cualquier reivindicación precedente, en el que el sujeto a tratar es un ser humano.
5. El compuesto antisentido corto o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la conformación de cada uno de dichos nucleótidos modificados con azúcar es, de forma independiente, β -D o α -L.
6. El compuesto antisentido corto o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que cada uno de dichos puentes comprende de forma independiente 1 o de 2 a 4 grupos unidos seleccionados de forma independiente de -[C(R₁)(R₂)]n-, -C(R₁)=C(R₂)-, -C(R₁)=N-, -C(=NR₁)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R₁)₂-, -S(=O)_x- y -N(R₁)-;
- en los que
- x es 0, 1 ó 2;
 - n es 1, 2, 3 ó 4;
 - cada uno de R₁ y R₂ es, de forma independiente, H, un grupo protector, hidroxilo, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alquenilo C₂-C₁₂, alquenilo C₂-C₁₂ sustituido, alquinilo C₂-C₁₂, alquinilo C₂-C₁₂ sustituido, arilo C₅-C₂₀, arilo C₅-C₂₀ sustituido, radical heterociclo, radical heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical alicíclico C₅-C₇, radical alicíclico C₅-C₇ sustituido, halógeno, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, CN, sulfonilo (S(=O)₂-J₁) o sulfoxilo (S(=O)-J₁); y
 - cada uno de J₁ y J₂ es, de forma independiente, H, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alquenilo C₂-C₁₂, alquenilo C₂-C₁₂ sustituido, alquinilo C₂-C₁₂, alquinilo C₂-C₁₂ sustituido, arilo C₅-C₂₀, arilo C₅-C₂₀ sustituido,

acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, aminoalquilo C₁-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂ sustituido o un grupo protector.

- 5 7. El compuesto antisentido corto o uso de la reivindicación 6, en el que cada uno de dichos puentes es, de forma independiente, 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2' 4'-CH₂-O-N(R₁)-2' ó 4'-CH₂-N(R₁)-O-2'- en los que cada R₁ es, de forma independiente, H, un grupo protector o alquilo C₁-C₁₂.
8. El compuesto antisentido corto o uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos un enlace monomérico es un enlace monomérico modificado.
9. El compuesto antisentido o uso de la reivindicación 8, en el que el enlace monomérico modificado es un enlace fosforotioato.
- 10 10. El compuesto antisentido corto o uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que cada enlace monomérico es un enlace internucleosídico fosforotioato.
11. El compuesto antisentido corto o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que tiene 10-13 monómeros de longitud.
- 15 12. El compuesto antisentido corto o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que tiene 10-12 monómeros de longitud.
13. El compuesto antisentido corto o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que tiene 10-11 monómeros de longitud.
14. El compuesto antisentido corto o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que tiene 10 monómeros de longitud.
- 20 15. El compuesto antisentido corto o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que tiene 11 monómeros de longitud.
16. El compuesto antisentido corto o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que tiene 12 monómeros de longitud.
- 25 17. El compuesto antisentido corto o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que tiene 13 monómeros de longitud.
18. El compuesto antisentido corto o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que tiene 14 monómeros de longitud.
- 30 19. El compuesto antisentido corto o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que tiene un motivo seleccionado de 1-12-1; 2-10-2; 1-10-1; 1-10-2; 3-8-3; 2-8-2; 1-8-1; y 3-6-3, en el que el primer número representa el número de monómeros en el ala 5', el segundo número representa el número de monómeros en el salto, y el tercer número representa el número de monómeros en el ala 3'.