

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 689**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2011 PCT/US2011/034661**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011 WO11139917**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2011 E 11778071 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2563920**

54 Título: **Modulación de la expresión de transtiretina**

30 Prioridad:

20.10.2010 US 405163 P

29.04.2010 US 329538 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MONIA, BRETT, P.;
FREIER, SUSAN, M. y
SIWKOWSKI, ANDREW, M.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 625 689 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).

Modulación de la expresión de transtiretina**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

En el presente documento se proporcionan compuestos y composiciones para reducir la expresión del ARNm de la transtiretina y la proteína transtiretina en un animal. Tales compuestos y composiciones son útiles, por ejemplo, para tratar, prevenir o mejorar la amiloidosis por transtiretina.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La transtiretina (TTR), (también conocida como prealbúmina, hipertiroxinemia, disprealbuminémica, tiroxina; amiloidosis sistémica senil, polineuropatía amiloide, amiloidosis I, PALB; distranstiretinémica, HST2651, TBPA; hipertiroxinemia eutiroidea disprealbuminémica) es una proteína sérica/plasmática y del líquido cefalorraquídeo responsable del transporte de tiroxina y retinol (Sakaki *et al.*, Mol. Biol. Med. 1989, 6:161-8). Estructuralmente, la TTR es un homotetrámero; las mutaciones puntuales y el plegamiento anómalo de la proteína conducen a la deposición de fibrillas de amiloide y se asocia con trastornos tales como la amiloidosis sistémica senil (ASS), la polineuropatía amiloide familiar (PAF) y la miocardiopatía amiloide familiar (MAF).

15

La TTR es sintetizada principalmente por el hígado y el plexo coroideo del cerebro y, en menor grado, por la retina en los seres humanos (Palha, Clin. Chem. Lab. Med., 2002, 40, 1292-1300). La transtiretina que se sintetiza en el hígado se secreta a la sangre, mientras que la transtiretina originada en el plexo coroideo está destinada al LCR. En el plexo coroideo, la síntesis de transtiretina representa aproximadamente el 20% de la síntesis total de proteínas locales y hasta el 25% de las proteínas totales del LCR (Dickson *et al.*, J Biol. Chem., 1986, 261, 3475-3478).

20

Gracias a la disponibilidad de ensayos de diagnóstico genético e inmunohistoquímico, se han encontrado pacientes con amiloidosis por TTR en muchas naciones en todo el mundo. Estudios recientes indican que la amiloidosis por TTR no es una enfermedad endémica rara como se pensaba anteriormente, y que puede afectar hasta a un 25% de la población de edad avanzada (Tanskanen *et al.*, Ann Med. 2008; 40(3):232-9).

25

A nivel bioquímico, la TTR se identificó como el componente proteico principal en los depósitos de amiloide de los pacientes con PAF (Costa *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 1978, 75:4499-4503) y más tarde, se descubrió que una sustitución de valina por metionina en la posición 30 de la proteína era el defecto molecular más común que originaba la enfermedad (Saraiva *et al.*, J. Clin. Invest., 1984, 74: 104-119). En la PAF, la deposición extracelular sistémica generalizada de agregados de TTR y fibrillas de amiloide se produce por todo el tejido conectivo, particularmente en el sistema nervioso periférico (Sousa y Saraiva, Prog. Neurobiol., 2003, 71:385-400). Después de la deposición de TTR, se produce una degeneración axonal, que comienza en las fibras mielinizadas y no mielinizadas de pequeño diámetro, y que conduce finalmente a la pérdida neuronal en los sitios ganglionares.

30

35

Los compuestos y los métodos de tratamiento descritos en el presente documento proporcionan ventajas significativas frente a las opciones de tratamiento actualmente disponibles para los trastornos relacionados con la TTR. La amiloidosis por TTR conduce por lo general a la muerte en el plazo de diez años, y hasta hace poco, se consideraba incurable. El trasplante hepático es un medio eficaz de reemplazo del alelo asociado a la enfermedad por un alelo silvestre (WT) en los casos hereditarios porque el hígado es por lo general la fuente de TTR amiloidogénica. Aunque el trasplante hepático es eficaz como forma de terapia génica, no está carente de problemas. El trasplante se complica por la necesidad de cirugía invasiva para el receptor y el donante, el tratamiento inmunosupresor después del trasplante a largo plazo, una escasez de donantes, su alto costo y el gran número de pacientes con amiloidosis por TTR que no son buenos candidatos debido a evolución de su enfermedad. Lamentablemente, la amiloidosis cardíaca evoluciona en algunos pacientes con enfermedad hereditaria incluso después del trasplante hepático debido a que, con frecuencia, sigue depositándose TTR WT. La deposición de TTR en el sistema nervioso central (SNC) tampoco se alivia mediante el trasplante debido a su síntesis por el plexo coroideo. El trasplante no es una opción viable para la enfermedad por TTR más frecuente, la amiloidosis sistémica senil (ASS), que afecta aproximadamente al 25% de los mayores de 80 años debido a la deposición de TTR WT.

40

45

La tecnología antisentido está emergiendo como un medio eficaz para reducir la expresión de productos génicos específicos y, por tanto, puede resultar ser excepcionalmente útil en varias aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de investigación para la modulación de la expresión de TTR (véanse las publicaciones de patente estadounidenses nº 2008/0039418 y nº 2007/0299027).

50

En el documento WO 2010/017509 se divulgan compuestos, composiciones y métodos para modular la expresión de transtiretina en el cerebro.

55

Benson *et al.* (2006) Muscle & Nerve 33(5):609-618 describen la supresión dirigida de una transtiretina amiloidogénica con oligonucleótidos antisentido.

60

65

Sekijima *et al.* (2008) *Current Pharmaceutical Design* 14(30):3219-3230 analizan la patogenia y las estrategias terapéuticas para mejorar la amiloidosis por transtiretina.

5 Kurosawa *et al.* (2005) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337(3):1012-1018 se refiere al silenciamiento selectivo de un alelo de transtiretina mutante por ARN interferentes pequeños.

Tasaki *et al.* (2010) *Amyloid: The International Journal of Experimental and Clinical Investigation* 17 (suplemento 1): 52-53 se refiere al tratamiento con ARNip para la amiloidosis ocular relacionada con la TTR.

10 Benson *et al.* (2007) *Muscle & Nerve* 36(4):411-423 es una revisión que aborda la biología molecular y las características clínicas de la neuropatía amiloide.

15 El documento WO 2010/048228 se refiere a composiciones y métodos para inhibir la expresión de transtiretina.

La presente invención proporciona composiciones para modular la expresión de transtiretina. Los compuestos antisentido para modular la expresión de transtiretina se divulgan en las solicitudes de patente publicadas anteriormente mencionadas. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de más de tales compuestos.

20 RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de bases nitrogenadas que consiste en los 20 nucleósidos unidos que aparecen en la SEQ ID NO: 80.

25 La invención también proporciona una composición que comprende el compuesto de la invención o una sal del mismo y al menos uno de un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

30 La invención también proporciona un compuesto de la invención o una composición de la invención para utilizarse en el tratamiento de la amiloidosis por transtiretina en un ser humano.

RESUMEN DE LA DIVULGACION

35 En el presente documento se divulgan métodos, compuestos y composiciones para modular la expresión del ARNm de la transtiretina (TTR) y la proteína transtiretina. En determinadas formas de realización, los compuestos útiles para modular la expresión del ARNm de la TTR y la proteína TTR son compuestos antisentido. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido son oligonucleótidos antisentido.

40 En determinadas formas de realización, la modulación puede producirse en una célula o un tejido. En determinadas formas de realización, la célula o el tejido se encuentra en un animal. En determinadas formas de realización, el animal es un ser humano. En determinadas formas de realización, se reducen los niveles de ARNm de la TTR. En determinadas formas de realización, se reducen los niveles proteicos de TTR. Tal reducción puede darse de manera dependiente del tiempo o de manera dependiente de la dosis.

45 En el presente documento se divulgan métodos, compuestos y composiciones para modular la expresión de transtiretina y tratar, prevenir, retrasar o mejorar la amiloidosis por transtiretina y o un síntoma de la misma. En determinadas formas de realización se encuentran métodos, compuestos y composiciones para modular la expresión de transtiretina y tratar, prevenir, retrasar o mejorar la enfermedad amiloide por transtiretina o la amiloidosis por transtiretina o la amiloidosis relacionada con la transtiretina (por ejemplo, la amiloidosis hereditaria por TTR, la amiloidosis leptomeníngea, la polineuropatía amiloide por transtiretina, la polineuropatía amiloide familiar, la miocardiopatía amiloide familiar o la amiloidosis sistémica senil).

50 En determinadas formas de realización, se trata a un animal que presenta el riesgo de padecer amiloidosis por transtiretina administrando al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 8 a 80 nucleósidos unidos, en las que el oligonucleótido modificado es complementario a un ácido nucleico de la transtiretina tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2; o una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 8 a 80 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nitrogenadas que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases nitrogenadas contiguas de una secuencia de bases nitrogenadas seleccionada de entre cualquiera de las secuencias de bases nitrogenadas que aparecen en las SEQ ID NO: 25, 80, 86, 87, 115, 120, 122 o 124.

60 En determinadas formas de realización, se trata a un animal que padece amiloidosis por transtiretina administrando al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 20 nucleósidos unidos, en las que el oligonucleótido modificado tiene una complementariedad del 100% con un ácido nucleico de la transtiretina como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2; o una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido

65

modificado que consiste en 20 nucleósidos unidos y que tiene la secuencia de bases nitrogenadas que aparece en la SEQ ID NO: 80.

5 En determinadas formas de realización, se trata a un animal que padece amiloidosis por transtiretina administrando al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 20 nucleósidos unidos, en las que el oligonucleótido modificado tiene una complementariedad del 100% con un ácido nucleico de la transtiretina como se muestra en la SEQ ID NO: 1; y en las que el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 20 nucleósidos unidos que tienen la secuencia de bases nitrogenadas que aparece en la SEQ ID NO: 80.

10 En determinadas formas de realización, se trata a un animal que padece amiloidosis por transtiretina administrando al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 20 nucleósidos unidos, en las que el oligonucleótido modificado tiene una complementariedad del 100% con un ácido nucleico de la transtiretina como se muestra en la SEQ ID NO: 1; en las que el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 20 nucleósidos unidos que tienen la secuencia de bases nitrogenadas que aparece en la SEQ ID NO: 80; y en las que los oligonucleótidos modificados tienen un segmento de separación de 10 desoxinucleósidos unidos entre dos segmentos de ala que tienen independientemente 5 nucleósidos modificados unidos. En determinadas formas de realización, uno o más nucleósidos modificados del segmento de ala tienen un azúcar modificado. En determinadas formas de realización, el nucleósido modificado es un nucleósido con sustitución en la posición 2'. En determinadas formas de realización, el nucleósido modificado es un nucleósido 2'-MOE.

15 En determinadas formas de realización, la modulación puede producirse en una célula, un tejido, un órgano o un organismo. En determinadas formas de realización, la célula, el tejido o el órgano se encuentra en un animal. En determinadas formas de realización, el animal es un ser humano. En determinadas formas de realización, se reducen los niveles de ARNm de la transtiretina. En determinadas formas de realización, se reducen los niveles proteicos de transtiretina. Tal reducción puede producirse de manera dependiente del tiempo o de manera dependiente de la dosis.

20 También se divulgan métodos, compuestos y composiciones útiles para prevenir, tratar y mejorar enfermedades, trastornos y afecciones relacionadas con la amiloidosis por transtiretina. En determinadas formas de realización, tales enfermedades, trastornos y afecciones son enfermedades, trastornos o afecciones relacionadas con la amiloidosis por transtiretina.

25 En determinadas formas de realización, los métodos de tratamiento incluyen administrar un compuesto antisentido dirigido a la TTR a un individuo que lo necesite. En determinadas formas de realización, los métodos de tratamiento incluyen administrar un oligonucleótido antisentido dirigido a la TTR a un individuo que lo necesite.

30 En determinadas formas de realización, los métodos de tratamiento incluyen administrar un oligonucleótido antisentido dirigido a la transtiretina y un tratamiento adicional a un individuo que lo necesite.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35 Debe entenderse que tanto la precedente descripción general como la siguiente descripción detallada son solamente ejemplares y explicativas, y que no restringen la invención, tal como se reivindica. En el presente documento, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. Tal como se utiliza en el presente documento, el uso de "o" se refiere a "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso de la expresión "que incluye" así como otras formas, tales como "incluye" y "incluido/a", no es limitativo. Además, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan elementos y componentes que comprenden una unidad, y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

40 Los encabezamientos de las secciones utilizados en el presente documento tienen sólo fines organizativos y no deben interpretarse como limitativos de la materia objeto descrita.

Definiciones

45 A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y las técnicas de, la química analítica, la química orgánica sintética, y la química médica y farmacéutica descritas en la presente son aquellas bien conocidas y utilizadas comúnmente en la técnica. Para la síntesis química y el análisis químico pueden utilizarse técnicas convencionales.

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

65 "2'-O-metoxietilo" (también 2'-MOE y 2'-O(CH₂)₂-OCH₃) se refiere a una modificación O-metoxi-etilo de la posición 2' de un anillo furosilo. Un azúcar modificado 2'-O-metoxietilado es un azúcar modificado.

"Nucleótido 2'-O-metoxietilado" se refiere a un nucleótido que comprende un resto azúcar modificado 2'-O-metoxietilado.

5 "5-metilcitosina" se refiere a una citosina modificada con un grupo metilo fijado a la posición 5'. Una 5-metilcitosina es una base nitrogenada modificada.

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

15 "Región diana activa" o "región diana" se refiere a una región a la que se dirigen uno o más compuestos antisentido activos. "Compuestos antisentido activos" se refiere a compuestos antisentido que reducen los niveles de ácido nucleico diana o los niveles de proteína.

20 "Administrado de forma concomitante" se refiere a la coadministración de dos agentes de cualquier manera en la que los efectos farmacológicos de ambos se manifiesten en el paciente al mismo tiempo. La administración concomitante no requiere que ambos agentes se administren en una sola composición farmacéutica, en la misma forma farmacéutica, o por la misma vía de administración. No es necesario que los efectos de ambos agentes se manifiesten al mismo tiempo. Los efectos sólo tienen que superponerse durante un período de tiempo y no tienen por qué ser coextensivos.

25 "Administrar" se refiere a proporcionar un agente farmacéutico a un individuo, e incluye, pero no se limita a, la administración por parte de un profesional sanitario y a la autoadministración.

"Mejoramiento" se refiere a una disminución de al menos un indicador, signo o síntoma de una enfermedad, trastorno o afección asociada. El rigor de los indicadores puede determinarse mediante medidas subjetivas u objetivas, que son conocidas por los expertos en la materia.

30 La "amiloidosis" es un grupo de enfermedades o trastornos resultado de depósitos anómalos de proteína (amiloide o fibrillas de amiloide) en diversos tejidos corporales. Las proteínas amiloides pueden depositarse en una zona particular del cuerpo (amiloidosis localizada) o pueden depositarse por todo el cuerpo (amiloidosis sistémica). Existen tres tipos de amiloidosis sistémica: primaria (AL), secundaria (AA) y familiar (ATTR). La amiloidosis primaria no está asociada con ninguna otra enfermedad y se considera una entidad morbosa por sí misma. La amiloidosis secundaria se produce como resultado de otra enfermedad. La fiebre mediterránea familiar es una forma de amiloidosis familiar (heredada).

40 "Animal" se refiere a un ser humano o a un animal no humano, incluidos, pero sin limitarse a, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y primates no humanos, incluidos, pero sin limitarse a, monos y chimpancés

45 "Actividad antisentido" se refiere a cualquier actividad detectable o mensurable atribuible a la hibridación de un compuesto antisentido con su ácido nucleico diana. En determinadas formas de realización, la actividad antisentido es una disminución de la cantidad o expresión de un ácido nucleico diana o proteína codificada por tal ácido nucleico diana.

"Compuesto antisentido" se refiere a un compuesto oligomérico que es capaz de hibridar con un ácido nucleico diana mediante enlaces de hidrógeno.

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

55 "Oligonucleótido antisentido" se refiere a un oligonucleótido monocatenario que tiene una secuencia de bases nitrogenadas que permite la hibridación con una región o segmento correspondiente de un ácido nucleico diana.

60 "Azúcar bicíclico" se refiere a un anillo furosilo modificado por la formación de puentes entre dos átomos del anillo no geminales. Un azúcar bicíclico es un azúcar modificado.

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

65 "Estructura de caperuza" o "resto de caperuza terminal" se refiere a modificaciones químicas, que se han incorporado en cualquiera de los extremos terminales de un compuesto antisentido.

"Sistema nervioso central (SNC)" se refiere al sistema nervioso de los vertebrados, que está encerrado en las meninges. Contiene la mayor parte del sistema nervioso, y consiste en el cerebro (en los vertebrados que tienen cerebro) y la médula espinal. El SNC está contenido dentro de la cavidad dorsal, encontrándose el cerebro dentro de la cavidad craneal y la médula espinal en el canal espinal. El cerebro también está protegido por el cráneo, y la médula espinal, en los vertebrados, también está protegida por las vértebras.

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

"Compuesto antisentido híbrido" se refiere a un compuesto antisentido que tiene al menos dos regiones químicamente distintas.

"Plexo coroideo" es la zona de los ventrículos del cerebro en la que se produce el líquido cefalorraquídeo (LCR).

"Coadministración" se refiere a la administración, a un individuo, de dos o más agentes farmacéuticos. Los dos o más agentes farmacéuticos pueden estar en una sola composición farmacéutica, o pueden estar en composiciones farmacéuticas distintas. Cada uno de los dos o más agentes farmacéuticos puede administrarse por la misma vía de administración o por vías diferentes. La coadministración abarca la administración paralela o secuencial.

"Complementariedad" se refiere a la capacidad de apareamiento entre bases nitrogenadas de un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico.

"Bases nitrogenadas contiguas" se refiere a bases nitrogenadas inmediatamente adyacentes entre sí.

"Diluyente" se refiere a un ingrediente en una composición que carece de actividad farmacológica, pero es farmacéuticamente necesario o deseable. Por ejemplo, el diluyente en una composición inyectada puede ser un líquido, por ejemplo, solución salina.

"Dosis" se refiere a una cantidad especificada de un agente farmacéutico proporcionada en una administración única, o en un período de tiempo especificado. En determinadas formas de realización, puede administrarse una dosis en uno, dos o más bolos, comprimidos o inyecciones. Por ejemplo, en determinadas formas de realización en las que se desea la administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen que no cabe fácilmente en una sola inyección, por lo tanto, pueden utilizarse dos o más inyecciones para conseguir la dosis deseada. En determinadas formas de realización, el agente farmacéutico se administra mediante infusión durante un período de tiempo prolongado o continuamente. Las dosis pueden indicarse como la cantidad de agente farmacéutico por hora, día, semana o mes.

"Cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de agente farmacéutico activo suficiente para lograr un resultado fisiológico deseado en un individuo que necesita el agente. La cantidad eficaz puede variar de unos individuos a otros dependiendo del estado físico y de salud del individuo a tratar, del grupo taxonómico de los individuos a tratar, de la formulación de la composición, de la evaluación del estado patológico del individuo, y de otros factores pertinentes.

La "amiloidosis familiar" o "amiloidosis hereditaria" es una forma de amiloidosis heredada.

La "polineuropatía amiloide familiar" o "PAF" es un trastorno neurodegenerativo transmitido genéticamente, caracterizado por deposiciones sistémicas de variantes amiloides de la proteína transtiretina, que ocasionan una polineuropatía sensorial y motora progresiva.

"Totalmente complementario" o "tiene una complementariedad del 100%" se refiere a que cada base nitrogenada de una secuencia de bases nitrogenadas de un primer ácido nucleico tiene una base nitrogenada complementaria en una segunda secuencia de bases nitrogenadas de un segundo ácido nucleico. En determinadas formas de realización, un primer ácido nucleico es un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana es un segundo ácido nucleico.

"*Gapmer*" se refiere a un compuesto antisentido híbrido en el que hay una región interna con una pluralidad de nucleósidos que soportan la escisión por la ARNasa H situada entre unas regiones externas con uno o más nucleósidos, en el que los nucleósidos que comprenden la región interna son químicamente distintos del nucleósido o nucleósidos que comprenden las regiones externas. La región interna puede denominarse "segmento de separación" y las regiones externas pueden denominarse "segmentos de ala".

"Con la separación ampliada" se refiere a un compuesto antisentido híbrido con un segmento de separación de 12 o más 2'-desoxirribonucleósidos contiguos situados entre, e inmediatamente adyacentes a, unos segmentos de ala 5' y 3' que tienen de uno a seis nucleósidos.

5 La "amiloidosis por transtiretina (TTR) hereditaria" es una enfermedad sistémica debida a mutaciones en la transtiretina, una proteína plasmática de transporte para la tiroxina y la vitamina A. Se asocia con mayor frecuencia con una neuropatía periférica y una miocardiopatía restrictiva, pero los depósitos de amiloide en las paredes de los vasos sanguíneos y las estructuras de tejido conectivo por todo el cuerpo suelen ocasionar la disfunción de otros sistemas orgánicos. Las anomalías de la motilidad gastrointestinal son comunes en esta enfermedad, acompañadas de estreñimiento, diarrea y saciedad precoz debida al vaciamiento gástrico retardado. Los depósitos de tejido conectivo de amiloide en las muñecas pueden originar el síndrome del túnel carpiano. Los depósitos de amiloide en los vasos sanguíneos medulares y las estructuras circundantes ocasionan raquiestenosis con síntomas de claudicación.

15 "Hibridación" se refiere al apareamiento de moléculas de ácido nucleico complementarias. En determinadas formas de realización, las moléculas de ácido nucleico complementarias incluyen un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana.

20 "Inmediatamente adyacente" se refiere a que no hay elementos intercalados entre los elementos inmediatamente adyacentes.

"Individuo" se refiere a un ser humano o a un animal no humano seleccionado para un tratamiento o terapia.

25 "Administración intracerebroventricular" o "administración intraventricular cerebral" o "administración ventricular cerebral" se refiere a la administración, mediante inyección o infusión, en el sistema ventricular del cerebro.

"Administración intraperitoneal" se refiere a la administración a la cavidad peritoneal.

30 "Administración intratecal" se refiere a la administración, mediante inyección o infusión, en el líquido cefalorraquídeo que baña la médula espinal y el cerebro.

"Administración intravenosa" se refiere a la administración en una vena.

35 "Administración intraventricular" se refiere a la administración en los ventrículos del cerebro o del corazón.

40 "Enlace internucleosídico" se refiere al enlace químico entre nucleósidos. "Leptomeningeo" se refiere a que está relacionado con las leptomeninges, las dos capas más internas de los tejidos que cubren el cerebro y la médula espinal. "Amiloidosis leptomenígea" se refiere a la amiloidosis de las leptomeninges resultado de la deposición amiloide de transtiretina dentro de las leptomeninges.

"Nucleósidos unidos" se refiere a nucleósidos adyacentes que están unidos entre sí.

45 "Desapareamiento" o "base nitrogenada no complementaria" se refiere al caso en el que una base nitrogenada de un primer ácido nucleico no es capaz de aparearse con la correspondiente base nitrogenada de un segundo ácido nucleico o ácido nucleico diana.

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

"Base nitrogenada modificada" se refiere a cualquier base nitrogenada que no sea adenina, citosina, guanina, timidina o uracilo. Una "base nitrogenada no modificada" se refiere a las bases purínicas adenina (A) y guanina (G), y a las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U).

55 "Nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido que tiene, de manera independiente, un resto azúcar modificado, un enlace internucleosídico modificado o una base nitrogenada modificada. Un "nucleósido modificado" se refiere a un nucleósido que tiene, de manera independiente, un resto azúcar modificado o una base nitrogenada modificada.

60 "Oligonucleótido modificado" se refiere a un oligonucleótido que comprende al menos un nucleótido modificado.

"Azúcar modificado" se refiere a una sustitución o cambio de un azúcar natural.

65 "Motivo" se refiere al patrón de regiones químicamente distintas en un compuesto antisentido.

"Enlace internucleosídico natural" se refiere a un enlace fosfodiéster 3' a 5'.

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

5 "Ácido nucleico" se refiere a moléculas compuestas por nucleótidos monoméricos. Un ácido nucleico incluye ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos nucleicos monocatenarios, ácidos nucleicos bicatenarios, ARN interferente pequeño (ARNip) y microARN (miARN). Un ácido nucleico también puede comprender una combinación de estos elementos en una sola molécula.

10 "Base nitrogenada" se refiere a un resto heterocíclico capaz de aparearse con una base de otro ácido nucleico.

15 "Secuencia de bases nitrogenadas" se refiere al orden de bases nitrogenadas contiguas independiente de cualquier modificación de un azúcar, un enlace o una base nitrogenada.

"Nucleósido" se refiere a una base nitrogenada unida a un azúcar.

20 "Nucleótido" se refiere a un nucleósido con un grupo fosfato unido covalentemente a la porción azúcar del nucleósido.

"Compuesto oligomérico" u "oligómero" se refiere a un polímero de subunidades monoméricas unidas que es capaz de hibridar con al menos una región de una molécula de ácido nucleico.

25 "Oligonucleótido" se refiere a un polímero de nucleósidos unidos, cada uno de los cuales puede estar modificado o no modificado, independiente uno del otro.

30 "Administración parenteral" se refiere a la administración mediante inyección o infusión. La administración parenteral incluye la administración subcutánea, la administración intravenosa, la administración intramuscular, la administración intraarterial, la administración intraperitoneal o la administración intracraneal, por ejemplo, la administración intracerebral, la administración intratecal, la administración intraventricular, la administración ventricular, la administración intracerebroventricular, la administración intraventricular cerebral o la administración ventricular cerebral. La administración puede ser continua, o crónica, o corta o intermitente.

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

40 "Composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de sustancias adecuada para administrarse a un individuo. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender uno o más agentes farmacéuticos activos y una solución acuosa estéril.

"Sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos antisentido, es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del oligonucleótido original y no le confieren efectos toxicológicos no deseados.

45 "Enlace fosforotioato" se refiere a un enlace entre nucleósidos en el que el enlace fosfodiéster se modifica reemplazando uno de los átomos de oxígeno no-puente con un átomo de azufre. Un enlace fosforotioato es un enlace internucleosídico modificado.

50 "Porción" se refiere a un número definido de bases nitrogenadas contiguas (es decir, unidas) de un ácido nucleico. En determinadas formas de realización, una porción es un número definido de bases nitrogenadas contiguas de un ácido nucleico diana. En determinadas formas de realización, una porción es un número definido de bases nitrogenadas contiguas de un compuesto antisentido.

55 "Prevenir" se refiere a retrasar o evitar la aparición o el desarrollo de una enfermedad, trastorno o afección durante un período de tiempo que va de minutos a indefinidamente. Prevenir también se refiere a reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección.

60 "Profármaco" se refiere a un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte en una forma activa dentro del cuerpo o sus células por la acción de enzimas endógenas u otros productos químicos o condiciones.

65 "Efectos secundarios" se refiere a respuestas fisiológicas atribuibles a un tratamiento, distintas de los efectos deseados. En determinadas formas de realización, los efectos secundarios incluyen reacciones en el sitio de la inyección, anomalías en las pruebas de función hepática, anomalías de la función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anomalías del sistema nervioso central, miopatías y malestar. Por ejemplo, el aumento de los niveles

de aminotransferasa en suero puede indicar toxicidad hepática o anomalías de la función hepática. Por ejemplo, el aumento de la bilirrubina puede indicar toxicidad hepática o anomalías de la función hepática.

5 "Oligonucleótido monocatenario" se refiere a un oligonucleótido que no está hibridado con una hebra complementaria.

10 "Que puede hibridar específicamente" se refiere a un compuesto antisentido que tiene el grado de complementariedad suficiente entre un oligonucleótido antisentido y un ácido nucleico diana para inducir un efecto deseado, presentando al mismo tiempo efectos mínimos o nulos sobre los ácidos nucleicos no diana en condiciones en las que se desea una unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* y tratamientos terapéuticos.

"Administración subcutánea" se refiere a la administración justo por debajo de la piel.

15 "Que se dirige a" o "dirigido a" se refiere al proceso de diseño y selección de un compuesto antisentido que hibrida específicamente con un ácido nucleico diana e induce un efecto deseado.

20 "Ácido nucleico diana", "ARN diana" y "transcrito de ARN diana", se refieren a un ácido nucleico al que pueden dirigirse los compuestos antisentido.

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

25 "Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente farmacéutico que proporciona un beneficio terapéutico a un individuo.

30 "Inhibidor específico de la transtiretina" o "inhibidor de la transtiretina" se refiere a cualquier compuesto capaz de disminuir la expresión del ARNm de la transtiretina o de la proteína transtiretina. Los ejemplos de tales compuestos incluyen un ácido nucleico, un péptido, un anticuerpo o un inhibidor de la histona desacetilasa.

"Modulador específico de la transtiretina" o "modulador de la transtiretina" se refiere a cualquier compuesto capaz de aumentar o disminuir la expresión del ARNm de la transtiretina o de la proteína transtiretina.

35 "Amiloidosis relacionada con la transtiretina" o "amiloidosis por transtiretina" o "enfermedad amiloide por transtiretina", tal como se utilizan en el presente documento, es cualquier proceso patológico o enfermedad asociada con la disfunción o mala regulación de la transtiretina que da como resultado la formación de fibrillas de amiloide que contienen transtiretina. La amiloidosis por transtiretina incluye, pero no se limita a, la amiloidosis hereditaria por TTR, la amiloidosis leptomeníngea, la polineuropatía amiloide familiar (PAF), la miocardiopatía amiloide familiar, la amiloidosis oculoleptoméngea familiar, la amiloidosis cardíaca senil o la amiloidosis sistémica senil.

40 "Tratar" se refiere a administrar una composición farmacéutica para lograr una modificación o mejora de una enfermedad, trastorno o afección.

45 "Nucleótido no modificado" se refiere a un nucleótido compuesto por bases nitrogenadas, restos azúcar y enlaces internucleosídicos naturales. En determinadas formas de realización, un nucleótido no modificado es un nucleótido de ARN (es decir, -D-ribonucleósidos) o un nucleótido de ADN (es decir, -D-desoxirribonucleósido).

50 *Determinadas formas de realización*

Determinadas formas de realización de la divulgación son métodos, compuestos y composiciones para inhibir la expresión de transtiretina.

55 Determinadas formas de realización divulgan compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de la transtiretina. En determinadas formas de realización, el ácido nucleico de la transtiretina es cualquiera de las secuencias presentadas en el nº de registro del GENBANK NM_000371.2 (incorporada en el presente documento como la SEQ ID NO: 1), el número de registro del GENBANK NT_010966.10 truncada desde el nucleótido 2009236 hasta el 2017289 (incorporada en el presente documento como la SEQ ID NO: 2); los exones 1-4 extraídos de la secuencia genómica de mono rhesus con el nº de registro del GENBANK NW_001105671.1, basándose en la similitud con los exones humanos; y el nº de registro del GENBANK NW_001105671.1 truncada desde el nucleótido 628000 hasta el 638000 (incorporada en el presente documento como la SEQ ID NO: 4).

60 Determinadas formas de realización divulgan compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado que consiste en 8 a 80 nucleósidos unidos, en el que los nucleósidos unidos comprenden al menos 8 bases nitrogenadas contiguas de una secuencia seleccionada de entre las secuencias de bases nitrogenadas que aparecen en las SEQ ID NO: 25, 80, 86, 87, 115, 120, 122 y 124. En determinadas formas de realización, el

oligonucleótido modificado comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 bases nitrogenadas contiguas de una secuencia seleccionada de entre las secuencias de bases nitrogenadas que aparecen en las SEQ ID NO: 25, 80, 86, 87, 115, 120, 122 y 124.

5 Determinadas formas de realización de la divulgación son compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado que consiste en 8 a 80 nucleósidos unidos, en el que los nucleósidos unidos comprenden al menos 8 bases nitrogenadas contiguas de la secuencia de bases nitrogenadas que aparece en la SEQ ID NO: 80. En determinadas formas de realización, el oligonucleótido modificado comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11,
10 al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 bases nitrogenadas contiguas de una secuencia seleccionada de entre las secuencias de bases nitrogenadas que aparecen en la SEQ ID NO: 80.

15 Determinadas formas de realización de la divulgación son compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 50 nucleósidos unidos, en el que los nucleósidos unidos comprenden al menos 8 bases nitrogenadas contiguas de la secuencia de bases nitrogenadas que aparece en la SEQ ID NO: 80. En determinadas formas de realización, el oligonucleótido modificado comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11,
20 al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 bases nitrogenadas contiguas de una secuencia seleccionada de entre las secuencias de bases nitrogenadas que aparecen en la SEQ ID NO: 80.

Determinadas formas de realización de la divulgación son compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos unidos, en el que los nucleósidos unidos comprenden al menos 8 bases nitrogenadas contiguas de la secuencia de bases nitrogenadas que aparece en la SEQ ID NO: 80. En determinadas formas de realización, el oligonucleótido modificado comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11,
25 al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 bases nitrogenadas contiguas de una secuencia seleccionada de entre las secuencias de bases nitrogenadas que aparecen en la SEQ ID NO: 80.

30 Determinadas formas de realización de la divulgación son compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado que consiste en 15 a 25 nucleósidos unidos, en el que los nucleósidos unidos comprenden al menos 8 bases nitrogenadas contiguas de la secuencia de bases nitrogenadas que aparece en la SEQ ID NO: 80. En determinadas formas de realización, el oligonucleótido modificado comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11,
35 al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 bases nitrogenadas contiguas de una secuencia seleccionada de entre las secuencias de bases nitrogenadas que aparecen en la SEQ ID NO: 80.

Determinadas formas de realización de la divulgación son compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado que consiste en 18 a 21 nucleósidos unidos, en el que los nucleósidos unidos comprenden al menos 8 bases nitrogenadas contiguas de la secuencia de bases nitrogenadas que aparece en la SEQ ID NO: 80. En determinadas formas de realización, el oligonucleótido modificado comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11,
40 al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 bases nitrogenadas contiguas de una secuencia seleccionada de entre las secuencias de bases nitrogenadas que aparecen en la SEQ ID NO: 80.
45

Determinadas formas de realización de la divulgación son compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado que consiste en 20 a 30 nucleósidos unidos, en el que los nucleósidos unidos comprenden al menos 8 bases nitrogenadas contiguas de la secuencia de bases nitrogenadas que aparece en la SEQ ID NO: 80. En determinadas formas de realización, el oligonucleótido modificado comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11,
50 al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18 o al menos 19 bases nitrogenadas contiguas de la secuencia de bases nitrogenadas que aparece en la SEQ ID NO: 80.

En determinadas formas de realización, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 20 nucleósidos unidos expuestos en la SEQ ID NO: 80.
55

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

60 En determinadas formas de realización, el oligonucleótido modificado consiste en 20 nucleósidos unidos.

En determinadas formas de realización, la secuencia de bases nitrogenadas del oligonucleótido modificado tiene una complementariedad de al menos un 90% en toda su longitud con una secuencia de bases nitrogenadas de la SEQ ID NO: 1, 2 o 4. En determinadas formas de realización, la secuencia de bases nitrogenadas del oligonucleótido modificado tiene una complementariedad de al menos un 95% en toda su longitud con una secuencia de bases nitrogenadas de la SEQ ID NO: 1, 2 o 4. En determinadas formas de realización, el oligonucleótido modificado tiene una complementariedad de al menos un 99% en toda su longitud con la SEQ ID NO: 1, 2 o 4. En
65

determinadas formas de realización, la secuencia de bases nitrogenadas del oligonucleótido modificado tiene una complementariedad del 100% en toda su longitud con una secuencia de bases nitrogenadas de la SEQ ID NO: 1, 2 o 4.

5 En determinadas formas de realización, el compuesto tiene al menos un enlace internucleosídico modificado. En determinadas formas de realización, el enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico fosforotioato.

10 En determinadas formas de realización, el compuesto tiene al menos un nucleósido que comprende un azúcar modificado. En determinadas formas de realización, el al menos un azúcar modificado es un azúcar bicíclico. En determinadas formas de realización, el al menos un azúcar bicíclico comprende un puente 4'-CH(CH₃)-O-2'. En determinadas formas de realización, el al menos un azúcar modificado comprende un 2'-O-metoxietilo.

15 En determinadas formas de realización, el compuesto comprende al menos un nucleósido modificado tetrahidropirano, en el que un anillo tetrahidropirano reemplaza el anillo furanósico. En determinadas formas de realización, el al menos un nucleósido modificado tetrahidropirano tiene la estructura:



en la que B_x es un resto base heterocíclica opcionalmente protegido.

30 En determinadas formas de realización, el compuesto tiene al menos un nucleósido que comprende una base nitrogenada modificada. En determinadas formas de realización, la base nitrogenada modificada es una 5-metilcitosina.

En determinadas formas de realización, el oligonucleótido modificado del compuesto comprende:

- 35
- (i) un segmento de separación que consiste en desoxinucleósidos unidos;
 - (ii) segmento de ala 5' que consiste en nucleósidos unidos;
 - (iii) un segmento de ala 3' que consiste en nucleósidos unidos, en el que el segmento de separación se encuentra entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', y en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado.
- 40

En determinadas formas de realización, el oligonucleótido modificado del compuesto comprende:

- 45
- (i) un segmento de separación que consiste en diez desoxinucleósidos unidos;
 - (ii) segmento de ala 5' que consiste en cinco nucleósidos unidos;
 - (iii) segmento de ala 3' que consiste en cinco nucleósidos unidos, en el que el segmento de separación se encuentra inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo; y en el que cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato.

50 En determinadas formas de realización, el oligonucleótido modificado del compuesto comprende:

- 55
- (i) un segmento de separación que consiste en ocho desoxinucleósidos unidos;
 - (ii) segmento de ala 5' que consiste en seis nucleósidos unidos;
 - (iii) segmento de ala 3' que consiste en seis nucleósidos unidos, en el que el segmento de separación se encuentra inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo; y en el que cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato.

60 En determinadas formas de realización, el oligonucleótido modificado del compuesto comprende:

- 65
- (i) un segmento de separación que consiste en ocho desoxinucleósidos unidos;
 - (ii) segmento de ala 5' que consiste en cinco nucleósidos unidos;
 - (iii) segmento de ala 3' que consiste en cinco nucleósidos unidos, en el que el segmento de separación se encuentra inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo; y en el que cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato.

En determinadas formas de realización, el oligonucleótido modificado del compuesto comprende:

- 5 (i) un segmento de separación que consiste en diez desoxinucleósidos unidos;
 (ii) segmento de ala 5' que consiste en cinco nucleósidos unidos;
 (iii) segmento de ala 3' que consiste en cinco nucleósidos unidos, en el que el segmento de separación se encuentra inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo; y en el que cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato; y en el que la secuencia de bases nitrogenadas comprende al menos 8 bases nitrogenadas contiguas de la secuencia de bases nitrogenadas que aparece en la SEQ ID NO: 80.

En determinadas formas de realización, el oligonucleótido modificado del compuesto comprende:

- 15 (i) un segmento de separación que consiste en diez desoxinucleósidos unidos;
 (ii) segmento de ala 5' que consiste en cinco nucleósidos unidos;
 (iii) segmento de ala 3' que consiste en cinco nucleósidos unidos, en el que el segmento de separación se encuentra inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo; y en el que cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato; y en el que la secuencia de bases nitrogenadas se expone en la SEQ ID NO: 80.

25 Determinadas formas de realización divulgan una composición que comprende un compuesto según se describe en el presente documento, o una sal del mismo, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En determinadas formas de realización, la composición comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nitrogenadas que comprende al menos 12 bases nitrogenadas contiguas de una secuencia de bases nitrogenadas seleccionada de entre las secuencias de bases nitrogenadas que aparecen en las SEQ ID NO: 25, 80, 86, 87, 115, 120, 122 y 124 o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

30 Determinadas formas de realización divulgan una composición que comprende un compuesto según se describe en el presente documento, o una sal del mismo, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En determinadas formas de realización, la composición comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nitrogenadas que comprende al menos 12 bases nitrogenadas contiguas de las secuencias de bases nitrogenadas expuestas en la SEQ ID NO: 80 o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

35 Determinadas formas de realización divulgan una composición que comprende un compuesto según se describe en el presente documento, en las que el nivel de viscosidad es inferior a 40 cP. En determinadas formas de realización, la composición tiene un nivel de viscosidad inferior a 15 cP. En determinadas formas de realización, la composición tiene un nivel de viscosidad inferior a 12 cP. En determinadas formas de realización, la composición tiene un nivel de viscosidad inferior a 10 cP.

40 Determinadas formas de realización de la divulgación son métodos para tratar, prevenir o mejorar la amiloidosis por transtiretina.

45 Determinadas formas de realización divulgan métodos que comprenden administrar a un animal un compuesto según se describe en el presente documento. En determinadas formas de realización, el método comprende administrar a un animal un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nitrogenadas que comprende al menos 8 bases nitrogenadas contiguas de una secuencia de bases nitrogenadas seleccionada de entre las secuencias de bases nitrogenadas que aparecen en las SEQ ID NO: 25, 80, 86, 87, 115, 120, 122 y 124.

50 Determinadas formas de realización divulgan métodos que comprenden administrar a un animal un compuesto según se describe en el presente documento. En determinadas formas de realización, el método comprende administrar a un animal un compuesto u oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos unidos, en el que los nucleósidos unidos comprenden al menos una porción de 8 bases nitrogenadas contiguas complementaria de una porción de la misma longitud dentro de la región seleccionada de los nucleótidos 501-535 o 580-608 de la SEQ ID NO: 1.

55 Determinadas formas de realización divulgan métodos que comprenden administrar a un animal un compuesto según se describe en el presente documento. En determinadas formas de realización, el método comprende administrar a un animal un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nitrogenadas que comprende al menos 8 bases nitrogenadas contiguas de una secuencia de bases nitrogenadas que aparece en la SEQ ID NO: 80.

60

65

Determinadas formas de realización divulgan métodos que comprenden administrar a un animal un compuesto según se describe en el presente documento. En determinadas formas de realización, el método comprende administrar a un animal un compuesto u oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos unidos, en el que los nucleósidos unidos comprenden al menos una porción de 8 bases nitrogenadas contiguas complementaria de una porción de la misma longitud dentro de la región seleccionada de los nucleótidos 508-527 de la SEQ ID NO: 1.

En determinadas formas de realización, el animal es un ser humano.

En determinadas formas de realización, la administración previene, trata, mejora o retrasa la evolución de la amiloidosis por transtiretina según se describe en el presente documento.

En determinadas formas de realización, el compuesto se coadministra con un segundo agente.

En determinadas formas de realización, el compuesto y el segundo agente se administran de forma concomitante.

En determinadas formas de realización, la administración es la administración parenteral. En determinadas formas de realización, la administración parenteral es la administración subcutánea. En determinadas formas de realización, la formulación para la administración es el compuesto en solución salina. En determinadas formas de realización, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nitrogenadas que comprende al menos 12 bases nitrogenadas contiguas de una secuencia de bases nitrogenadas seleccionada de entre las secuencias de bases nitrogenadas que aparecen en las SEQ ID NO: 25, 80, 86, 87, 115, 120, 122 y 124, o una sal del mismo y solución salina. En determinadas formas de realización, la formulación no incluye ningún agente estabilizador ni agentes estabilizadores adicionales, incluidos agentes lipídicos.

En determinadas formas de realización, la administración es la administración parenteral. En determinadas formas de realización, la administración parenteral es la administración intracraneal. En determinadas formas de realización, la administración intracraneal es la administración intracerebral, intratecal, intraventricular, ventricular, intracerebroventricular, intraventricular cerebral o ventricular cerebral.

Determinadas formas de realización de la divulgación son métodos para reducir la expresión del ARNm de la transtiretina o de la proteína transtiretina en un animal, que comprende administrar al animal un compuesto o composición según se describe en el presente documento para reducir la expresión del ARNm de la transtiretina o de la proteína transtiretina en el animal. En determinadas formas de realización, el animal es un ser humano. En determinadas formas de realización, la reducción de la expresión del ARNm de la transtiretina o de la proteína transtiretina previene, trata, mejora o retrasa la evolución de la amiloidosis por transtiretina.

Determinadas formas de realización de la divulgación son métodos para tratar a un ser humano que padece una enfermedad relacionada con la transtiretina, que comprende identificar al ser humano que padece la enfermedad y administrar al ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición según se describe en el presente documento. En determinadas formas de realización, el tratamiento reduce un síntoma seleccionado del grupo que consiste en la inquietud, la falta de coordinación, el nistagmo, la paraparesia espástica, la falta de coordinación muscular, las alteraciones de la visión, el insomnio, las sensaciones extrañas, la mioclonía, la ceguera, la afasia, el síndrome del túnel carpiano, las convulsiones, las hemorragias subaracnoideas, el ictus y la hemorragia cerebral, la hidrocefalia, la ataxia y la parálisis espástica, el coma, la neuropatía sensorial, la parestesia, la hipoestesia, la neuropatía motora, la neuropatía autonómica, la hipotensión ortostática, el estreñimiento cíclico, la diarrea cíclica, las náuseas, el vómito, la disminución de la sudoración, la impotencia, el vaciamiento gástrico retardado, la retención urinaria, la incontinencia urinaria, la cardiopatía progresiva, la fatiga, la dificultad respiratoria, la pérdida de peso, la falta de apetito, el entumecimiento, el hormigueo, la debilidad, la macroglosia, el síndrome nefrótico, la insuficiencia cardíaca congestiva, la disnea de esfuerzo, el edema periférico, las arritmias, las palpitaciones, el mareo, el síncope, la hipotensión postural, los problemas de los nervios periféricos, el deterioro sensoriomotor, la neuropatía de las extremidades inferiores, la neuropatía de las extremidades superiores, la hiperalgesia, la sensibilidad térmica alterada, la debilidad de las extremidades inferiores, la caquexia, el edema periférico, la hepatomegalia, la púrpura, la disfunción diastólica, las contracciones ventriculares prematuras, la neuropatía craneal, la disminución de los reflejos tendinosos profundos, los depósitos de amiloide en el humor vítreo, la opacidad vítrea, la xerofalmia, el glaucoma, el aspecto festoneado en las pupilas, la hinchazón de los pies debida a la retención de agua. En determinadas formas de realización, el síntoma es un síntoma cognitivo seleccionado del grupo que consiste en el deterioro de la memoria, el deterioro de la capacidad de juicio y de razonamiento, el deterioro de la capacidad de planificación, la alteración de la flexibilidad, el deterioro del pensamiento abstracto, el deterioro de la capacidad de adquisición de reglas, el deterioro de la capacidad para iniciar acciones apropiadas, el deterioro de la capacidad para inhibir acciones inapropiadas, el deterioro de la memoria a corto plazo, el deterioro de la memoria a largo plazo, la paranoia, la desorientación, la confusión, la alucinación y la demencia. En determinadas formas de realización, el síntoma es un síntoma psiquiátrico seleccionado del grupo que consiste en la demencia, la ansiedad, la depresión, el embotamiento afectivo, el

egocentrismo, la agresividad, el comportamiento compulsivo, la irritabilidad, los cambios de personalidad, incluidos el deterioro de la memoria, de la capacidad de juicio y de razonamiento, y la idea suicida.

5 Otras formas de realización de la divulgación son métodos para tratar a un ser humano que padece amiloidosis por transtiretina que conduce a una amiloidosis cardíaca, y administrar al ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición según se describe en el presente documento. En determinadas formas de realización, el tratamiento reduce un síntoma seleccionado del grupo que consiste en la insuficiencia cardíaca congestiva, la cardiomegalia, la disnea de esfuerzo, el edema periférico, las arritmias, las palpitaciones, el mareo, el síncope, la deposición en el subendotelio de la vasculatura periférica puede conducir a una hipotensión postural grave, la disfunción diastólica, el bloqueo cardíaco, las contracciones ventriculares prematuras, y diversas taquiarritmias.

15 Otras formas de realización de la divulgación son métodos para tratar a un ser humano que padece amiloidosis por transtiretina que conduce a trastornos neuropáticos periféricos, y administrar al ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición según se describe en el presente documento. En determinadas formas de realización, el tratamiento reduce un síntoma seleccionado del grupo que consiste en problemas de los nervios periféricos, el deterioro sensoriomotor, la neuropatía de las extremidades inferiores, la neuropatía de las extremidades superiores, la hiperalgesia, la sensibilidad térmica alterada, la debilidad de las extremidades inferiores, el dolor, la disautonomía, manifestada con frecuencia como una disfunción sexual o urinaria, la debilidad y la deficiencia sensorial simétrica, la hipotensión ortostática, la diarrea y/o la impotencia.

20 Otras formas de realización de la divulgación son métodos para tratar a un ser humano que padece amiloidosis por transtiretina que conduce a trastornos gastrointestinales, y administrar al ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición según se describe en el presente documento. En determinadas formas de realización, el tratamiento reduce un síntoma seleccionado del grupo que consiste en la diarrea, el estreñimiento, las náuseas, el vómito, y los trastornos renales y hepáticos relacionados.

25 También se divulga un método para reducir o prevenir la amiloidosis por transtiretina, que comprende administrar a un ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición según se describe en el presente documento, reduciendo o previniendo así la amiloidosis por transtiretina.

30 También se divulga un método para reducir o prevenir una enfermedad cardíaca, que comprende administrar a un ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición según se describe en el presente documento, reduciendo o previniendo así una enfermedad cardíaca. También se divulga un método para reducir o prevenir una enfermedad neuropática, que comprende administrar a un ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición según se describe en el presente documento, reduciendo o previniendo así una enfermedad neuropática. También se divulga un método para reducir o prevenir una enfermedad gastrointestinal, que comprende administrar a un ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición según se describe en el presente documento, reduciendo o previniendo así una enfermedad gastrointestinal.

35 También se divulga un método para mejorar un síntoma de la amiloidosis por transtiretina, que comprende administrar a un ser humano que lo necesite un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos unidos, en el que dicho oligonucleótido modificado hibrida específicamente con la SEQ ID NO: 1, 2 o 4, mejorando así un síntoma de la amiloidosis por transtiretina en el ser humano.

40 También se divulga un método para reducir la tasa de progresión de un síntoma asociado con la amiloidosis por transtiretina, que comprende administrar a un ser humano que lo necesite un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos unidos, en el que dicho oligonucleótido modificado hibrida específicamente con la SEQ ID NO: 1, 2 o 4, reduciendo así la tasa de progresión de un síntoma de la amiloidosis por transtiretina en el ser humano.

45 También se divulga un método para revertir la degeneración indicada por un síntoma asociado con una amiloidosis por transtiretina, administrando a un ser humano que lo necesite un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos unidos, en el que dicho oligonucleótido modificado hibrida específicamente con la SEQ ID NO: 1, 2 o 4, revertiendo así la degeneración indicada por un síntoma de la enfermedad amiloide por transtiretina en el ser humano.

50 También se divulga un método para mejorar un síntoma de la amiloidosis por transtiretina, que comprende administrar a un ser humano que lo necesite un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nitrogenadas que comprende al menos 8 bases nitrogenadas contiguas de una secuencia de bases nitrogenadas que aparece en la SEQ ID NO: 80, mejorando así un síntoma de la amiloidosis por transtiretina en el ser humano.

55 Otras formas de realización de la divulgación son métodos para tratar a un ser humano que padece amiloidosis por transtiretina, administrando a un ser humano que lo necesite un compuesto que comprende un

oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nitrogenadas que comprende al menos 8 bases nitrogenadas contiguas de una secuencia de bases nitrogenadas que aparece en la SEQ ID NO: 80, tratando así la amiloidosis por transtiretina en un ser humano.

5 En determinadas formas de realización, el síntoma es un síntoma físico, cognitivo, psiquiátrico o periférico. En determinadas formas de realización, el síntoma es un síntoma físico seleccionado del grupo que consiste en la inquietud, la falta de coordinación, el nistagmo, la paraparesia espástica, la falta de coordinación muscular, las alteraciones de la visión, el insomnio, las sensaciones extrañas, la mioclonía, la ceguera, la afasia, el síndrome del túnel carpiano, las convulsiones, las hemorragias subaracnoideas, el ictus y la hemorragia cerebral, la hidrocefalia, la ataxia, y la parálisis espástica, el coma, la neuropatía sensorial, la parestesia, la hiperestesia, la neuropatía motora, la neuropatía autonómica, la hipotensión ortostática, el estreñimiento cíclico, la diarrea cíclica, las náuseas, el vómito, la disminución de la sudoración, la impotencia, el vaciamiento gástrico retardado, la retención urinaria, la incontinencia urinaria, la cardiopatía progresiva, la fatiga, la dificultad respiratoria, la pérdida de peso, la falta de apetito, el entumecimiento, el hormigueo, la debilidad, la macroglosia, el síndrome nefrótico, la insuficiencia cardíaca congestiva, la disnea de esfuerzo, el edema periférico, las arritmias, las palpitaciones, el mareo, el síncope, la hipotensión postural, los problemas de los nervios periféricos, el deterioro sensoriomotor, la neuropatía de las extremidades inferiores, la neuropatía de las extremidades superiores, la hiperalgesia, la sensibilidad térmica alterada, la debilidad de las extremidades inferiores, la caquexia, el edema periférico, la hepatomegalia, la púrpura, la disfunción diastólica, las contracciones ventriculares prematuras, la neuropatía craneal, la disminución de los reflejos tendinosos profundos, los depósitos de amiloide en el humor vítreo, la opacidad vítrea, la xeroftalmia, el glaucoma, el aspecto festoneado en las pupilas, la hinchazón de los pies debida a la retención de agua. En determinadas formas de realización, el síntoma es un síntoma cognitivo seleccionado del grupo que consiste en el deterioro de la memoria, el deterioro de la capacidad de juicio y de razonamiento, el deterioro de la capacidad de planificación, la alteración de la flexibilidad, el deterioro del pensamiento abstracto, el deterioro de la capacidad de adquisición de reglas, el deterioro de la capacidad para iniciar acciones apropiadas, el deterioro de la capacidad para inhibir acciones inapropiadas, el deterioro de la memoria a corto plazo, el deterioro de la memoria a largo plazo, la paranoia, la desorientación, la confusión, la alucinación y la demencia. En determinadas formas de realización, el síntoma es un síntoma psiquiátrico seleccionado del grupo que consiste en la demencia, la ansiedad, la depresión, el embotamiento afectivo, el egocentrismo, la agresividad, el comportamiento compulsivo, la irritabilidad, los cambios de personalidad, incluidos el deterioro de la memoria, de la capacidad de juicio y de razonamiento, y la idea suicida.

En determinadas formas de realización, el síntoma es al menos uno de entre al menos un síntoma físico, al menos un síntoma cognitivo, al menos un síntoma psiquiátrico, y al menos un síntoma periférico.

35 En determinadas formas de realización, el síntoma físico está seleccionado del grupo que consiste en la inquietud, la falta de coordinación, los movimientos involuntariamente iniciados, los movimientos involuntariamente inacabados, la marcha inestable, la corea, la rigidez, los movimientos de contorsión, las posturas anormales, la inestabilidad, las expresiones faciales anormales, la dificultad para masticar, la disfagia, la dificultad para hablar, las convulsiones y los trastornos del sueño.

40 En determinadas formas de realización, el síntoma cognitivo está seleccionado del grupo que consiste en el deterioro de la memoria, el deterioro de la capacidad de juicio y de razonamiento, el deterioro de la capacidad de planificación, la alteración de la flexibilidad, el deterioro del pensamiento abstracto, el deterioro de la capacidad de adquisición de reglas, el deterioro de la capacidad para iniciar acciones apropiadas, el deterioro de la capacidad para inhibir acciones inapropiadas, el deterioro de la memoria a corto plazo, el deterioro de la memoria a largo plazo, la paranoia, la desorientación, la confusión, la alucinación y la demencia.

45 En determinadas formas de realización el síntoma psiquiátrico está seleccionado del grupo que consiste en la demencia, la ansiedad, la depresión, el embotamiento afectivo, el egocentrismo, la agresividad, el comportamiento compulsivo, la irritabilidad, los cambios de personalidad, incluidos el deterioro de la memoria, de la capacidad de juicio y de razonamiento, y la idea suicida.

50 En determinadas formas de realización el síntoma periférico está seleccionado del grupo que consiste en la reducción de la masa cerebral, la atrofia muscular, la insuficiencia cardíaca, la tolerancia alterada a la glucosa, la pérdida de peso, la osteoporosis y la atrofia testicular.

También se proporcionan métodos y compuestos para preparar un medicamento para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad relacionada con el sistema nervioso central.

60 Determinadas formas de realización proporcionan el uso de un compuesto según se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar, mejorar o prevenir una amiloidosis por transtiretina.

65 Determinadas formas de realización proporcionan un compuesto según se describe en el presente documento para utilizarse en el tratamiento, la prevención o la mejoría de la amiloidosis por transtiretina según se describe en el presente documento mediante terapia de combinación con un agente o tratamiento adicional según se

describe en el presente documento. Los agentes o tratamientos pueden coadministrarse o administrarse de forma concomitante.

5 Determinadas formas de realización proporcionan el uso de un compuesto según se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o mejorar la amiloidosis por transtiretina según se describe en el presente documento mediante terapia de combinación con un agente o tratamiento adicional según se describe en el presente documento. Los agentes o tratamientos pueden coadministrarse o administrarse de forma concomitante.

10 Determinadas formas de realización proporcionan el uso de un compuesto según se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o mejorar la amiloidosis por transtiretina según se describe en el presente documento en un paciente al que posteriormente se administra un agente o tratamiento adicional según se describe en el presente documento.

15 Determinadas formas de realización proporcionan un kit para tratar, prevenir o mejorar la amiloidosis por transtiretina según se describe en el presente documento, en las que el kit comprende:

- 20 (i) un compuesto según se describe en el presente documento; y, como alternativa,
(ii) un agente o tratamiento adicional según se describe en el presente documento.

Un kit según se describe en el presente documento puede incluir adicionalmente instrucciones para utilizar el kit para tratar, prevenir o mejorar la amiloidosis por transtiretina según se describe en el presente documento mediante terapia de combinación según se describe en el presente documento.

25 *Compuestos antisentido*

Los compuestos oligoméricos incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos, compuestos antisentido, oligonucleótidos antisentido y ARNip. Un compuesto oligomérico puede ser "antisentido" con respecto a un ácido nucleico diana, lo que significa que es capaz de hibridar con un ácido nucleico diana mediante enlaces de hidrógeno.

35 En determinadas formas de realización, un compuesto antisentido tiene una secuencia de bases nitrogenadas que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana al que se dirige. En algunas de tales formas de realización, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de bases nitrogenadas que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana al que se dirige.

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

50 En determinadas formas de realización, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado acortado o truncado. El oligonucleótido modificado acortado o truncado puede tener un único nucleósido deleciónado del extremo 5' (truncamiento 5'), o como alternativa, del extremo 3' (truncamiento 3'). Un oligonucleótido acortado o truncado puede tener dos nucleósidos deleciónados del extremo 5', o como alternativa, puede tener dos subunidades deleciónadas del extremo 3'. Como alternativa, los nucleósidos deleciónados pueden estar dispersos por todo el oligonucleótido modificado, por ejemplo, en un compuesto antisentido con un nucleósido deleciónado del extremo 5' y un nucleósido deleciónado del extremo 3'.

55 Cuando hay un solo nucleósido adicional en un oligonucleótido alargado, el nucleósido adicional puede estar situado en el extremo 5' o 3' del oligonucleótido. Cuando hay dos o más nucleósidos adicionales, los nucleósidos añadidos pueden ser adyacentes entre sí, por ejemplo, en un oligonucleótido con dos nucleósidos añadidos al extremo 5' (adición 5'), o como alternativa, al extremo 3' (adición 3'), del oligonucleótido. Como alternativa, el nucleósido añadido puede estar disperso por todo el compuesto antisentido, por ejemplo, en un oligonucleótido con un nucleósido añadido al extremo 5' y una subunidad añadida al extremo 3'.

60 Es posible aumentar o disminuir la longitud de un compuesto antisentido, tal como un oligonucleótido antisentido, y/o introducir bases desapareadas sin eliminar la actividad. Por ejemplo, en Woolf *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:7305-7309, 1992), se ensayó una serie de oligonucleótidos antisentido de 13-25 bases nitrogenadas de longitud para determinar su capacidad para inducir la escisión de un ARN diana en un modelo de

65

inyección en oocitos. Los oligonucleótidos antisentido de 25 bases nitrogenadas de longitud con 8 u 11 bases desapareadas cerca de los extremos de los oligonucleótidos antisentido fueron capaces de dirigir la escisión específica del ARNm diana, aunque en menor medida que los oligonucleótidos antisentido que no contenían desapareamientos. Del mismo modo, se consiguió la escisión específica de la diana utilizando 13 oligonucleótidos antisentido de 13 bases nitrogenadas, incluidos aquellos con 1 o 3 desapareamientos.

Gautschi *et al.* (J. Natl. Cancer Inst. 93:463-471, marzo de 2001) demostraron la capacidad de un oligonucleótido con una complementariedad del 100% con el ARNm de bcl-2 y que tenía 3 desapareamientos con respecto al ARNm de bcl-xL para reducir la expresión tanto de bcl-2 como de bcl-xL *in vitro* e *in vivo*. Además, este oligonucleótido demostró tener una potente actividad antitumoral *in vivo*.

Maher y Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358,1988) ensayaron una serie de oligonucleótidos antisentido en tándem de 14 bases nitrogenadas, y unos oligonucleótidos antisentido de 28 y 42 bases nitrogenadas puestos por la secuencia de dos o tres de los oligonucleótidos antisentido en tándem, respectivamente, para determinar su capacidad de detener la traducción de la DHFR humana en un ensayo de reticulocitos de conejo. Cada uno de los tres oligonucleótidos antisentido de 14 bases nitrogenadas en solitario era capaz de inhibir la traducción, aunque a un nivel más modesto que los oligonucleótidos antisentido de 28 o 42 bases nitrogenadas.

Motivos de los compuesto antisentido

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

Los compuestos antisentido híbridos contienen por lo general al menos una región modificada a fin de conferir mayor resistencia a la degradación por nucleasas, mejor captación celular, mayor afinidad de unión por el ácido nucleico diana, y/o mayor actividad inhibidora. Una segunda región de un compuesto antisentido híbrido puede opcionalmente hacer de sustrato para la endonucleasa celular ARNasa H, que escinde la hebra de ARN de un dúplex ARN:ADN.

Los compuestos antisentido que tienen un motivo *gapmer* se consideran compuestos antisentido híbridos. En un *gapmer* hay una región interna con una pluralidad de nucleótidos o nucleósidos unidos que soporta la escisión por la ARNasa H, situada entre unas regiones externas que tienen una pluralidad de nucleótidos o nucleósidos unidos que son químicamente distintos de los nucleótidos o nucleósidos unidos de la región interna. En el caso de un oligonucleótido antisentido con un motivo *gapmer*, el segmento de separación generalmente hace de sustrato para la escisión por la endonucleasa, mientras que los segmentos de ala comprenden nucleósidos modificados. En determinadas formas de realización, las regiones de un *gapmer* se diferencian por los tipos de restos azúcar que comprenden cada región distinta. Los tipos de restos azúcar que se utilizan para diferenciar las regiones de un *gapmer* pueden incluir en algunas formas de realización β -D-ribonucleósidos, β -D-desoxirribonucleósidos, nucleósidos con modificación en 2' (tales nucleósidos con modificación en 2' pueden incluir 2'-MOE y 2'-O-CH₃, entre otros), y nucleósidos modificados con azúcar bicíclico (tales nucleósidos modificados con azúcar bicíclico pueden incluir aquellos con un puente 4'-(CH₂)_n-O-2', en los que n = 1 o n = 2). Preferentemente, cada región distinta comprende restos azúcar uniformes. El motivo ala-separación-ala se describe con frecuencia como "X-Y-Z", en los que "X" representa la longitud de la región de ala 5', "Y" representa la longitud de la región de separación, y "Z" representa la longitud de la región de ala 3'. Tal como se utiliza en el presente documento, un *gapmer* descrito como "X-Y-Z" tiene una configuración tal que el segmento de separación se encuentra inmediatamente adyacente al segmento de ala 5' y al segmento de ala 3'. Por lo tanto, no existen nucleótidos intercalados entre el segmento de ala 5' y el segmento de separación, ni entre el segmento de separación y el segmento de ala 3'. Cualquiera de los compuestos antisentido descritos en el presente documento puede tener un motivo *gapmer*. En algunas formas de realización, X y Z son iguales, en otras formas de realización son diferentes. En una forma de realización preferente, Y tiene entre 8 y 15 nucleótidos. X, Y o Z pueden tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o más nucleótidos. Por lo tanto, los *gapmers* incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo 5-10-5, 4-8-4, 4-12-3, 4-12-4, 3-14-3, 2-13-5, 2-16-2, 1-18-1, 3-10-3, 2-10-2, 1-10-1, 2-8-2, 6-8-6 o 5-8-5.

En determinadas formas de realización, el compuesto antisentido tiene un motivo "*wingmer*", que tiene una configuración ala-separación o separación-ala, es decir, una configuración X-Y o Y-Z tal como se ha descrito anteriormente para la configuración del *gapmer*. Por lo tanto, las configuraciones *wingmer* incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo 5-10, 8-4, 4-12, 12-4, 3-14, 16-2, 18-1, 10-3, 2-10, 1-10, 8-2, 2-13 o 5-13.

En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de la transtiretina poseen un motivo *gapmer* 5-10-5.

En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de la transtiretina poseen un motivo *gapmer* 6-8-6.

En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de la transtiretina poseen un motivo *gapmer* 5-8-5.

5 En determinadas formas de realización, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de la transtiretina tiene un motivo con la separación ampliada.

10 En determinadas formas de realización, un oligonucleótido antisentido con la separación ampliada dirigido a un ácido nucleico de la transtiretina tiene un segmento de separación de diez 2'-desoxirribonucleótidos situado inmediatamente adyacente a y entre segmentos de ala de cinco nucleósidos modificados químicamente. En determinadas formas de realización, la modificación química comprende una modificación en la posición 2' del azúcar. En otra forma de realización, la modificación química comprende una modificación con MOE en la posición 2' del azúcar.

15 En determinadas formas de realización, un oligonucleótido antisentido con la separación ampliada dirigido a un ácido nucleico de la transtiretina tiene un segmento de separación de ocho 2'-desoxirribonucleótidos situado inmediatamente adyacente a y entre segmentos de ala de cinco nucleósidos modificados químicamente. En determinadas formas de realización, la modificación química comprende una modificación en la posición 2' del azúcar. En otra forma de realización, la modificación química comprende una modificación con MOE en la posición 2' del azúcar.

20 En determinadas formas de realización, un oligonucleótido antisentido con la separación ampliada dirigido a un ácido nucleico de la transtiretina tiene un segmento de separación de ocho 2'-desoxirribonucleótidos situado inmediatamente adyacente a y entre segmentos de ala de seis nucleósidos modificados químicamente. En determinadas formas de realización, la modificación química comprende una modificación en la posición 2' del azúcar. En otra forma de realización, la modificación química comprende una modificación con MOE en la posición 2' del azúcar.

Ácidos nucleicos diana, regiones diana y secuencias de nucleótidos

30 En determinadas formas de realización, el ácido nucleico de la transtiretina es cualquiera de las secuencias presentadas en el nº de registro del GENBANK NM_000371.2, depositada por primera vez en el GENBANK® el 13 de febrero de 2008 (incorporada en el presente documento como la SEQ ID NO: 1), el número de registro del GENBANK NT_010966.10 truncada desde el nucleótido 2009236 hasta el 2017289, depositada por primera vez en el GENBANK® el 1 de agosto de 2002 (incorporada en el presente documento como la SEQ ID NO: 2); los exones 35 1-4 extraídos de la secuencia genómica de mono rhesus con el nº de registro del GENBANK NW_001105671.1, basándose en la similitud con los exones humanos; y el nº de registro del GENBANK NW_001105671.1 truncada desde el nucleótido 628000 hasta el 638000 (incorporada en el presente documento como la SEQ ID NO: 4), depositada por primera vez en el GENBANK® el 28 de marzo de 2006.

40 Se entiende que la secuencia presentada en cada SEQ ID NO en los ejemplos contenidos en el presente documento es independiente de cualquier modificación de un resto azúcar, un enlace internucleosídico o una base nitrogenada. Como tal, los compuestos antisentido definidos por una SEQ ID NO pueden comprender, de forma independiente, una o más modificaciones en un resto azúcar, un enlace internucleosídico o una base nitrogenada. Los compuestos antisentido descritos mediante Número Isis (nº Isis) o ISIS NO indican una combinación de motivo y 45 secuencia de bases nitrogenadas.

50 En determinadas formas de realización, una región diana es una región estructuralmente definida del ácido nucleico diana. Por ejemplo, una región diana puede abarcar una 3'-UTR, una 5'-UTR, un exón, un intrón, una unión exón-intrón, una región codificante, una región de iniciación de la traducción, región de terminación de la traducción, u otra región de ácido nucleico definida. Las regiones estructuralmente definidas para la transtiretina pueden obtenerse mediante el número de registro de bases de datos de secuencias tal como el NCBI. En determinadas formas de realización, una región diana puede abarcar la secuencia desde un sitio diana 5' de un segmento diana dentro de la región diana hasta un sitio diana 3' de otro segmento diana dentro de la región diana.

55 La dirección incluye la determinación de al menos un segmento diana con el que hibrida un compuesto antisentido, de manera que se produzca un efecto deseado. En determinadas formas de realización, el efecto deseado es una reducción de los niveles del ácido nucleico diana ARNm. En determinadas formas de realización, el efecto deseado es la reducción de los niveles de la proteína codificada por el ácido nucleico diana o un cambio fenotípico asociado con el ácido nucleico diana.

60 Una región diana puede contener uno o más segmentos diana. Múltiples segmentos diana dentro de una región diana pueden ser solapantes. Como alternativa, pueden ser no solapantes. En determinadas formas de realización, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por no más de aproximadamente 300 nucleótidos. En determinadas formas de realización, los segmentos diana dentro de una región diana están 65 separados por un número de nucleótidos que es, es aproximadamente, no es superior a, no es superior a aproximadamente, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 o 10 nucleótidos en el ácido nucleico diana, o

es un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores anteriores. En determinadas formas de realización, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por no más de, o no más de aproximadamente, 5 nucleótidos en el ácido nucleico diana. En determinadas formas de realización, los segmentos diana son contiguos. Se contemplan regiones diana definidas por un intervalo que tiene un ácido nucleico de partida que es cualquiera de los sitios diana 5' o los sitios diana 3' que aparecen en el presente documento.

Pueden encontrarse segmentos diana adecuados dentro de una 5'-UTR, una región codificante, una 3'-UTR, un intrón, un exón, o una unión exón-intrón. Los segmentos diana que contienen un codón de inicio o un codón de terminación también son segmentos diana adecuados. Un segmento diana adecuado puede excluir específicamente una determinada región estructuralmente definida tal como el codón de inicio o el codón de terminación.

La determinación de segmentos diana adecuados puede incluir una comparación de la secuencia de un ácido nucleico diana con otras secuencias a lo largo del genoma. Por ejemplo, puede utilizarse el algoritmo BLAST para identificar regiones de similitud entre diferentes ácidos nucleicos. Esta comparación puede evitar la selección de secuencias de compuesto antisentido que puedan hibridar de manera no específica con secuencias que no sean un ácido nucleico diana seleccionado (es decir, secuencias no diana o inespecíficas).

Puede haber variación en la actividad (por ejemplo, tal como se define mediante la reducción porcentual de los niveles de ácido nucleico diana) de los compuestos antisentido dentro de una región diana activa. En determinadas formas de realización, las reducciones de los niveles de ARNm de la transtiretina son un indicio de la inhibición de la expresión de transtiretina. Las reducciones de los niveles de una proteína transtiretina también son un indicio de la inhibición de la expresión de ARNm diana. Además, los cambios fenotípicos son un indicio de la inhibición de la expresión de transtiretina. Por ejemplo, el aumento de tamaño del cerebro hasta la normalidad, la mejora de la coordinación motora, la disminución de los espasmos musculares continuos (disonía), la disminución de la irritabilidad y/o la ansiedad, la mejora de la memoria, o un aumento de energía, entre otros cambios fenotípicos que pueden ensayarse. También pueden evaluarse otros indicios fenotípicos, por ejemplo, los síntomas asociados con la amiloidosis por transtiretina, según se describe más adelante.

Hibridación

En algunas formas de realización, la hibridación tiene lugar entre un compuesto antisentido divulgado en el presente documento y un ácido nucleico de la transtiretina. El mecanismo de hibridación más común implica enlaces de hidrógeno (por ejemplo, enlaces de hidrógeno Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso) entre bases nitrogenadas complementarias de las moléculas de ácido nucleico.

La hibridación puede producirse en condiciones variables. Las condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y vienen determinadas por la naturaleza y composición de las moléculas de ácido nucleico a hibridar.

Los métodos para determinar si una secuencia puede hibridar específicamente con un ácido nucleico diana son bien conocidos en la técnica. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido divulgados en el presente documento pueden hibridar específicamente con un ácido nucleico de la transtiretina.

Complementariedad

Un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana son complementarios entre sí cuando un número suficiente de bases nitrogenadas del compuesto antisentido pueden formar enlaces de hidrógeno con las bases nitrogenadas correspondientes del ácido nucleico diana, de manera que se produzca un efecto deseado (por ejemplo, la inhibición por antisentido de un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico de la transtiretina).

Un compuesto antisentido puede hibridar a lo largo de uno o más segmentos de un ácido nucleico de la transtiretina de manera que no haya segmentos intercalados o adyacentes implicados en el evento de hibridación (por ejemplo, una estructura de bucle, un desapareamiento o una estructura en horquilla).

En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido divulgados en el presente documento, o una porción especificada de los mismos, tienen, o tienen al menos, una complementariedad del 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con un ácido nucleico de la transtiretina, una región diana, un segmento diana, o una porción especificada del mismo. Puede determinarse el porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con un ácido nucleico diana utilizando métodos rutinarios.

Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de 20 bases nitrogenadas del compuesto antisentido son complementarias de una región diana, y, por lo tanto, hibridan específicamente, representaría una complementariedad del 90 por ciento. En este ejemplo, las bases nitrogenadas no complementarias restantes pueden agruparse o intercalarse con las bases nitrogenadas complementarias y no es necesario que sean contiguas entre sí o a las bases nitrogenadas complementarias. Como tal, un compuesto antisentido con una longitud de 18

bases nitrogenadas que tiene 4 (cuatro) bases nitrogenadas no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría una complementariedad global del 77,8% con el ácido nucleico diana y, por lo tanto, pertenecería al alcance de la presente divulgación. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse de manera rutinaria mediante los programas BLAST (herramientas básicas de búsqueda de alineamientos locales) y los programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656). El porcentaje de homología, la identidad de secuencia o la complementariedad, pueden determinarse mediante, por ejemplo, el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), utilizando la configuración predeterminada, que utiliza el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489).

En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido divulgados en el presente documento, o porciones especificadas de los mismos, son totalmente complementarios (es decir, tienen una complementariedad del 100%) de un ácido nucleico diana, o una porción especificada del mismo. Por ejemplo, el compuesto antisentido puede ser totalmente complementario de un ácido nucleico de la transtiretina, o una región diana, o un segmento diana o secuencia diana del mismo. Tal como se utiliza en el presente documento, "totalmente complementario" se refiere a que cada base nitrogenada de un compuesto antisentido puede presentar un apareamiento de bases preciso con las bases nitrogenadas correspondientes de un ácido nucleico diana. Por ejemplo, un compuesto antisentido de 20 bases nitrogenadas es totalmente complementario de una secuencia diana con una longitud de 400 bases nitrogenadas, siempre que haya una porción de 20 bases nitrogenadas correspondiente del ácido nucleico diana que sea totalmente complementaria del compuesto antisentido. Totalmente complementario también puede utilizarse en referencia a una porción especificada del primer y/o del segundo ácido nucleico. Por ejemplo, una porción de 20 bases nitrogenadas de un compuesto antisentido de 30 bases nitrogenadas puede ser "totalmente complementario" de una secuencia diana con una longitud de 400 bases nitrogenadas. La porción de 20 bases nitrogenadas del oligonucleótido de 30 bases nitrogenadas es totalmente complementaria de la secuencia diana si la secuencia diana tiene una porción de 20 bases nitrogenadas correspondiente en la que cada base nitrogenada es complementaria de la porción de 20 bases nitrogenadas del compuesto antisentido. Al mismo tiempo, todo el compuesto antisentido de 30 bases nitrogenadas puede, o no, ser totalmente complementario de la secuencia diana, dependiendo de si las 10 bases nitrogenadas restantes del compuesto antisentido también son complementarias de la secuencia diana.

La ubicación de una base nitrogenada no complementaria puede estar en el extremo 5' o en el extremo 3' del compuesto antisentido. Como alternativa, la base nitrogenada o bases nitrogenadas no complementarias pueden estar en una posición interna del compuesto antisentido. Cuando hay dos o más bases nitrogenadas no complementarias presentes, pueden ser contiguas (es decir, estar unidas) o no contiguas. En una forma de realización, hay una base nitrogenada no complementaria situada en el segmento de ala de un oligonucleótido antisentido *gapper*.

En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido que tienen una longitud, o una longitud de hasta 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases nitrogenadas comprenden no más de 4, no más de 3, no más de 2, o no más de 1 base(s) nitrogenada(s) no complementaria(s) con respecto a un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico de la transtiretina, o porción especificada del mismo.

En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido que tienen una longitud, o una longitud de hasta 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 bases nitrogenadas comprenden no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2, o no más de 1 base(s) nitrogenada(s) no complementaria(s) con respecto a un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico de la transtiretina, o porción especificada del mismo.

Los compuestos antisentido divulgados en el presente documento también incluyen aquellos que son complementarios de una porción de un ácido nucleico diana. Tal como se utiliza en el presente documento, "porción" se refiere a un número definido de bases nitrogenadas contiguas (es decir, unidas) dentro de una región o segmento de un ácido nucleico diana. Una "porción" también puede referirse a un número definido de bases nitrogenadas contiguas de un compuesto antisentido. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 8 bases nitrogenadas de un segmento diana. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 12 bases nitrogenadas de un segmento diana. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 15 bases nitrogenadas de un segmento diana. También se contemplan compuestos antisentido que son complementarios de al menos una porción de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más bases nitrogenadas de un segmento diana, o un intervalo definido por dos cualesquiera de estos valores.

Identidad

Los compuestos antisentido divulgados en el presente documento también pueden tener un porcentaje de identidad definido con una secuencia de nucleótidos particular, SEQ ID NO, o un compuesto representado por un número Isis específico, o porción del mismo. Tal como se utiliza en el presente documento, un compuesto

antisentido es idéntico a la secuencia divulgada en el presente documento si tiene la misma capacidad de apareamiento de bases nitrogenadas. Por ejemplo, un ARN que contiene uracilo en lugar de timidina en una secuencia de ADN divulgada se consideraría idéntico a la secuencia de ADN ya que ambos, uracilo y timidina, se aparean con la adenina. También se contemplan versiones acortadas y alargadas de los compuestos antisentido descritos en el presente documento, así como compuestos que tengan bases no idénticas con respecto a los compuestos antisentido divulgados en el presente documento. Las bases no idénticas pueden ser adyacentes entre sí o estar dispersas por todo el compuesto antisentido. El porcentaje de identidad de un compuesto antisentido se calcula según el número de bases que tienen idéntico apareamiento de bases con respecto a la secuencia con la que se está comparando.

En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido, o porciones de los mismos, son idénticos en al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% a uno o más de los compuestos antisentido o SEQ ID NO, o una porción de los mismos, divulgados en el presente documento.

15 *Modificaciones*

Un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La porción base nitrogenada (también conocida como base) del nucleósido es normalmente un resto base heterocíclica. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen adicionalmente un grupo fosfato unido covalentemente a la porción azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar unido al resto hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. Los oligonucleótidos se forman mediante la unión covalente de nucleósidos adyacentes entre sí, para formar un oligonucleótido polimérico lineal. Dentro de la estructura oligonucleotídica, se atribuye comúnmente a los grupos fosfato la formación de los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido.

Las modificaciones de los compuestos antisentido abarcan sustituciones o cambios introducidos en los enlaces internucleosídico, los restos azúcar o las bases nitrogenadas. Los compuestos antisentido modificados resultan con frecuencia preferentes frente a las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, mejor captación celular, mayor afinidad por la diana ácido nucleico, mayor estabilidad en presencia de nucleasas, o mayor actividad inhibidora.

También pueden emplearse nucleósidos químicamente modificados para aumentar la afinidad de unión de un oligonucleótido antisentido acortado o truncado por su ácido nucleico diana. Por consiguiente, pueden obtenerse con frecuencia resultados comparables con compuestos antisentido más cortos que tienen tales nucleósidos modificados químicamente.

35 *Enlaces internucleosídicos modificados*

El enlace internucleosídico natural del ARN y del ADN es un enlace fosfodiéster 3' a 5'. Suelen seleccionarse compuestos antisentido con uno o más enlaces internucleosídicos modificados, es decir no naturales, antes que compuestos antisentido con enlaces internucleosídicos naturales debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, mejor captación celular, mayor afinidad por los ácidos nucleicos diana, y mayor estabilidad en presencia de nucleasas.

Los oligonucleótidos con enlaces internucleosídicos modificados incluyen enlaces internucleosídicos que conservan un átomo de fósforo, así como enlaces internucleosídicos que no tienen un átomo de fósforo. Los enlaces internucleosídicos representativos que contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamido y fosforotioatos. Los métodos de preparación de enlaces que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos.

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

55 *Restos azúcar modificados*

Los compuestos antisentido de la invención pueden contener opcionalmente uno o más nucleósidos en los que el grupo azúcar se ha modificado. Tales nucleósidos con el azúcar modificado pueden conferir a los compuestos antisentido mayor estabilidad frente a nucleasas, mayor afinidad de unión, o alguna otra propiedad biológica beneficiosa. En determinadas formas de realización, los nucleósidos comprenden restos anillo de ribofuranosa químicamente modificados. Los ejemplos de anillos ribofuranosa químicamente modificados incluyen, sin limitación, la adición de grupos sustituyentes (incluidos grupos sustituyentes en 5' y 2', formación de puentes entre átomos del anillo no geminales para formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA), sustitución del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S, N(R) o C(R₁)(R₂) (R, R₁ y R₂ son cada uno independientemente H, alquilo C₁-C₁₂ o un grupo protector) y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de azúcares químicamente modificados incluyen un nucleósido 2'-F-5'-metil-sustituido (véase la solicitud de patente internacional PCT WO 2008/101157 publicada el 21/08/08 para otros

nucleósidos 5',2'-bis-sustituídos divulgados) o la sustitución del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S con una sustitución adicional en la posición 2' (véase la solicitud de patente estadounidense publicada US2005-0130923, publicada el 16 de junio de 2005) o, como alternativa, la sustitución en 5' de un BNA (véase la solicitud de patente internacional PCT WO 2007/134181 publicada el 22/11/07 en la que un LNA está sustituido con, por ejemplo, un grupo 5'-metilo o un grupo 5'-vinilo).

Los ejemplos de nucleósidos con restos azúcar modificados incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden grupos sustituyentes 5'-vinilo, 5'-metilo (R o S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃, 2'-OCH₂CH₃, 2'-OCH₂CH₂F y 2'-O(CH₂)₂OCH₃. El sustituyente en la posición 2' también puede estar seleccionado de entre alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C₁-C₁₀, OCF₃, OCH₂F, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n) y O-CH₂-C(=O)-N(R₁)-(CH₂)₂-N(R_m)(R_n), en los que cada R₁, R_m y R_n es, independientemente, H o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido.

Tal como se utiliza en el presente documento, "nucleósidos bicíclicos" se refiere a nucleósidos modificados que comprenden un resto azúcar bicíclico. Los ejemplos de nucleósidos bicíclicos incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo ribosilo en 4' y en 2'. En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos que comprenden un puente 4' a 2'. Los ejemplos de tales nucleósidos bicíclicos con puente 4' a 2' incluyen, pero no se limitan a, una de las fórmulas: 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' y 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (y análogos de los mismos, véase la patente estadounidense 7.399.845, expedida el 15 de julio de 2008); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (y análogos del mismo, véase la solicitud internacional publicada WO/2009/006478, publicada el 8 de enero de 2009); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (y análogos del mismo, véase la solicitud internacional publicada WO/2008/150729, publicada el 11 de diciembre de 2008); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (véase la solicitud de patente estadounidense publicada US2004-0171570, publicada el 2 de septiembre de 2004); 4'-CH₂-N(R)-O-2', en el que R es H, alquilo C₁-C₁₂, o un grupo protector (véase la patente estadounidense 7.427.672, expedida el 23 de septiembre de 2008); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (véase Chattopadhyaya *et al.*, J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); y 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (y análogos del mismo, véase la solicitud internacional publicada WO 2008/154401, publicada el 8 de diciembre de 2008).

Otros informes relacionados con los nucleósidos bicíclicos que también pueden encontrarse en la literatura publicada (véase, por ejemplo: Singh *et al.*, Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin *et al.*, Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 2000, 97, 5633-5638; Kumar *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh *et al.*, J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26) 8362-8379; Elayadi *et al.*, Curr. Opinion Invest. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch *et al.*, Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; y Orum *et al.*, Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; las patentes estadounidenses nº 6.268.490, nº 6.525.191, nº 6.670.461, nº 6.770.748, nº 6.794.499, nº 7.034.133, nº 7.053.207, nº 7.399.845, nº 7.547.684 y nº 7.696.345; la publicación de patente estadounidense nº US2008-0039618; US2009-0012281; las patentes estadounidenses con nº de serie 60/989.574, 61/026.995, 61/026.998, 61/056.564, 61/086.231, 61/097.787 y 61/099.844; las solicitudes internacionales PCT publicadas WO 1994/014226, WO 2004/106356, WO 2005/021570, WO 2007/134181, WO 2008/150729, WO 2008/154401 y WO 2009/006478). Cada uno de los nucleósidos bicíclicos anteriormente indicados puede prepararse para que tengan uno o más configuraciones estereoquímicas del azúcar, incluidas por ejemplo -L-ribofuranosa y -D-ribofuranosa (véase la solicitud internacional PCT PCT/DK98/00393, publicada el 25 de marzo de 1999 como WO 99/14226).

En determinadas formas de realización, los restos azúcar bicíclicos de nucleósidos BNA incluyen, pero no se limitan a, compuestos que tienen al menos un puente entre la posición 4' y la posición 2' del resto azúcar pentofuranosilo en los que tales puentes comprenden independientemente 1 o de 2 a 4 grupos unidos seleccionados independientemente de entre -[C(R_a)(R_b)]_n-, -C(R_a)=C(R_b)-, -C(R_a)=N-, -C(=O)-, -C(=NR_a)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R_a)₂-, -S(=O)_x- y -N(R_a)-, en los que:

x es 0, 1 o 2;
n es 1, 2, 3 o 4;

cada R_a y R_b es, independientemente, H, un grupo protector, hidroxilo, 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, independientemente, 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 determinadas formas de realización, el puente de un resto azúcar bicíclico es -[C(R_a)(R_b)]_n-, -[C(R_a)(R_b)]_n-O-, -C(R_aR_b)-N(R)-O- o -C(R_aR_b)-O-N(R)-. En determinadas formas de realización, el puente es 4'-CH₂-

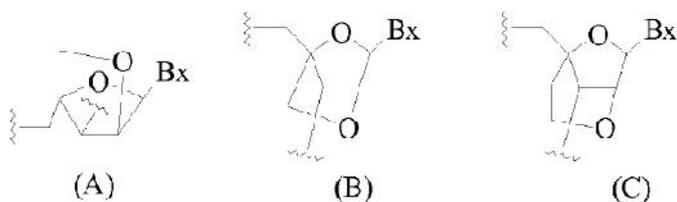
2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-O-N(R)-2' y 4'-CH₂-N(R)-O-2', en las que cada R es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C₁-C₁₂.

5 En determinadas formas de realización, los nucleósidos bicíclicos se definen adicionalmente mediante la configuración isomérica. Por ejemplo, un nucleósido que comprende un puente 4'-2' metilen-oxi, puede estar en la configuración -L o en la configuración -D. Anteriormente, se han incorporado -L-metilenoxi (4'-(CH₂-O-2')) BNA en oligonucleótidos antisentido que mostraban actividad antisentido (Frieden *et al.*, Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372).

10 En determinadas formas de realización, los nucleósidos bicíclicos incluyen, pero no se limitan a, (A) -L-metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, (B) -D-metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, (C) etilenoxi (4'-(CH₂)₂-O-2') BNA, (D) aminooxi (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA, (E) oxiamino (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA, y (F) metil(metilenoxi) (4'-CH(CH₃)-O-2') BNA, (G) metilen-tio (4'-CH₂-S-2') BNA, (H) metilen-amino (4'-CH₂-N(R)-2') BNA, (I) metilo carbocíclico (4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA, y (J) propileno carbocíclico (4'-(CH₂)₃-2') BNA, como se representa a continuación.

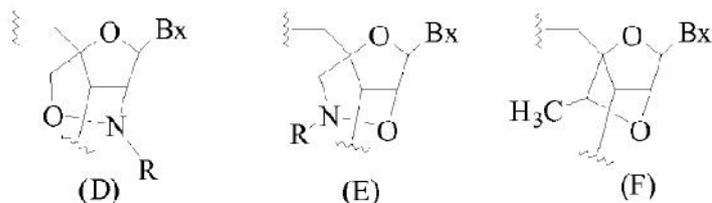
15

20



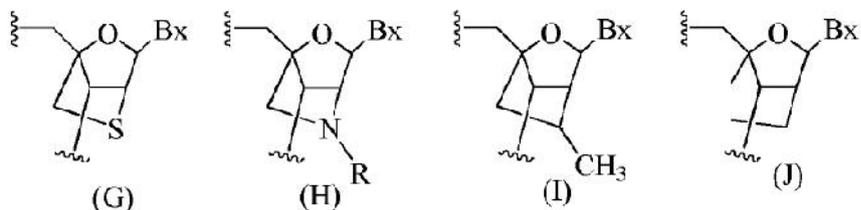
25

30



35

40



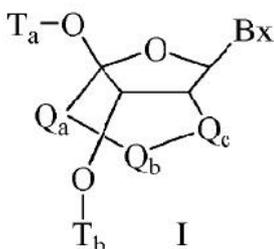
45 en las que B_x es el resto base y R es independientemente H, un grupo protector o alquilo C₁-C₁₂.

45

En determinadas formas de realización, se proporcionan nucleósidos bicíclicos de Fórmula I:

50

55



60

en los que:

B_x es un resto base heterocíclica;
 -Q_a-Q_b-Q_c- es -CH₂-N(R_c)-CH₂-, -C(=O)-N(R_c)-CH₂-, -CH₂-O-N(R_c)-, -CH₂-N(R_c)-O- o -N(R_c)-O-CH₂;
 R_c es alquilo C₁-C₁₂ o un grupo protector de amino; y

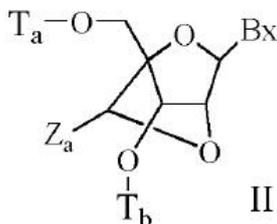
65

T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo fósforo reactivo, un resto fósforo o una fijación covalente a un medio de soporte.

En determinadas formas de realización, se proporcionan nucleósidos bicíclicos de Fórmula II:

5

10



15

en los que:

B_x es un resto base heterocíclica;

20

T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo fósforo reactivo, un resto fósforo o una fijación covalente a un medio de soporte;

Z_a 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, amida sustituida, tiol o tio sustituido.

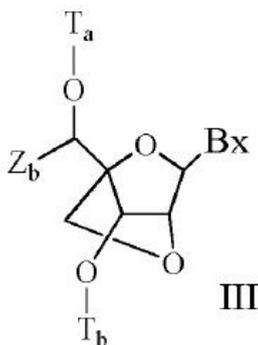
25

En una forma de realización, cada uno de los grupos sustituidos está, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente de entre halógeno, oxo, hidroxilo, OJ_c, NJ_cJ_d, SJ_c, N₃, OC(=X)J_c, y NJ_eC(=X)NJ_cJ_d, en los que cada J_c, J_d y J_e es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, o alquilo C₁-C₆ sustituido y X es O o NJ_c.

30

En determinadas formas de realización, se proporcionan nucleósidos bicíclicos de Fórmula III:

35



40

45

en los que:

B_x es un resto base heterocíclica;

50

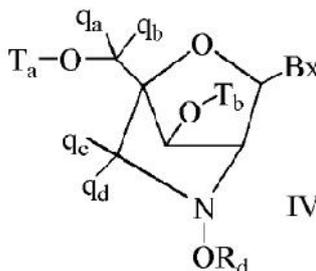
T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo fósforo reactivo, un resto fósforo o una fijación covalente a un medio de soporte;

Z_b es alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆ sustituido o acilo (C(=O)-) sustituido.

55

En determinadas formas de realización, se proporcionan nucleósidos bicíclicos de Fórmula IV:

60



65

en los que:

B_x es un resto base heterocíclica;

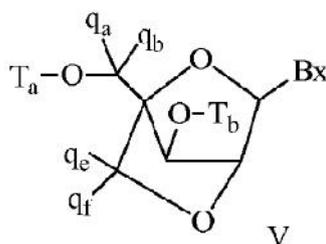
5 T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo fósforo reactivo, un resto fósforo o una fijación covalente a un medio de soporte;

R_d es alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alqueno C_2-C_6 , alqueno C_2-C_6 sustituido, alquino C_2-C_6 o alquino C_2-C_6 sustituido;

10 cada q_a , q_b , q_c y q_d es, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alqueno C_2-C_6 , alqueno C_2-C_6 sustituido, alquino C_2-C_6 o alquino C_2-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_1-C_6 o aminoalquilo C_1-C_6 sustituido;

En determinadas formas de realización, se proporcionan nucleósidos bicíclicos de Fórmula V:

15



20

25

en los que:

B_x es un resto base heterocíclica;

30 T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo fósforo reactivo, un resto fósforo o una fijación covalente a un medio de soporte;

q_a , q_b , q_e y q_f son cada uno, independientemente, hidrógeno, halógeno, alquilo C_1-C_{12} , alquilo C_1-C_{12} sustituido, alqueno C_2-C_{12} , alqueno C_2-C_{12} sustituido, alquino C_2-C_{12} , alquino C_2-C_{12} sustituido, alcoxi C_1-C_{12} , alcoxi C_1-C_{12} sustituido, OJ_j , SJ_j , SOJ_j , SO_2J_j , NJ_jJ_k , N_3 , CN , $C(=O)OJ_j$, $C(=O)NJ_jJ_k$, $C(=O)J_j$, $O-C(=O)-NJ_jJ_k$, $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ o $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$;

35

o q_e y q_f juntos son $=C(q_g)(q_h)$;

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

40

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

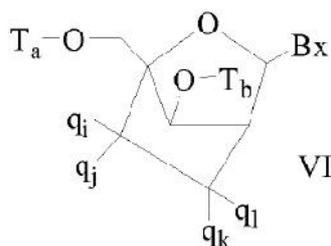
45

También se han preparado análogos de metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA y 2'-tio-BNA, (Kumar *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222). También se ha descrito la preparación de análogos de nucleósidos bloqueados que comprenden dúplex de oligodesoxirribonucleótidos como sustratos para las polimerasas de ácidos nucleicos (Wengel *et al.*, WO 99/14226). Además, se ha descrito en la técnica la síntesis de 2'-amino-BNA, un nuevo análogo de oligonucleótido de alta afinidad de conformación restringida (Singh *et al.*, J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039). Además, se han preparado 2'-amino-BNA y 2'-metilamino-BNA y se ha informado anteriormente acerca de la estabilidad térmica de sus dúplex con hebras de ARN y ADN complementarias.

50

En determinadas formas de realización, se proporcionan nucleósidos bicíclicos de Fórmula VI:

55



60

65

en los que:

B_x es un resto base heterocíclica;

T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo fósforo reactivo, un resto fósforo o una fijación covalente a un medio de soporte;

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

q_i y q_j o q_i y q_k juntos son $=C(q_g)(q_h)$, en los que q_g y q_h son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_{12} o alquilo C_1-C_{12} sustituido.

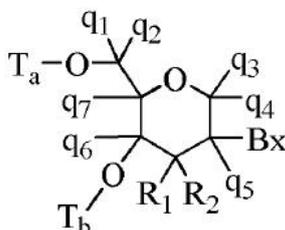
Se han descrito un nucleósido bicíclico carbocíclico que tiene un puente 4'-(CH_2)₃-2' y el puente análogo de alqueno 4'- $CH=CH-CH_2$ -2' (Freier *et al.*, Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4429-4443 y Albaek *et al.*, J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740). También se ha descrito la síntesis y preparación de nucleósidos bicíclicos carbocíclicos junto con su oligomerización y estudios bioquímicos (Srivastava *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26), 8362-8379).

Tal como se utiliza en el presente documento, "nucleósido bicíclico 4'-2'" o "nucleósido bicíclico 4' a 2'" se refiere a un nucleósido bicíclico que comprende un anillo furanósico que comprende un puente que conecta dos átomos de carbono del anillo furanósico: conecta el átomo de carbono 2' y el átomo de carbono 4' del anillo de azúcar.

Tal como se utiliza en el presente documento, "nucleósidos monocíclicos" se refiere a nucleósidos que comprenden restos azúcar modificados que no son restos azúcar bicíclicos. En determinadas formas de realización, el resto azúcar, o análogo de resto azúcar, de un nucleósido puede estar modificado o sustituido en cualquier posición.

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

Tal como se utiliza en el presente documento, un "nucleósido tetrahidropirano modificado" o "nucleósido THP modificado" se refiere a un nucleósido que tiene un "azúcar" tetrahidropirano de seis miembros en sustitución del residuo pentofuranosilo de los nucleósidos normales (un sustituto del azúcar). Los nucleósidos THP modificados incluyen, pero no se limitan a, lo que se conoce en la técnica como ácido nucleico hexitol (HNA), ácido nucleico anitol (ANA), ácido nucleico manitol (MNA) (véase Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841-854), fluoro HNA (F-HNA) o los compuestos de Fórmula VII:



VII

5 en los que independientemente para cada uno de dicho al menos un análogo nucleosídico tetrahidropirano de Fórmula VII:

B_x es un resto base heterocíclica;

10 T_a y T_b son cada uno, independientemente, un grupo de unión internucleosídico que une el análogo nucleosídico tetrahidropirano al compuesto antisentido o uno de T_a y T_b es un grupo de unión internucleosídico que une el análogo nucleosídico tetrahidropirano al compuesto antisentido y el otro de T_a y T_b es H, un grupo protector hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo terminal 5' o 3';

15 $q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6$ y q_7 son cada uno independientemente, H, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alqueno C_2-C_6 , alqueno C_2-C_6 sustituido, alquino C_2-C_6 o alquino C_2-C_6 sustituido; y cada uno de R_1 y R_2 está seleccionado de entre hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alcoxi sustituido o no sustituido, NJ_1J_2 , SJ_1 , N_3 , $OC(=X)J_1$, $OC(=X)NJ_1J_2$, $NJ_3C(=X)NJ_1J_2$ y CN, en los que X es O, S o NJ_1 y cada J_1, J_2 y J_3 es, independientemente, H o alquilo C_1-C_6 .

20 En determinadas formas de realización, se proporcionan nucleósidos THP modificados de Fórmula VII en los que $q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6$ y q_7 son cada uno H. En determinadas formas de realización, al menos uno de $q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6$ y q_7 es distinto de H. En determinadas formas de realización, al menos uno de $q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6$ y q_7 es metilo. En determinadas formas de realización, se proporcionan nucleósidos THP de Fórmula VII en los que uno de R_1 y R_2 es fluoro. En determinadas formas de realización, R_1 es fluoro y R_2 es H; R_1 es metoxi y R_2 es H, y R_1 es H y R_2 es metoxietoxi.

25 Tal como se utiliza en el presente documento, "con modificación en 2'" o "con sustitución en 2'" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un sustituyente en la posición 2' distinto de H u OH. Los nucleósidos con modificación en 2', incluyen, pero no se limitan a, nucleósidos bicíclicos en los que el puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de azúcar conecta el carbono 2' y otro carbono del anillo de azúcar; y los nucleósidos con sustituyentes en 2' no-puente, tales como alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C_1-C_{10} , $-OCF_3$,
30 $O-(CH_2)_2-O-CH_3$, $2'-O(CH_2)_2SCH_3$, $O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$, 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. Los nucleósidos con modificación en 2' pueden comprender adicionalmente otras modificaciones, por ejemplo en otras posiciones del azúcar y/o en la base nitrogenada.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, "2'-F" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo fluoro en la posición 2'.

40 Tal como se utiliza en el presente documento, "2'-OMe" o "2'-OCH₃" o "2'-O-metilo" se refieren a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo $-OCH_3$ en la posición 2' del anillo de azúcar.

Tal como se utiliza en el presente documento, "MOE" o "2'-MOE" o "2'-OCH₂CH₂OCH₃" o "2'-O-metoxietilo" se refieren a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo $-OCH_2CH_2OCH_3$ en la posición 2' del anillo de azúcar.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, "oligonucleótido" se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos unidos. En determinadas formas de realización, uno o más de la pluralidad de nucleósidos está modificado. En determinadas formas de realización, un oligonucleótido comprende uno o más ribonucleósidos (ARN) y/o desoxirribonucleósidos (ADN).

50 También se conocen en la técnica muchos otros sistemas anulares con sustituto del azúcar biciclo y triciclo que pueden utilizarse para modificar los nucleósidos para su incorporación en compuestos antisentido (véase por ejemplo el artículo de revisión: Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841-854). Tales sistemas anulares pueden someterse a diversas sustituciones adicionales para potenciar su actividad.

55 Los métodos para las preparaciones de azúcares modificados son bien conocidos por los expertos en la materia.

60 En los nucleótidos que tienen restos azúcar modificados, se mantienen los restos base nitrogenada (naturales, modificados o una combinación de los mismos) para la hibridación con una diana ácido nucleico apropiada.

65 En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido comprenden uno o más nucleósidos que tienen restos azúcar modificados. En determinadas formas de realización, el resto azúcar modificado es 2'-MOE. En determinadas formas de realización, los nucleósidos modificados 2'-MOE están dispuestos en un motivo *gamer*. En determinadas formas de realización, el resto azúcar modificado es un nucleósido bicíclico con un grupo puente

(4'-CH(CH₃)-O-2'). En determinadas formas de realización, los nucleósidos modificados (4'-CH(CH₃)-O-2') están dispuestos a lo largo de las alas de un motivo *gapper*.

Bases nitrogenadas modificadas

5 Las modificaciones o sustituciones de bases nitrogenadas (o bases) son estructuralmente distinguibles de, pero funcionalmente intercambiables con, las bases nitrogenadas naturales o no modificadas sintéticas. Tanto las bases nitrogenadas naturales como las modificadas pueden participar en los enlaces de hidrógeno. Tales modificaciones de las bases nitrogenadas pueden conferir a los compuestos antisentido estabilidad frente a
10 nucleasas, afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa. Las bases nitrogenadas modificadas incluyen bases nitrogenadas sintéticas y naturales tales como, por ejemplo, 5-metilcitosina (5-me-C). Determinadas sustituciones de bases nitrogenadas, incluidas las sustituciones 5-metilcitosina, son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de un compuesto antisentido por un ácido nucleico diana. Por ejemplo, las
15 sustituciones 5-metilcitosina han demostrado aumentar la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6°C-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. y Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278).

20 Las bases nitrogenadas no modificadas adicionales incluyen 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil (-C C-CH₃) uracilo y citosina y otros derivados alquilo de bases pirimidínicas, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas con sustitución en la posición 8, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas con sustitución en la posición 5, 7-
25 metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina.

30 Los restos base heterocíclica también pueden incluir aquellos en los que la base purina o pirimidina está reemplazada con otros heterociclos, por ejemplo 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Las bases nitrogenadas que son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos antisentido incluyen pirimidinas con sustitución en la posición 5, 6-azapirimidinas y purinas N-2-, N-6- y O-6-sustituidas, incluidas 2 aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina.

35 En determinadas formas de realización, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de la transtiretina comprenden una o más bases nitrogenadas modificadas. En determinadas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido con la separación ampliada dirigidos a un ácido nucleico de la transtiretina comprenden una o más bases nitrogenadas modificadas. En determinadas formas de realización, la base nitrogenada modificada es 5-metilcitosina. En determinadas formas de realización, cada citosina es una 5-metilcitosina.

Composiciones y métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas

40 Los oligonucleótidos antisentido pueden mezclarse con una sustancia activa o inerte farmacéuticamente aceptable para preparar composiciones o formulaciones farmacéuticas. Las composiciones y los métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas dependen de varios criterios, incluidos, pero no limitados a, la vía de administración, la gravedad de la enfermedad o la dosis a administrar.
45

50 El compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de la transtiretina puede utilizarse en composiciones farmacéuticas combinando el compuesto antisentido con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye solución salina tamponada con fosfato (PBS). El PBS es un diluyente adecuado para utilizarse en composiciones que se suministran por vía parenteral. Por consiguiente, en una forma de realización, en los métodos descritos en el presente documento se emplea una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de la transtiretina y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En determinadas formas de realización, el diluyente farmacéuticamente aceptable es PBS. En determinadas formas de realización, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido.

55 Las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos antisentido abarcan cualquier sal farmacéuticamente aceptable, éster, o sal de tal éster, o cualquier otro oligonucleótido que, tras administrarse a un animal, incluido un ser humano, puede proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o un residuo del mismo. Por consiguiente, por ejemplo, la divulgación también se refiere a las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos antisentido, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de tales profármacos, y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a sales de sodio y potasio.
60

65 Un profármaco puede incluir la incorporación de nucleósidos adicionales en uno o ambos extremos de un compuesto antisentido que son escindidos por nucleasas endógenas dentro del cuerpo, para formar el compuesto antisentido activo.

Compuestos antisentido conjugados

Los compuestos antisentido pueden estar unidos covalentemente a uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular de los oligonucleótidos antisentido resultantes. Los grupos conjugados típicos incluyen restos colesterol y restos lipídicos. Los grupos conjugados adicionales incluyen carbohidratos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes.

Los compuestos antisentido también pueden modificarse para que tengan uno o más grupos estabilizadores que están fijados generalmente a uno o ambos extremos terminales de los compuestos antisentido para mejorar propiedades tales como, por ejemplo, la estabilidad frente a nucleasas. En los grupos estabilizadores se incluyen las estructuras de caperuza. Estas modificaciones terminales protegen al compuesto antisentido que tiene un ácido nucleico terminal frente a la degradación por exonucleasas, y puede ayudar a la liberación y/o la localización dentro de una célula. La caperuza puede encontrarse en el extremo 5' (caperuza 5'), o en el extremo 3' (caperuza 3'), o puede encontrarse en ambos extremos terminales. Las estructuras de caperuza son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, caperuzas abásicas desoxi invertidas. Los grupos estabilizadores de 3' y 5' adicionales que pueden utilizarse para añadir la caperuza a uno o ambos extremos de un compuesto antisentido para conferirle estabilidad frente a nucleasas incluyen los divulgados en el documento WO 03/004602 publicado el 16 de enero de 2003.

20 *Cultivo celular y tratamiento con compuestos antisentido*

Los efectos de los compuestos antisentido sobre el nivel, la actividad o la expresión de ácidos nucleicos de la transtiretina pueden ensayarse *in vitro* en diversos tipos de células. Los tipos de células utilizadas para tales análisis están disponibles en proveedores comerciales (por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walkersville, MD) y las células se cultivan según las instrucciones del proveedor utilizando reactivos disponibles en el mercado (por ejemplo Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Los tipos de células ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, células HepG2, células Hep3B, hepatocitos primarios, células A549, fibroblastos GM04281 y células LLC-MK2.

30 *Ensayos in vitro de los oligonucleótidos antisentido*

En el presente documento se describen métodos para tratar células con oligonucleótidos antisentido, que pueden modificarse apropiadamente para el tratamiento con otros compuestos antisentido.

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

Un reactivo comúnmente utilizado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye el reactivo de transfección con lípidos catiónicos LIPOFECTIN® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los oligonucleótidos antisentido se mezclan con LIPOFECTIN® en OPTI-MEM® 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para alcanzar la concentración final deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración de LIPOFECTIN® que varía por lo general entre 2 ug/ml y 12 ug/ml por 100 nM de oligonucleótido antisentido.

Otro reactivo utilizado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye LIPOFECTAMINE 2000® (Invitrogen, Carlsbad, CA). El oligonucleótido antisentido se mezcla con LIPOFECTAMINE 2000® en medio con suero reducido OPTI-MEM® 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para alcanzar la concentración deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración de LIPOFECTAMINE® que varía por lo general entre 2 ug/ml y 12 ug/ml por 100 nM de oligonucleótido antisentido.

Otro reactivo utilizado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye Cytofectin® (Invitrogen, Carlsbad, CA). El oligonucleótido antisentido se mezcla con Cytofectin® en medio con suero reducido OPTI-MEM® 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para alcanzar la concentración deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración de Cytofectin® que varía por lo general entre 2 ug/ml y 12 ug/ml por 100 nM de oligonucleótido antisentido.

Otra técnica utilizada para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye la electroporación.

Las células se tratan con oligonucleótidos antisentido mediante métodos rutinarios. Las células se recolectan por lo general 16-24 horas después del tratamiento con el oligonucleótido antisentido, momento en el que se miden los niveles de ARN o proteína de los ácidos nucleico diana mediante métodos conocidos en la técnica y que se describen en el presente documento. En general, cuando los tratamientos se realizan en múltiples repeticiones, los datos se presentan como la media de los tratamientos repetidos.

La concentración de oligonucleótido antisentido utilizada varía de una estirpe celular a otra. Los métodos para determinar la concentración óptima de oligonucleótido antisentido para una estirpe celular concreta son bien

conocidos en la técnica. Los oligonucleótidos antisentido se utilizan por lo general a concentraciones que van de 1 nM a 300 nM cuando se transfectan con LIPOFECTAMINE 2000®, Lipofectin o Cytfectin. Los oligonucleótidos antisentido se utilizan en concentraciones más elevadas que van de 625 nM a 20.000 nM cuando se transfectan mediante electroporación.

5

Aislamiento de ARN

El análisis de ARN puede realizarse sobre el ARN celular total o ARNm poli(A)+. Los métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. El ARN se prepara utilizando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando el reactivo TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA) según los protocolos recomendados por el fabricante.

10

Análisis de la inhibición de los niveles o de la expresión de la diana

La inhibición de los niveles o de la expresión de un ácido nucleico de la transtiretina pueden ensayarse de diversas formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los niveles de ácido nucleico diana pueden cuantificarse mediante, por ejemplo, transferencia Northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva, o PCR cuantitativa en tiempo real. Los análisis de ARN puede realizarse sobre el ARN celular total o ARNm poli(A)+. Los métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. La transferencia Northern también es rutinaria en la técnica. La PCR cuantitativa en tiempo real puede llevarse a cabo de manera práctica utilizando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7600, 7700 o 7900 disponible en el mercado, disponible en PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y utilizarse según las instrucciones del fabricante.

15

20

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

25

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

30

Antes de la PCR en tiempo real, el ARN aislado se somete a una reacción con transcriptasa inversa (RT), que produce ADN complementario (ADNc) que, a continuación, se utiliza como sustrato para la amplificación mediante PCR en tiempo real. Las reacciones RT y PCR en tiempo real se realizan secuencialmente en el mismo pocillo de muestra. Los reactivos para RT y PCR en tiempo real se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). Las reacciones RT y PCR en tiempo real se llevan a cabo mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

35

Las cantidades de diana génica (o ARN) obtenidas mediante PCR en tiempo real se normalizan utilizando el nivel de expresión de un gen cuya expresión es constante, tal como ciclofilina A, o cuantificando el ARN total mediante RIBOGREEN® (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA). La expresión de ciclofilina A se cuantifica mediante PCR en tiempo real, procesándola al mismo tiempo que la diana, multiplexación, o por separado. El ARN total se cuantifica mediante el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Invitrogen, Inc. Eugene, OR). Los métodos de cuantificación de ARN de RIBOGREEN® se ilustran en Jones, L.J., *et al.*, (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374). Se utiliza un instrumento CYTOFLUOR® 4000 (PE Applied Biosystems) para medir la fluorescencia del RIBOGREEN®.

40

45

Se diseñan sondas y cebadores para que hibriden con un ácido nucleico de la transtiretina. Los métodos para diseñar sondas y cebadores de PCR en tiempo real son bien conocidos en la técnica, y pueden incluir el uso de software tal como PRIMER EXPRESS® Software (Applied Biosystems, Foster City, CA).

50

Análisis de los niveles de proteína

La inhibición por antisentido de ácidos nucleicos de la transtiretina puede evaluarse midiendo los niveles proteicos de transtiretina. Los niveles proteicos de transtiretina pueden evaluarse o cuantificarse de diversas maneras bien conocidas en la técnica, tales como inmunoprecipitación, transferencia de Western (inmunoelctrotransferencia), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayos cuantitativos de proteínas, ensayos de actividad de proteínas (por ejemplo, ensayos de actividad de la caspasa), inmunohistoquímica, inmunocitoquímica o clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Los anticuerpos dirigidos a una diana pueden identificarse y obtenerse de diversas fuentes, tal como el catálogo de anticuerpos MSRS (Aerie Corporation, Birmingham, MI), o pueden prepararse mediante métodos convencionales de generación de anticuerpos monoclonales o policlonales bien conocidos en la técnica. Hay anticuerpos útiles para la detección de transtiretina humana y de rata disponibles en el mercado.

55

60

Ensayos in vivo de los compuestos antisentido

65

Los compuestos antisentido, por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido, se ensayan en animales para evaluar su capacidad para inhibir la expresión de transtiretina y producir cambios fenotípicos. Los ensayos pueden realizarse en animales normales, o en modelos de enfermedad experimentales. Para la administración a animales, los oligonucleótidos antisentido se formulan en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato. La administración incluye las vías de administración parenteral. Tras un período de tratamiento con oligonucleótidos antisentido, se aísla el ARN del tejido y se miden los cambios en la expresión de ácido nucleico de la transtiretina. También se miden los cambios en los niveles proteicos de transtiretina.

Determinados compuestos

Se ensayaron aproximadamente doscientos cuarenta y seis compuestos antisentido de nuevo diseño de diversas longitudes, motivos y composición del esqueleto para determinar su efecto sobre el ARNm de la transtiretina humana *in vitro* en varios tipos de células. Los nuevos compuestos se compararon con aproximadamente setenta y nueve compuestos anteriormente diseñados, incluidos los ISIS NO 304267, 304268, 304280, 304284, 304285, 304286, 304287, 304288, 304289, 304290, 304291, 304292, 304293, 304294, 304296, 304297, 304298, 304299, 304300, 304301, 304302, 304303, 304304, 304307, 304308, 304309, 304311 y 304312 que se ha determinado anteriormente que son algunos de los compuestos antisentido más potentes *in vitro* (véase, por ejemplo, las publicaciones de patente estadounidense nº US2005/0244869 y nº US2009/0082300). De los aproximadamente trescientos veinticinco compuestos antisentido recién diseñados y diseñados anteriormente, se seleccionaron aproximadamente quince compuestos para un estudio posterior basado en la potencia *in vitro*. Los compuestos seleccionados se ensayaron para determinar la potencia y tolerabilidad *in vivo* en un modelo de ratón transgénico (véase el Ejemplo 10). De los quince compuestos ensayados, se seleccionaron y ensayaron once para determinar la tolerabilidad sistémica (véase el Ejemplo 11) y la determinación de la semivida en el hígado (véase el Ejemplo 12) en ratones CD1, y también para determinar la tolerabilidad sistémica (véase el Ejemplo 13) y los estudios farmacocinéticos de concentración de oligonucleótido en el hígado (véase el Ejemplo 14) en ratas Sprague-Dawley. A partir de estos estudios, se ensayaron siete compuestos para determinar la tolerabilidad y la inhibición dependiente de la dosis en ratones transgénicos (véase el Ejemplo 15). Además, se seleccionaron quince compuestos adicionales de la Tabla 1 y se diseñaron seis compuestos adicionales con diversos motivos que tenían secuencias solapantes con ISIS 420951, que presentaba gran potencia y tolerabilidad en los ensayos anteriormente mencionados. Estos compuestos adicionales se compararon con ISIS 420951 para determinar la potencia y la tolerabilidad en ratones transgénicos (véase el Ejemplo 16). Basándose en todos estos estudios (Ejemplos 10-16), se seleccionaron veintidós compuestos y se ensayaron para determinar la tolerabilidad sistémica en ratones CD1 (véase el Ejemplo 17). Siete compuestos se consideraron tolerables en el modelo de ratón y se ensayaron adicionalmente para determinar la tolerabilidad sistémica en ratas Sprague-Dawley (véase el Ejemplo 18) y para los estudios farmacocinéticos de concentración de oligonucleótido en hígado y riñón (véase el Ejemplo 19). Los siete compuestos también se ensayaron para determinar la potencia dependiente de la dosis en ratones transgénicos (véase el Ejemplo 20).

La evaluación final de estos estudios (Ejemplos 16-20), condujo a la selección de nueve compuestos con una secuencia de bases nitrogenadas de una secuencia que aparece en la SEQ ID NO: 25, 78, 80, 86, 87, 115, 120, 122 y 124. En virtud de su secuencia complementaria, los compuestos son complementarios de las regiones 505-524, 507-526, 508-527, 513-532, 515-534, 516-535, 580-599, 585-604, 587-606 o 589-608 de la SEQ ID NO: 1. En determinadas formas de realización, los compuestos dirigidos a las regiones enumeradas, como se describe adicionalmente en el presente documento, comprenden un oligonucleótido modificado que tiene una porción de bases nitrogenadas de la secuencia que aparece en las SEQ ID NO, como se describe adicionalmente en el presente documento. En determinadas formas de realización, los compuestos dirigidos a las regiones enumeradas o que tienen una porción de bases nitrogenadas de una secuencia que aparece en las SEQ ID NO enumeradas pueden tener diversas longitudes, como se describe adicionalmente en el presente documento, y pueden tener uno de varios motivos, como se describe adicionalmente en el presente documento. En determinadas formas de realización, un compuesto dirigido a una región o que tiene una porción de bases nitrogenadas de una secuencia que aparece en las SEQ ID NO enumeradas tiene la longitud y el motivo específicos que se indican mediante los ISIS NO: ISIS 304299, ISIS 420913, ISIS 420915, ISIS 420921, ISIS 420922, ISIS 420950, ISIS 420955, ISIS 420957 o ISIS 420959.

Los nueve compuestos con una secuencia de bases nitrogenadas de una secuencia que aparece en la SEQ ID NO: 25, 78, 80, 86, 87, 115, 120, 122 y 124, se ensayaron adicionalmente para determinar la inhibición dependiente de la dosis en hepatocitos primarios de mono *Cynomolgus* (véase el Ejemplo 21). Estos compuestos también se ensayaron para determinar la viscosidad óptima (Ejemplo 22). También se evaluó la semivida en el hígado de ratones CD1 de siete de los compuestos con una secuencia de bases nitrogenadas de una secuencia que aparece en las SEQ ID NO: 78, 86, 87, 115, 120 y 124 (Ejemplo 23).

La evaluación final de estos estudios (Ejemplos 1-23), condujo a la selección de ocho compuestos con una secuencia de bases nitrogenadas de una secuencia que aparece en la SEQ ID NO: 25, 80, 86, 87, 115, 120, 122 y 124. En virtud de su secuencia complementaria, los compuestos son complementarios de las regiones 504-523, 505-524, 512-531, 513-532, 577-596, 582-601, 584-603 y 586-605 de la SEQ ID NO: 1. En determinadas formas de realización, los compuestos dirigidos a las regiones enumeradas, como se describe adicionalmente en el presente

documento, comprenden un oligonucleótido modificado que tiene una porción de bases nitrogenadas de la secuencia que aparece en las SEQ ID NO, como se describe adicionalmente en el presente documento. En determinadas formas de realización, los compuestos dirigidos a las regiones enumeradas o que tienen una porción de bases nitrogenadas de una secuencia que aparece en las SEQ ID NO enumeradas pueden tener diversas longitudes, como se describe adicionalmente en el presente documento, y pueden tener uno de varios motivos, como se describe adicionalmente en el presente documento. En determinadas formas de realización, un compuesto dirigido a una región o que tiene una porción de bases nitrogenadas de una secuencia que aparece en las SEQ ID NO enumeradas tiene la longitud y el motivo específicos que se indican mediante los ISIS NO: ISIS 304299, ISIS 420915, ISIS 420921, ISIS 420922, ISIS 420950, ISIS 420955, ISIS 420957 o ISIS 420959.

Estos ocho compuestos se ensayaron para determinar la eficacia, el perfil farmacocinético y la tolerabilidad en monos *Cynomolgus* (Ejemplo 24). Los estudios de inhibición en estos monos indicaban que el tratamiento con algunos de estos compuestos provocaba una alta inhibición del ARNm de la TTR en el hígado. En concreto, el tratamiento con ISIS 420950, ISIS 420955 e ISIS 420915 provocó una inhibición del 91%, 79% y 78%, respectivamente, en comparación con el testigo con PBS. Se observó que ISIS 420915 provocaba una mayor inhibición del ARNm de la TTR (78%) en comparación con ISIS 304299 (59%), a pesar de que los dos oligonucleótidos difieren entre sí en un solo cambio de pares de bases de su región diana en la SEQ ID NO: 1. El análisis de proteínas también complementaba los datos de análisis de ARN, provocando el tratamiento con ISIS 420915 una inhibición del 76% y provocando el tratamiento con ISIS 304299 una inhibición del 47% de proteína TTR en comparación con el testigo. También se esperaba que los niveles proteicos de RBP4, que es una proteína asociada con la transtiretina, disminuyesen después de tratamiento con los compuestos antisentido. Los niveles proteicos de RBP4 disminuyeron en un 63% después del tratamiento con ISIS 420915. El tratamiento con ISIS 304299 disminuyó los niveles de proteína de RBP4 en un 19%. Además, ISIS 420915 era más tolerable que ISIS 304299, como se indica en el estudio con monos (Ejemplo 24). Los niveles de aminotransferasas de los monos tratados con ISIS 304299 (ALT 81 IU/l y AST 101 IU/l) fueron más elevados que los tratados con ISIS 420915 (ALT 68 IU/l y AST 62 IU/l). Los niveles de complemento C3 de los monos tratados con ISIS 304299 (96 mg/dl) fueron inferiores a la de los monos tratados con ISIS 420915 (104 mg/dl).

Por consiguiente, en el presente documento se divulgan compuestos antisentido con una cualquiera o más de las características mejoradas. En determinadas formas de realización, en el presente documento se divulgan compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado como se describe adicionalmente en el presente documento dirigido a, o que puede hibridar específicamente con, la región de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1.

Por consiguiente, en el presente documento se divulgan compuestos antisentido con una cualquiera o más de las características mejoradas. En determinadas formas de realización, en el presente documento se divulgan compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado como se describe adicionalmente en el presente documento dirigido a, o que puede hibridar específicamente con, la región de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2.

Por consiguiente, en el presente documento se divulgan compuestos antisentido con una cualquiera o más de las características mejoradas. En determinadas formas de realización, en el presente documento se divulgan compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado como se describe adicionalmente en el presente documento dirigido a, o que puede hibridar específicamente con, la región de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4.

En determinadas formas de realización, los compuestos según se describen en el presente documento son eficaces debido a que tienen al menos uno de entre una CI_{50} *in vitro* inferior a 2,9 μ M, inferior a 2,2 μ M, inferior a 2,0 μ M, inferior a 1,5 μ M, inferior a 1,4 μ M, inferior a 1,3 μ M, inferior a 1,0 μ M, inferior a 0,7 μ M, inferior a 0,6 μ M, cuando se suministran a una estirpe celular de hepatocitos de mono *Cynomolgus* mediante electroporación según se describe en el Ejemplo 67. En determinadas formas de realización, los compuestos según se describen en el presente documento son altamente tolerables como lo demuestra el hecho de que tienen al menos uno de entre un aumento del valor de ALT o AST no superior a 4 veces, 3 veces o 2 veces con respecto a los animales tratados con solución salina; o un aumento del peso del hígado, bazo o riñón no superior a un 30%, 20%, 15%, 12%, 10%, 5% o 2%.

Determinados indicios

En determinadas formas de realización, en el presente documento se divulgan métodos para tratar a un individuo que comprenden administrar una o más composiciones farmacéuticas según se describe en el presente documento. En determinadas formas de realización, el individuo tiene una enfermedad relacionada con el sistema nervioso central.

Como se muestra en los ejemplos que se presentan más adelante, los compuestos dirigidos a la transtiretina según se describe en el presente documento han demostrado reducir la gravedad de los síntomas fisiológicos de enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central. En algunos de los experimentos, los compuestos reducían la velocidad de formación de la placa amiloide, por ejemplo, los animales seguían experimentando los síntomas, pero los síntomas eran menos graves en comparación con los animales no tratados. Sin embargo, en otro de los experimentos los compuestos parecen dar como resultado la regeneración de la función

con el tiempo; por ejemplo, los animales tratados durante un mayor período de tiempo experimentaron síntomas menos graves que aquellos a los que se administraron los compuestos durante un menor periodo de tiempo. Por tanto, la capacidad de los compuestos ejemplificados más adelante para restaurar la función demuestra que pueden revertirse los síntomas de la enfermedad mediante el tratamiento con un compuesto según se describe en el presente documento.

Por consiguiente, en el presente documento se divulgan métodos para mejorar un síntoma asociado con una enfermedad cardíaca, neuropatológica o gastrointestinal relacionada con el sistema nervioso central, en un sujeto que lo necesite. En determinadas formas de realización, se divulga un método para reducir la tasa de aparición de un síntoma asociado con una enfermedad cardíaca, neuropatológica o gastrointestinal relacionada con el sistema nervioso central. En determinadas formas de realización, se divulga un método para reducir la gravedad de un síntoma asociado con una enfermedad cardíaca, neuropatológica o gastrointestinal relacionada con el sistema nervioso central. En tales formas de realización, los métodos comprenden administrar a un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto dirigido a un ácido nucleico de la transtiretina.

La amiloidosis por transtiretina se caracteriza por numerosos síntomas físicos, neurológicos, psiquiátricos y/o periféricos. Cualquier síntoma conocido por un experto en la materia que se asocie con la amiloidosis por transtiretina puede mejorarse o modularse de otro modo como se ha explicado anteriormente en los métodos descritos anteriormente. En determinadas formas de realización, el síntoma es un síntoma físico, cognitivo, psiquiátrico o periférico. En determinadas formas de realización, el síntoma es un síntoma físico seleccionado del grupo que consiste en la inquietud, la falta de coordinación, el nistagmo, la paraparesia espástica, la falta de coordinación muscular, las alteraciones de la visión, el insomnio, las sensaciones extrañas, la mioclonía, la ceguera, la afasia, el síndrome del túnel carpiano, las convulsiones, las hemorragias subaracnoideas, el ictus y la hemorragia cerebral, la hidrocefalia, la ataxia, y la parálisis espástica, el coma, la neuropatía sensorial, la parestesia, la hiperestesia, la neuropatía motora, la neuropatía autonómica, la hipotensión ortostática, el estreñimiento cíclico, la diarrea cíclica, las náuseas, el vómito, la disminución de la sudoración, la impotencia, el vaciamiento gástrico retardado, la retención urinaria, la incontinencia urinaria, la cardiopatía progresiva, la fatiga, la dificultad respiratoria, la pérdida de peso, la falta de apetito, el entumecimiento, el hormigueo, la debilidad, la macroglosia, el síndrome nefrótico, la insuficiencia cardíaca congestiva, la disnea de esfuerzo, el edema periférico, las arritmias, las palpitaciones, el mareo, el síncope, la hipotensión postural, los problemas de los nervios periféricos, el deterioro sensoriomotor, la neuropatía de las extremidades inferiores, la neuropatía de las extremidades superiores, la hiperalgesia, la sensibilidad térmica alterada, la debilidad de las extremidades inferiores, la caquexia, el edema periférico, la hepatomegalia, la púrpura, la disfunción diastólica, las contracciones ventriculares prematuras, la neuropatía craneal, la disminución de los reflejos tendinosos profundos, los depósitos de amiloide en el humor vítreo, la opacidad vítrea, la xeroftalmia, el glaucoma, el aspecto festoneado en las pupilas, la hinchazón de los pies debida a la retención de agua. En determinadas formas de realización, el síntoma es un síntoma cognitivo seleccionado del grupo que consiste en el deterioro de la memoria, el deterioro de la capacidad de juicio y de razonamiento, el deterioro de la capacidad de planificación, la alteración de la flexibilidad, el deterioro del pensamiento abstracto, el deterioro de la capacidad de adquisición de reglas, el deterioro de la capacidad para iniciar acciones apropiadas, el deterioro de la capacidad para inhibir acciones inapropiadas, el deterioro de la memoria a corto plazo, el deterioro de la memoria a largo plazo, la paranoia, la desorientación, la confusión, la alucinación y la demencia. En determinadas formas de realización, el síntoma es un síntoma psiquiátrico seleccionado del grupo que consiste en la demencia, la ansiedad, la depresión, el embotamiento afectivo, el egocentrismo, la agresividad, el comportamiento compulsivo, la irritabilidad, los cambios de personalidad, incluidos el deterioro de la memoria, de la capacidad de juicio y de razonamiento, y la idea suicida.

En determinadas formas de realización, el síntoma es la inquietud. En determinadas formas de realización, el síntoma es la falta de coordinación. En determinadas formas de realización, el síntoma es el nistagmo. En determinadas formas de realización, el síntoma es la paraparesia espástica. En determinadas formas de realización, el síntoma es la falta de coordinación muscular. En determinadas formas de realización, el síntoma es las alteraciones de la visión. En determinadas formas de realización, el síntoma es el insomnio. En determinadas formas de realización, el síntoma es las sensaciones extrañas. En determinadas formas de realización, el síntoma es la mioclonía. En determinadas formas de realización, el síntoma es la ceguera. En determinadas formas de realización, el síntoma es la afasia. En determinadas formas de realización, el síntoma es el síndrome del túnel carpiano. En determinadas formas de realización, el síntoma es las convulsiones. En determinadas formas de realización, el síntoma es las hemorragias subaracnoideas. En determinadas formas de realización, el síntoma es el ictus. En determinadas formas de realización, el síntoma es la hemorragia cerebral. En determinadas formas de realización, el síntoma es la hidrocefalia. En determinadas formas de realización, el síntoma es la ataxia. En determinadas formas de realización, el síntoma es la parálisis espástica. En determinadas formas de realización, el síntoma es el coma. En determinadas formas de realización, el síntoma es la neuropatía sensorial. En determinadas formas de realización, el síntoma es la parestesia. En determinadas formas de realización, el síntoma es la hipoestesia. En determinadas formas de realización, el síntoma es la neuropatía motora. En determinadas formas de realización, el síntoma es la neuropatía autonómica. En determinadas formas de realización, el síntoma es la hipotensión ortostática. En determinadas formas de realización, el síntoma es el estreñimiento cíclico. En determinadas formas de realización, el síntoma es la diarrea cíclica. En determinadas formas de realización, el síntoma es las náuseas. En determinadas formas de realización, el síntoma es el vómito. En determinadas formas de realización, el síntoma es

la disminución de la sudoración. En determinadas formas de realización, el síntoma es la impotencia. En determinadas formas de realización, el síntoma es el vaciamiento gástrico retardado. En determinadas formas de realización, el síntoma es la retención urinaria. En determinadas formas de realización, el síntoma es la incontinencia urinaria. En determinadas formas de realización, el síntoma es la cardiopatía progresiva. En determinadas formas de realización, el síntoma es la fatiga. En determinadas formas de realización, el síntoma es la dificultad respiratoria. En determinadas formas de realización, el síntoma es la pérdida de peso. En determinadas formas de realización, el síntoma es el entumecimiento. En determinadas formas de realización, el síntoma es el hormigueo. En determinadas formas de realización, el síntoma es la debilidad. En determinadas formas de realización, el síntoma es la macroglosia. En determinadas formas de realización, el síntoma es el síndrome nefrótico. En determinadas formas de realización, el síntoma es la insuficiencia cardíaca congestiva. En determinadas formas de realización, el síntoma es la disnea de esfuerzo. En determinadas formas de realización, el síntoma es el edema periférico. En determinadas formas de realización, el síntoma es las arritmias. En determinadas formas de realización, el síntoma es las palpitaciones. En determinadas formas de realización, el síntoma es el mareo. En determinadas formas de realización, el síntoma es el síncope. En determinadas formas de realización, el síntoma es la hipotensión postural. En determinadas formas de realización, el síntoma es los problemas de los nervios periféricos. En determinadas formas de realización, el síntoma es el deterioro sensoriomotor. En determinadas formas de realización, el síntoma es la neuropatía de las extremidades inferiores. En determinadas formas de realización, el síntoma es la neuropatía de las extremidades superiores. En determinadas formas de realización, el síntoma es la hiperalgesia. En determinadas formas de realización, el síntoma es la sensibilidad térmica alterada. En determinadas formas de realización, el síntoma es la debilidad de las extremidades inferiores. En determinadas formas de realización, el síntoma es la caquexia. En determinadas formas de realización, el síntoma es el edema. En determinadas formas de realización, el síntoma es la hepatomegalia. En determinadas formas de realización, el síntoma es la púrpura. En determinadas formas de realización, el síntoma es la disfunción diastólica. En determinadas formas de realización, el síntoma es las contracciones ventriculares prematuras. En determinadas formas de realización, el síntoma es la neuropatía craneal. En determinadas formas de realización, el síntoma es la disminución de los reflejos tendinosos profundos. En determinadas formas de realización, el síntoma es los depósitos de amiloide en el humor vítreo. En determinadas formas de realización, el síntoma es la opacidad vítrea. En determinadas formas de realización, el síntoma es la xeroftalmia. En determinadas formas de realización, el síntoma es el glaucoma. En determinadas formas de realización, el síntoma es el aspecto festoneado en las pupilas. En determinadas formas de realización, el síntoma es la inflamación de los pies debida a la retención de agua.

En determinadas formas de realización, el síntoma es el deterioro de la memoria. En determinadas formas de realización, el síntoma es el deterioro de la capacidad de juicio y de razonamiento. En determinadas formas de realización, el síntoma es el deterioro de la capacidad de planificación. En determinadas formas de realización, el síntoma es la alteración de la flexibilidad. En determinadas formas de realización, el síntoma es el deterioro del pensamiento abstracto. En determinadas formas de realización, el síntoma es el deterioro de la capacidad de adquisición de reglas. En determinadas formas de realización, el síntoma es el deterioro de la capacidad para iniciar acciones apropiadas. En determinadas formas de realización, el síntoma es el deterioro de la capacidad para inhibir acciones inapropiadas. En determinadas formas de realización, el síntoma es el deterioro de la memoria a corto plazo. En determinadas formas de realización, el síntoma es el deterioro de la memoria a largo plazo. En determinadas formas de realización, el síntoma es la paranoia. En determinadas formas de realización, el síntoma es la desorientación. En determinadas formas de realización, el síntoma es la confusión. En determinadas formas de realización, el síntoma es la alucinación. En determinadas formas de realización, el síntoma es la demencia.

En determinadas formas de realización, el síntoma es la demencia. En determinadas formas de realización, el síntoma es la ansiedad. En determinadas formas de realización, el síntoma es la depresión. En determinadas formas de realización, el síntoma es el embotamiento afectivo. En determinadas formas de realización, el síntoma es el egocentrismo. En determinadas formas de realización, el síntoma es la agresividad. En determinadas formas de realización, el síntoma es el comportamiento compulsivo. En determinadas formas de realización, el síntoma es la irritabilidad. En determinadas formas de realización, el síntoma es los cambios de personalidad. En determinadas formas de realización, el síntoma es la idea suicida.

En determinadas formas de realización, se divulgan métodos para tratar a un individuo que comprenden administrar una o más composiciones farmacéuticas según se describen en el presente documento. En determinadas formas de realización, el individuo tiene una enfermedad relacionada con el sistema nervioso central.

En determinadas formas de realización, la administración de un compuesto antisentido dirigido a un de ácido nucleico de la transtiretina da como resultado la reducción de la expresión de transtiretina en al menos aproximadamente un 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%, o un intervalo definido por dos de estos valores.

En determinadas formas de realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto antisentido dirigido a la transtiretina se utilizan para preparar un medicamento para tratar a un paciente que padece o es susceptible a una enfermedad relacionada con el sistema nervioso central.

En determinadas formas de realización, los métodos descritos en el presente documento incluyen administrar un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que tiene una porción de bases

nitrogenadas contiguas según se describe en el presente documento de una secuencia que aparece en la SEQ ID NO: 25, 78, 80, 86, 87, 115, 120, 122 y 124.

Administración

5 En determinadas formas de realización, los compuestos y las composiciones según se describen en el presente documento pueden administrarse de varias maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico, y de la zona a tratar. La administración puede ser tópica, pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluida mediante nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica, oral o parenteral. Los compuestos y las composiciones según se describen en el presente documento pueden suministrarse de manera que se dirijan a un tejido concreto, tal como el hígado o el cerebro.

10 En determinadas formas de realización, los compuestos y las composiciones según se describen en el presente documento se administran por vía parenteral. "Administración parenteral" se refiere a la administración mediante inyección o infusión. La administración parenteral incluye la administración subcutánea, la administración intravenosa, la administración intramuscular, la administración intraarterial, la administración intraperitoneal o la administración intracraneal, por ejemplo, la administración intracerebral, la administración intratecal, la administración intraventricular, la administración ventricular, la administración intracerebroventricular, la administración intraventricular cerebral o la administración ventricular cerebral. La administración puede ser continua, o crónica, o corta o intermitente.

15 En determinadas formas de realización, la administración parenteral es mediante infusión. La infusión puede ser crónica o continua o corta o intermitente. En determinadas formas de realización, los agentes farmacéuticos infundidos se suministran mediante una bomba. En determinadas formas de realización, la administración parenteral es por inyección.

20 En determinadas formas de realización, la administración parenteral es subcutánea.

25 En formas de realización adicionales, la formulación para la administración es los compuestos descritos en el presente documento y solución salina.

30 En determinadas formas de realización, los compuestos y las composiciones se suministran al SNC. En determinadas formas de realización, los compuestos y las composiciones se suministran al líquido cefalorraquídeo. En determinadas formas de realización, los compuestos y las composiciones se administran al parénquima cerebral. En determinadas formas de realización, los compuestos y las composiciones se suministran a un animal a múltiples regiones del sistema nervioso central (por ejemplo, a múltiples regiones del cerebro, y/o a la médula espinal) mediante administración intratecal o administración intracerebroventricular. Puede conseguirse una distribución amplia de los compuestos y las composiciones que se describen en el presente documento dentro del sistema nervioso central mediante administración intraparenquimatosas, administración intratecal o administración intracerebroventricular.

35 En determinadas formas de realización, la presente invención incluye composiciones farmacéuticas que pueden suministrarse por inyección directamente al cerebro. La inyección puede ser por inyección estereotáctica en una región concreta del cerebro (por ejemplo, la sustancia negra, el plexo coroideo, la corteza, el hipocampo, el cuerpo estriado, el plexo coroideo o el globus pallidus). El compuesto también puede suministrarse a regiones difusas del cerebro (por ejemplo, el suministro difuso a la corteza del cerebro).

40 En determinadas formas de realización, la presente invención incluye composiciones farmacéuticas que pueden suministrarse por inyección directamente al cerebro. La inyección puede ser por inyección estereotáctica en una región concreta del cerebro (por ejemplo, la sustancia negra, el plexo coroideo, la corteza, el hipocampo, el cuerpo estriado, el plexo coroideo o el globus pallidus). El compuesto también puede suministrarse a regiones difusas del cerebro (por ejemplo, el suministro difuso a la corteza del cerebro).

45 En determinadas formas de realización, la administración parenteral es por inyección. La inyección puede suministrarse con una jeringa o una bomba. En determinadas formas de realización, la inyección es una inyección en bolo. En determinadas formas de realización, la inyección se administra directamente a un tejido, tal como el cuerpo estriado, el caudado, la corteza, el hipocampo y el cerebelo.

50 En determinadas formas de realización, el suministro de un compuesto o composición según se describen en el presente documento puede influir en el perfil farmacocinético del compuesto o composición. En determinadas formas de realización, la inyección de un compuesto o composición según se describen en el presente documento a un tejido diana mejora el perfil farmacocinético del compuesto o composición en comparación con la infusión del compuesto o composición. En una determinada forma de realización, la inyección de un compuesto o composición mejora la potencia en comparación con la difusión amplia, que requiere menos cantidad del compuesto o composición para conseguir una farmacología similar. En determinadas formas de realización, farmacología similar se refiere a la cantidad de tiempo que un ARNm diana y/o una proteína diana es regulada por disminución (por ejemplo, duración de la acción). En determinadas formas de realización, los métodos para situar específicamente un agente farmacéutico, tal como por inyección en bolo, disminuyen la concentración eficaz media (CE50) por un factor de aproximadamente 50 (por ejemplo, se requiere 50 veces menos concentración en el tejido para conseguir un efecto farmacodinámico igual o similar). En determinadas formas de realización, los métodos para situar específicamente un agente farmacéutico, tal como por inyección en bolo, disminuyen la concentración eficaz media (CE50) por un factor de 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50. En determinadas formas de realización, el agente farmacéutico es un compuesto antisentido como se describe adicionalmente en el presente documento. En determinadas formas

de realización, el tejido diana es el tejido cerebral. En determinadas formas de realización, el tejido diana es el tejido estriado. En determinadas formas de realización, la disminución de la CE50 es deseable porque reduce la dosis necesaria para conseguir un resultado farmacológico en un paciente que lo necesita.

5 La semivida de los oligonucleótidos *gapmer* MOE en tejido hepático de ratones CD1 es de aproximadamente 21 días (véanse los Ejemplos 12).

En determinadas formas de realización, un oligonucleótido antisentido se suministra por inyección o infusión una vez al mes, cada dos meses, cada 90 días, cada 3 meses, cada 6 meses, dos veces al año o una vez al año.

10

Determinadas terapias de combinación

En determinadas formas de realización, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención se coadministran con uno o más de otros agentes farmacéuticos. En determinadas formas de realización, dichos uno o más de otros agentes farmacéuticos están diseñados para tratar la misma enfermedad, trastorno o afección que las una o más composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. En determinadas formas de realización, dichos uno o más de otros agentes farmacéuticos están diseñados para tratar una enfermedad, trastorno o afección diferente que las una o más composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. En determinadas formas de realización, dichos uno o más de otros agentes farmacéuticos están diseñados para tratar un efecto secundario no deseado de una o más composiciones farmacéuticas según se describen en el presente documento. En determinadas formas de realización, una o más composiciones farmacéuticas se coadministran con otro agente farmacéutico para tratar un efecto no deseado de ese otro agente farmacéutico. En determinadas formas de realización, se coadministran una o más composiciones farmacéuticas con otro agente farmacéutico para producir un efecto combinatorio. En determinadas formas de realización, se coadministran una o más composiciones farmacéuticas con otro agente farmacéutico para producir un efecto sinérgico.

15

20

25

30

En determinadas formas de realización, se administran al mismo tiempo una o más composiciones farmacéuticas y uno o más de otros agentes farmacéuticos. En determinadas formas de realización, se administran en momentos diferentes una o más composiciones farmacéuticas y uno o más de otros agentes farmacéuticos. En determinadas formas de realización, se preparan juntos en una única formulación una o más composiciones farmacéuticas y uno o más agentes farmacéuticos. En determinadas formas de realización, se preparan por separado una o más composiciones farmacéuticas y uno o más agentes farmacéuticos.

35

40

En determinadas formas de realización, el segundo compuesto se administra antes de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En determinadas formas de realización, el segundo compuesto se administra después de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En determinadas formas de realización, el segundo compuesto se administra al mismo tiempo que una composición farmacéutica de la presente invención. En determinadas formas de realización, la dosis de un segundo compuesto coadministrado es la misma que la dosis que se administraría si el segundo compuesto se administrase en solitario. En determinadas formas de realización, la dosis de un segundo compuesto coadministrado es menor que la dosis que se administraría si el segundo compuesto se administrase en solitario. En determinadas formas de realización, la dosis de un segundo compuesto coadministrado es mayor que la dosis que se administraría si el segundo compuesto se administrase en solitario.

45

50

En determinadas formas de realización, la coadministración de un segundo compuesto potencia el efecto de un primer compuesto, de manera que la coadministración de los compuestos da como resultado un efecto que es mayor que el efecto de administrar el primer compuesto en solitario. En determinadas formas de realización, la coadministración da como resultado unos efectos que son aditivos a los efectos de los compuestos cuando se administran en solitario. En determinadas formas de realización, la coadministración da como resultado unos efectos que son supraaditivos a los efectos de los compuestos cuando se administran en solitario. En determinadas formas de realización, el primer compuesto es un compuesto antisentido. En determinadas formas de realización, el segundo compuesto es un compuesto antisentido.

55

60

En determinadas formas de realización, los agentes farmacéuticos que pueden coadministrarse con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen antipsicóticos tales como, por ejemplo, haloperidol, clorpromazina, clozapina, quetiapina y olanzapina; antidepresivos tales como, por ejemplo, fluoxetina, clorhidrato de sertralina, venlafaxina y nortriptilina; tranquilizantes tales como, por ejemplo, benzodiazepinas, clonazepam, paroxetina, venlafaxina, y betabloqueantes; eutimizantes tales como, por ejemplo, litio, valproato, lamotrigina y carbamazepina; bloqueadores neuromusculares tales como, por ejemplo, la toxina botulínica; y/u otros agentes experimentales incluidos, pero no limitados a, tetrabenazina (Xenazine), creatina, coenzima Q10, trehalosa, ácidos docosahexanoicos, ACR16, etil-EPA, atomoxetina, citalopram, dimebon, memantina, fenilbutirato sódico, ramelteon, ursodiol, zyprexa, xenazine, tiaprida, riluzol, amantadina, [123I]MNI-420, atomoxetina, tetrabenazina, digoxina, dextrometorfano, warfarina, alprozam, ketoconazol, omeprazol y minociclina.

65

En determinadas formas de realización, los agentes farmacéuticos que pueden coadministrarse con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen analgésicos tales como paracetamol (acetaminofén);

antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tales como los salicilatos; narcóticos tales como la morfina, y fármacos sintéticos con propiedades narcóticas tales como el tramadol. En determinadas formas de realización, los agentes farmacéuticos que pueden administrarse con una composición farmacéutica de la presente invención incluyen relajantes musculares tales como las benzodiazepinas y el metocarbamol.

5

Formulaciones

Los compuestos de la invención también pueden estar mezclados, conjugados o asociados de otro modo con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptores, u otras formulaciones, para facilitar la captación, distribución y/o absorción. Las patentes estadounidenses representativas que ilustran la preparación de tales formulaciones que facilitan la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, los documentos US: 5.108.921, 5.354.844, 5.416.016, 5.459.127, 5.521.291, 5.543.158, 5.547.932, 5.583.020, 5.591.721, 4.426.330, 4.534.899, 5.013.556, 5.108.921, 5.213.804, 5.227.170, 5.264.221, 5.356.633, 5.395.619, 5.416.016, 5.417.978, 5.462.854, 5.469.854, 5.512.295, 5.527.528, 5.534.259, 5.543.152, 5.556.948, 5.580.575 y 5.595.756.

10

15

Los compuestos antisentido de la invención abarcan cualquier sal farmacéuticamente aceptable, éster o sal de tal éster, o cualquier otro compuesto que, tras administrarse a un animal, incluido un ser humano, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo.

20

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del precursor y no le confieren efectos toxicológicos no deseados. Para los oligonucleótidos, los ejemplos preferentes de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la patente estadounidense 6.287.860. Las sales de sodio han demostrado ser formas adecuadas de fármacos oligonucleótidos.

25

La presente invención también incluye formulaciones y composiciones farmacéuticas que incluyen los compuestos antisentido de la invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de varias maneras, dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y de la zona a tratar. La administración puede ser parenteral. La administración parenteral incluye la inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o la administración intracraneal, por ejemplo, la administración intracerebral, la administración intratecal, la administración intraventricular, la administración ventricular, la administración intracerebroventricular, la administración intraventricular cerebral o la administración ventricular cerebral.

30

35

La administración intraventricular resulta preferente para focalizar la expresión de transtiretina en el plexo coroideo. Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para la administración oral. Las formulaciones y composiciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes, y similares. También pueden ser útiles los guantes, los condones recubiertos, y similares.

40

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse de manera práctica en forma farmacéutica unitaria, pueden prepararse según las técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el(los) excipiente(s) o vehículo(s) farmacéutico(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y a continuación, en caso necesario, dando forma al producto.

45

Las composiciones de la presente invención pueden formularse en forma de cualquiera de muchas formas farmacéuticas posibles tales como, pero no limitadas a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gelatina, jarabes líquidos, geles suaves, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener adicionalmente sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluidas, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

50

55

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, soluciones, emulsiones, espumas y formulaciones que contienen liposomas. Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender uno o más potenciadores de la penetración, vehículos, excipientes u otros principios activos o inactivos.

60

Las emulsiones son por lo general sistemas heterogéneos de un líquido disperso en otro en forma de gotitas que suelen sobrepasar los 0,1 μm de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersadas, y el fármaco activo que puede estar presente como solución en la fase acuosa, la fase oleosa o por sí mismo como una fase separada. Las microemulsiones se incluyen como una forma de

65

realización de la presente invención. Las emulsiones y sus usos son bien conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en la patente estadounidense 6.287.860.

5 Las formulaciones de la presente invención incluyen formulaciones liposomales. Tal como se utiliza en la presente invención, el término "liposoma" se refiere a una vesícula compuesta por lípidos anfífilos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares que tienen una membrana formada a partir de un material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición a suministrar. Los liposomas catiónicos son liposomas cargados positivamente que se cree interactúan con las moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable. Se cree que los liposomas que son sensibles al pH o
10 están cargados negativamente inmovilizan el ADN en lugar de formar complejos con él. Los liposomas catiónicos y los no catiónicos se han utilizado para introducir ADN en las células.

15 Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", una expresión que, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan en los liposomas, dan como resultado mejores vidas útiles en circulación en comparación con los liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en la patente estadounidense 6.287.860.

20 En otra forma de realización de la invención, las formulaciones de la presente invención incluyen formulaciones salinas. En determinada forma de realización de la invención, una formulación consiste en los compuestos descritos en el presente documento y solución salina. En determinadas formas de realización, una formulación consiste esencialmente en los compuestos descritos en el presente documento y solución salina. En determinadas formas de realización, la solución salina es una solución salina de calidad farmacéuticamente aceptable. En determinadas formas de realización, la solución salina es una solución salina tamponada. En
25 determinadas formas de realización, la solución salina es una solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En determinadas formas de realización, una formulación excluye los liposomas. En determinadas formas de realización, la formulación excluye los liposomas estéricamente estabilizados. En determinadas formas de realización, una formulación excluye los fosfolípidos. En determinadas formas de realización, la formulación consiste esencialmente en los compuestos descritos en el presente documento y solución salina y excluye los liposomas.
30

Las formulaciones farmacéuticas y composiciones de la presente invención también pueden incluir tensioactivos. Los tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la patente estadounidense 6.287.860.

35 En una forma de realización, la presente invención emplea diversos potenciadores de la penetración para influir en el suministro eficaz de los ácidos nucleicos, particularmente los oligonucleótidos. Los potenciadores de la penetración y sus usos se describen adicionalmente en la patente estadounidense 6.287.860.

40 Un experto en la materia reconocerá que las formulaciones se diseñan de manera rutinaria según su uso previsto, es decir, la vía de administración.

45 Las formulaciones preferentes para la administración tópica incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos de la invención se encuentran en mezcla con un agente de suministro tópico tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y liposomas preferentes incluyen neutros (por ejemplo, dioleoil fosfatidiletanolamina DOPE, dimiristoil fosfatidilcolina DMPC, distearoil fosfatidilcolina) negativos (por ejemplo, dimiristoil fosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo dioleoil tetrametilaminopropil DOTAP y dioleoil fosfatidiletanolamina DOTMA).

50 Las composiciones y formulaciones para la administración parenteral, incluidas la inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, o la administración intracraneal, pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero no limitados a, potenciadores de la penetración, compuestos transportadores y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

55 Determinadas formas de realización de la invención divulgan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o más de otros agentes quimioterapéuticos que actúan mediante un mecanismo no antisentido. Los ejemplos de tales agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer tales como daunorrubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, arabinósido de citosina, bis-cloroetilnitrosourea, busulfán, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucil, metilciclohexilnitrosourea, mostazas nitrogenadas, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiaurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxiciclofosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecan, topotecan, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se utilizan con los compuestos de la invención, tales agentes
60
65

quimioterapéuticos pueden utilizarse individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido de MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o más de otros de tales agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). También pueden combinarse en composiciones de la invención fármacos antiinflamatorios, incluidos pero no limitados a fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, incluidos pero no limitados a ribavirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir. Las combinaciones de compuestos antisentido y otros fármacos no antisentido también pertenecen al alcance de la presente invención. Pueden utilizarse, juntos o secuencialmente, dos o más compuestos combinados.

En otra forma de realización relacionada, las composiciones de la invención pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a una segunda diana ácido nucleico. Como alternativa, las composiciones de la invención pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones de la misma diana ácido nucleico. En la técnica se conocen numerosos ejemplos de compuestos antisentido. Pueden utilizarse, juntos o secuencialmente, dos o más compuestos combinados.

Dosificación

Se cree que la formulación de las composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) está dentro del dominio de los expertos en la materia. La dosificación depende de la gravedad y sensibilidad de la patología a tratar, durando el ciclo del tratamiento de varios días a varios meses, o hasta que se logra la cura o se consigue una disminución de la patología. Pueden calcularse las pautas de dosificación óptimas a partir de las mediciones de acumulación del fármaco en el cuerpo del paciente. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los oligonucleótidos individuales, y pueden estimarse generalmente basándose en las CE_{50} que han resultado ser eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01 μ g a 100 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una o más veces al día, semanalmente, mensualmente o anualmente, o a intervalos deseados. Tras un tratamiento eficaz, puede ser deseable hacer que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición de la patología, en la que el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que van desde 0,01 μ g hasta 100 g por kg de peso corporal, una o más veces al día.

Aunque la presente invención se ha descrito con especificidad según algunas de sus formas de realización preferentes, los siguientes ejemplos sirven solamente para ilustrar la invención y no pretenden limitarla.

EJEMPLOS

Divulgación no limitativa

Aunque determinados compuestos, composiciones y métodos descritos en el presente documento se han descrito con especificidad según determinadas formas de realización, los siguientes ejemplos sirven solamente para ilustrar los compuestos descritos en el presente documento y no pretenden limitarlos.

Ejemplo 1: Inhibición por antisentido de la transtiretina humana en células HepG2

Se diseñaron oligonucleótidos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de la transtiretina y se ensayaron para determinar sus efectos sobre el ARNm de la transtiretina *in vitro*. Se transfectaron células HepG2 cultivadas a una densidad de 10.000 células por pocillo utilizando el reactivo lipofectina con 50 nM de oligonucleótido antisentido. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de la transtiretina mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó el juego de cebador y sonda de ser humano RTS1396 (secuencia directa CCCTGCTGAGCCCCTACTC, indicada en el presente documento como SEQ ID NO: 5; secuencia inversa TCCCTCATTCCTTGGGATTG, indicada en el presente documento como SEQ ID NO: 6; secuencia de sonda ATTCCACCACGGCTGTCGTCA, indicada en el presente documento como SEQ ID NO: 7). Los niveles de ARNm de la transtiretina se ajustaron según el contenido total de ARN, medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la transtiretina, con respecto a las células testigo sin tratar.

Los oligonucleótidos antisentido híbridos de las Tablas 1 y 2 se diseñaron como *gapmers* MOE 5-10-5. Los *gapmers* tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento de separación central está compuesto por diez 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden cinco nucleótidos cada una. Cada nucleótido del segmento de ala 5' y cada nucleótido del segmento de ala 3' tiene una modificación 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada *gapmer* son enlaces fosforotioato (P=S). Todos los residuos de citidina a lo largo de cada *gapmer* son 5-metilcitidinas. "Sitio de inicio diana humano" indica el nucleótido más cercano al extremo 5' al que se dirige el *gapmer* en la secuencia del gen humano. "Sitio de parada diana humano" indica el nucleótido más cercano al extremo 3' al que se dirige el *gapmer* en la secuencia del gen humano. Cada *gapmer* que aparece en la Tabla 1 se dirige al ARNm de la transtiretina humana, indicado en el presente documento como SEQ ID NO: 1 (nº de registro del GENBANK NM_000371.2). También se diseñaron

determinados *gapmers* que se dirijan a las secuencias intrónicas o a las uniones intrón-exón de la secuencia genómica de la transtiretina humana, indicados en el presente documento como SEQ ID NO: 2 (nº de registro del GENBANK NT_010966.10 truncada desde el nucleótido 2009236 hasta el 2017289) y aparecen en la Tabla 2.

5 Los oligonucleótidos humanos de las Tablas 1 y 2 también presentan reactividad cruzada con las secuencias del gen de mono rhesus. Los "desapareamientos" indican el número de bases nitrogenadas por el que el oligonucleótido humano presenta desapareamiento con una secuencia génica de mono rhesus. Cuanto mayor es la complementariedad entre el oligonucleótido humano y la secuencia de mono rhesus, más probable resulta que el oligonucleótido humano pueda presentar reactividad cruzada con la secuencia de mono rhesus. Se compararon los oligonucleótidos humanos de la Tabla 1 con los exones 1-4 extraídos de la secuencia genómica de mono rhesus con nº de registro del GENBANK NW_001105671.1, basándose en la similitud con los exones humanos. Se compararon los oligonucleótidos humanos de la Tabla 2 con la secuencia genómica de mono rhesus, indicada en el presente documento como SEQ ID NO: 4 (nº de registro del GENBANK NW_001105671.1 truncada desde el nucleótido 628000 hasta el 638000). "Sitio de inicio diana de mono rhesus" indica el nucleótido más cercano al extremo 5' al que se dirige el *gapmer* en la secuencia del mono rhesus. "Sitio de parada diana de mono rhesus" indica el nucleótido más cercano al extremo 3' al que se dirige el *gapmer* en la secuencia del mono rhesus.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 1

Inhibición de los niveles de ARNm de la transtretina humana por oligonucleótidos antisentido híbridos con alas MOE 5-10-5 y separación desoxy dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y a la SEQ ID NO: 4									
ISIS NO	Sitio de inicio humano	Sitio de parada humano	Región	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio de mono rhesus	Sitio de parada de mono rhesus	Desapareamientos	SEQ ID NO
304267	217	236	codificante	ACTGGTTTCC CAGAGGCAA	53	217	236	0	8
304268	222	241	codificante	GACTCACTGGT TTTCCAGA	16	222	241	0	9
304280	353	372	codificante	TGAATACCAC CTCTGCATGC	51	353	372	0	10
304284	425	444	codificante	CCGTGGTGA ATAGGAGTAG	82	425	444	0	11
304285	427	446	codificante	AGCCGTGGTG GAATAGGAGT	89	427	446	0	12
304286	431	450	codificante	CGACAGCCGT GGTGAATAG	63	431	450	0	13
304287	438	457	codificante	TTGGTGACGA CAGCCGTGGT	88	438	457	0	14
304288	440	459	codificante	GATTGGTGAC GACAGCCGTG	82	440	459	0	15
304289	442	461	codificante	GGGATTGGTG ACGACAGCCG	78	442	461	0	16
304290	443	462	codificante	TGGGATTGGT GACGACAGCC	85	443	462	0	17
304291	449	468	codificante- codón de terminación	ATTCCTTGGGA TTGGTGACG	52	449	468	0	18
304292	450	469	codificante- codón de terminación	CATTCCTGGG ATTGGTGAC	34	450	469	0	19
304293	451	470	codificante- codón de terminación	TCATTCCTGG GATTGGTGA	29	451	470	0	20

Inhibición de los niveles de ARNm de la transtretina humana por oligonucleótidos antisentido híbridos con alas MOE 5-10-5 y separación desoxy dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y a la SEQ ID NO: 4

ISIS NO	Sitio de inicio humano	Sitio de parada humano	Región	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio de mono rhesus	Sitio de parada de mono rhesus	Desapareamientos	SEQ ID NO
304294	460	479	codificante-codón de terminación-3'UTR	AGAAAGTCCCT CAATCCCTGG	32	460	479	0	21
304296	481	500	3'-UTR	GTCCTTCAGGT CCACTGGAG	84	478	497	2	22
304297	489	508	3'-UTR	CATCCCTCGTC CTTCAGGTC	0	486	505	1	23
304298	501	520	3'-UTR	TACATGAAAT CCCATCCCTC	26	498	517	0	24
304299	507	526	3'-UTR	CTTGGTTACAT GAAATCCCA	85	504	523	0	25
304300	513	532	3'-UTR	AATACTCTGG TTACATGAA	49	510	529	0	26
304301	526	545	3'UTR	TTAGTAAAAA TGGAAATACTC	0	523	542	0	27
304302	532	551	3'UTR	ACTGCTTTAGT AAAAATGGA	42	529	548	0	28
304303	539	558	3'UTR	TGAAAAACACT GCTTTAGTAA	41	536	555	0	29
304304	546	565	3'UTR	TATGAGGTGA AAACACTGCT	49	543	562	0	30
304307	564	583	3'UTR	TGGACTTCTAA CATAGCATA	73	561	580	2	31
304308	572	591	3'UTR	TCCTGCTGG ACTTCTAAC	55	569	588	1	32
304309	578	597	3'-UTR	TTATTGTCICT GCCTGGACT	77	575	594	0	33

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Inhibición de los niveles de ARNm de la transtretina humana por oligonucleótidos antisentido híbridos con alas MOE 5-10-5 y separación desoxy dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y a la SEQ ID NO: 4									
ISIS NO	Sitio de inicio humano	Sitio de parada humano	Región	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio de mono rhesus	Sitio de parada de mono rhesus	Desapareamientos	SEQ ID NO
304311	597	616	3'-UTR	TGCCTTTCACA GGAATGTT	80	594	613	0	34
304312	598	617	3'-UTR	GTGCCTTTCAC AGGAATGTT	71	595	614	0	35
420871	36	55	codificante	CAGAGGAGGA GCAGACGATG	48	36	55	0	36
420872	120	139	codificante	TCTAGAACTTT GACCATCAG	55	120	139	0	37
420873	212	231	codificante	TTTTCCCAGAG GCAAAATGGC	54	212	231	0	38
420874	226	245	codificante	TCCAGACTCAC TGGTTTCC	63	226	245	0	39
420875	271	290	codificante	TATCCCTTCTA CAAAITCCT	40	271	290	0	40
420876	285	304	codificante	ATTCCACITTT GTATATCCC	42	285	304	0	41
420877	293	312	codificante	TGGTGTCTAAT TCCACITTG	76	293	312	0	42
420878	303	322	codificante	CAGTAAGATTT GGTGTCTAT	80	303	322	0	43
420879	307	326	codificante	CTTCCAGTAAG ATTGGTGT	73	307	326	0	44
420880	347	366	codificante	CCACCTCTGCA TGCATCATGG	76	347	366	0	45
420881	355	374	codificante	TGTGAATACC ACCTCTGCAT	58	355	374	0	46

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Inhibición de los niveles de ARNm de la transtretina humana por oligonucleótidos antisentido híbridos con alas MOE 5-10-5 y separación desoxy dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y a la SEQ ID NO: 4									
ISIS NO	Sitio de inicio humano	Sitio de parada humano	Región	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio de mono rhesus	Sitio de parada de mono rhesus	Desapareamientos	SEQ ID NO
420882	357	376	codificante	GCTGTGAATA CCACCTCTGC	69	357	376	0	47
420883	362	381	codificante	CGTTGGCTGTG AATAACCACC	64	362	381	0	48
420884	428	447	codificante	CAGCCGTGGT GGAATAGGAG	93	428	447	0	49
420885	430	449	codificante	GACAGCCGTG GTGGAATAGG	93	430	449	0	50
420886	432	451	codificante	ACGACAGCCG TGGTGAATA	92	432	451	0	51
420887	433	452	codificante	GACGACAGCC GTGGTGAAT	93	433	452	0	52
420888	434	453	codificante	TGACGACAGC CGTGGTGGAA	95	434	453	0	53
420889	435	454	codificante	GTGACGACAG CCGTGGTGGAA	93	435	454	0	54
420890	436	455	codificante	GGTGACGACA GCCGTGGTGG	97	436	455	0	55
420891	437	456	codificante	TGGTGACGAC AGCCGTGGTG	97	437	456	0	56
420892	439	458	codificante	ATTGGTGACG ACAGCCGTGG	93	439	458	0	57
420893	441	460	codificante	GGATTGGTGA CGACAGCCGT	96	441	460	0	58
420894	444	463	codificante	TTGGATTGGT GACGACAGC	88	444	463	0	59

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Inhibición de los niveles de ARNm de la transtretina humana por oligonucleótidos antisentido híbridos con alas MOE 5-10-5 y separación desoxy dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y a la SEQ ID NO: 4									
ISIS NO	Sitio de inicio humano	Sitio de parada humano	Región	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio de mono rhesus	Sitio de parada de mono rhesus	Desapareamientos	SEQ ID NO
420895	445	464	codificante	CTTGGGATTGG TGACGACAG	95	445	464	0	60
420896	446	465	codificante	CCTTGGGATTG GTGACGACA	95	446	465	0	61
420897	447	466	codificante	TCCTTGGGATT GGTGACGAC	94	447	466	0	62
420898	448	467	codificante-codón de terminación	TTCCTTGGGAT TGGTGACGA	86	448	467	0	63
420899	452	471	codificante-codón de terminación-3'UTR	CTCATTCCTTG GGATTGGTG	94	452	471	0	64
420900	453	472	codificante-codón de terminación-3'UTR	CCTCATTCCTT GGGATTGGT	92	453	472	0	65
420901	454	473	codificante-codón de terminación-3'UTR	CCCTCATTCCT TGGGATTGG	93	454	473	0	66
420902	455	474	codificante-codón de terminación-3'UTR	TCCCTCATTC TTGGGATTG	75	455	474	0	67
420903	456	475	codificante-codón de terminación-3'UTR	GTCCCTCATTC CTTGGGATT	57	456	475	0	68
420904	457	476	codificante-codón de terminación-3'UTR	AGTCCCTCAT CCTTGGGAT	62	457	476	0	69
420905	458	477	codificante-codón de terminación-3'UTR	AAGTCCCTCAT TCCTTGGGA	58	458	477	0	70
420906	459	478	codificante-codón de terminación-3'UTR	GAAATCCCTC ATTCCTTGGG	79	459	478	0	71
420907	461	480	codificante-codón de terminación-3'UTR	GAGAAGTCCC TCATTCCTTG	59	461	480	0	72

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Inhibición de los niveles de ARNm de la transtiretina humana por oligonucleótidos antisentido híbridos con alas MOE 5-10-5 y separación desoxy dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y a la SEQ ID NO: 4									
ISIS NO	Sitio de inicio humano	Sitio de parada humano	Región	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio de mono rhesus	Sitio de parada de mono rhesus	Desapareamientos	SEQ ID NO
420908	462	481	codificante-codón de terminación-3'UTR	GGAGAAGTCC CTCAITCCIT	75	462	481	0	73
420909	500	519	3'UTR	ACATGAAATC CCATCCCTCG	82	497	516	0	74
420910	502	521	3'UTR	TTACATGAAAT CCCATCCCT	74	499	518	0	75
420911	503	522	3'UTR	GTTACATGAA ATCCCATCCC	81	500	519	0	76
420912	504	523	3'UTR	GGTTACATGA AATCCCATCC	92	501	520	0	77
420913	505	524	3'UTR	TGGTTACATGA AATCCCAATC	95	502	521	0	78
420914	506	525	3'UTR	TTGGTTACATG AAATCCCAT	93	503	522	0	79
420915	508	527	3'UTR	TCTTGGTTACA TGAAAATCCC	92	505	524	0	80
420916	509	528	3'UTR	CTCTTGGTTAC ATGAAAATCC	88	506	525	0	81
420917	510	529	3'UTR	ACTCTTGGTTA CATGAAAATC	92	507	526	0	82
420918	511	530	3'UTR	TACTCTTGGTT ACATGAAAT	88	508	527	0	83
420919	512	531	3'UTR	ATACTCTTGGT TACATGAAA	89	509	528	0	84
420920	514	533	3'UTR	GAATACTCTTG GTTACATGA	87	511	530	0	85

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Inhibición de los niveles de ARNm de la transtretina humana por oligonucleótidos antisentido híbridos con alas MOE 5-10-5 y separación desoxy dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y a la SEQ ID NO: 4

ISIS NO	Sitio de inicio humano	Sitio de parada humano	Región	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio de mono rhesus	Sitio de parada de mono rhesus	Desapareamientos	SEQ ID NO
420921	515	534	3'UTR	GGAATACTCTT GGTTACATG	92	512	531	0	86
420922	516	535	3'UTR	TGGAATACTCT TGGTTACAT	95	513	532	0	87
420923	517	536	3'UTR	ATGGAATACT CTTGGTTACA	90	514	533	0	88
420924	518	537	3'UTR	AATGGAATAC TCITGGTTAC	75	515	534	0	89
420925	519	538	3'UTR	AAATGGAATA CTCTTGGTTA	87	516	535	0	90
420926	520	539	3'UTR	AAAATGGAAT ACTCTTGGTT	88	517	536	0	91
420927	521	540	3'UTR	AAAAATGGAA TACTCTTGGT	50	518	537	0	92
420928	522	541	3'UTR	TAAAAATGGA ATACTCTTGG	26	519	538	0	93
420929	523	542	3'UTR	GTAAAAAATGG AATACTCTTGG	56	520	539	0	94
420930	524	543	3'UTR	AGTAAAAAATG GAATACTCTT	18	521	540	0	95
420931	525	544	3'UTR	TAGTAAAAAAT GGAATACTCT	12	522	541	0	96
420932	527	546	3'UTR	TTTAGTAAAA ATGGAATACT	1	524	543	0	97
420933	528	547	3'UTR	CTTTAGTAAAA ATGGAATAC	0	525	544	0	98

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Inhibición de los niveles de ARNm de la transtretina humana por oligonucleótidos antisentido híbridos con alas MOE 5-10-5 y separación desoxy dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y a la SEQ ID NO: 4									
ISIS NO	Sitio de inicio humano	Sitio de parada humano	Región	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio de mono rhesus	Sitio de parada de mono rhesus	Desapareamientos	SEQ ID NO
420934	529	548	3'UTR	GCITTAGTAAA AATGGAATA	6	526	545	0	99
420935	530	549	3'UTR	TGCITTAGTAA AAATGGAAT	0	527	546	0	100
420936	531	550	3'UTR	CTGCITTAGTA AAAATGGAA	40	528	547	0	101
420937	533	552	3'UTR	CACTGCTTTAG TAAAAATGG	47	530	549	0	102
420938	534	553	3'UTR	ACACTGCTTTA GTAAAAAATG	30	531	550	0	103
420939	535	554	3'UTR	AACACTGCTTT AGTAAAAAT	0	532	551	0	104
420940	536	555	3'UTR	AAACACTGCTT TAGTAAAAA	0	533	552	0	105
420941	537	556	3'UTR	AAAACACTGC TTTAGTAAAA	0	534	553	0	106
420942	538	557	3'UTR	GAAAACACTG CTTAGTAAA	0	535	554	0	107
420943	540	559	3'UTR	GTGAAAACAC TGCITTAGTA	14	537	556	0	108
420944	541	560	3'UTR	GGTGAAAACA CTGCTTTAGT	43	538	557	0	109
420945	542	561	3'UTR	AGGTGAAAAC ACTGCTTTAG	41	539	558	0	110

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Inhibición de los niveles de ARNm de la transtretina humana por oligonucleótidos antisentido híbridos con alas MOE 5-10-5 y separación desoxy dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y a la SEQ ID NO: 4									
ISIS NO	Sitio de inicio humano	Sitio de parada humano	Región	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio de mono rhesus	Sitio de parada de mono rhesus	Desapareamientos	SEQ ID NO
420946	543	562	3'UTR	GAGGTGAAAA CACTGCTTTA	20	540	559	0	111
420947	544	563	3'UTR	TGAGGTGAAA ACACTGCTTT	69	541	560	0	112
420948	545	564	3'UTR	ATGAGGTGAA AACACTGCTT	63	542	561	0	113
420949	579	598	3'UTR	TTTATTGTCTC TGCCTGGAC	84	576	595	0	114
420950	580	599	3'UTR	TTTTATTGTCT CTGCCTGGA	69	577	596	0	115
420951	581	600	3'UTR	GTTTTATTGTC TCTGCCTGG	87	578	597	0	116
420952	582	601	3'UTR	TGTTTTATTGT CTCTGCCTG	67	579	598	0	117
420953	583	602	3'UTR	ATGTTTTATTG TCCTCTGCT	51	580	599	0	118
420954	584	603	3'UTR	AATGTTTTATT GTCTCTGCC	60	581	600	0	119
420955	585	604	3'UTR	GAATGTTTTAT TGCTCTGTC	65	582	601	0	120
420956	586	605	3'UTR	GGAATGTTTTA TTGCTCTG	67	583	602	0	121
420957	587	606	3'UTR	AGGAATGTTTT ATTGCTCT	68	584	603	0	122
420958	588	607	3'UTR	CAGGAATGTTTT TATTGCTCT	45	585	604	0	123

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Inhibición de los niveles de ARNm de la transtiretina humana por oligonucleótidos antisentido híbridos con alas MOE 5.10-5 y separación desoxy dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y a la SEQ ID NO: 4									
ISIS NO	Sitio de inicio humano	Sitio de parada humano	Región	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio de mono rhesus	Sitio de parada de mono rhesus	Desapareamientos	SEQ ID NO
420959	589	608	3'UTR	ACAGGAATGT TTTATTGCT	28	586	605	0	124

Tabla 2

Inhibición de los niveles de ARNm de la transcritina humana por oligonucleótidos antisentido híbridos con alas MOE 5-10-5 y separación desoxi dirigidos a la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4									
ISIS NO	Sitio de inicio humano	Sitio de parada humano	Región	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio de mono rhesus	Sitio de parada de mono rhesus	Desapareamientos	ID NO
420960	606	625	exón 1- intrón 1	GATGTCACAG AAACACTCAC	13	1755	1774	0	125
420961	665	684	intrón 1	GCAAAGCTGG AAGGAGTCAC	7	1814	1833	0	126
420962	748	767	intrón 1	GAACITTCATTC TTTTTGAAG	0	1897	1916	0	127
420963	882	901	intrón 1	AGCTTCCTTAA TATCATATC	0	2031	2050	0	128
420964	966	985	intrón 1	TATAGGGCCA GAATATAATC	10	2115	2134	0	129
420965	1010	1029	intrón 1	ACTAAGCCTTT TAAAGATTA	17	2159	2178	0	130
420966	1208	1227	intrón 1	TGGAATTACT GAAAAGATGT	35	2356	2375	0	131
420967	1289	1308	intrón 1	ACCAGGGATG TGTATAATGA	43	2437	2456	0	132
420968	1364	1383	intrón 1	TCCCTACTCAG TATAACACA	0	2512	2531	0	133
420969	1472	1491	intrón 1	GATCAGAGTG AAAGGATTTA	0	2620	2639	0	134
420970	1687	1706	intrón 2	GGGAAGATAA AACCAAGTCC	46	2826	2845	0	135
420971	1739	1758	intrón 2	TAAATTCITTA GCAGATGAT	0	2878	2897	0	136
420972	1842	1861	intrón 2	AATGATGCTC AGGTTCTTGG	23	2980	2999	0	137

Inhibición de los niveles de ARNm de la transtiretina humana por oligonucleótidos antisentido híbridos con alas MOE 5-10-5 y separación desoxi dirigidos a la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4									
ISIS NO	Sitio de inicio humano	Sitio de parada humano	Región	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio de mono rhesus	Sitio de parada de mono rhesus	Desapareamientos	ID NO
420973	2051	2070	intrón 2	TTGGTGTACC CAGGGACAC	0	3187	3206	0	138
420974	2207	2226	intrón 2	AAAGTGTTC TTAGGCAAAA	29	3344	3363	0	139
420975	2655	2674	intrón 2	GGCATTITATA TAAACATAA	0	3798	3817	0	140
420976	2733	2752	intrón 2	AAGAACATTG GAATATITTT	0	3876	3895	0	141
420977	2874	2893	intrón 2	GTTGGAAATT GCTTCCCAIT	9	4017	4036	0	142
420978	3015	3034	intrón 2	AGTGGAAAAAC CTAAAGTAGG	0	4156	4175	0	143
420979	3618	3637	intrón 2	TTCCCCCAAC TAAAGTCAGA	0	4795	4814	0	144
420980	3735	3754	intrón 2 -exón 3	CCTATAAGGT GTGAAAAGTCT	0	4930	4949	0	145
420981	4096	4115	intrón 3	TGTAAGTTCA AGTCATGTTA	0	5291	5310	0	146
420982	4306	4325	intrón 3	GTGTTGCCAA GAATCACTTG	0	5502	5521	0	147
420983	4404	4423	intrón 3	AAAACACITTA TAATTGTGTC	0	5600	5619	0	148
420984	4518	4537	intrón 3	CTTTGACAAAGT TATTTGACT	0	5714	5733	0	149
420985	4880	4899	intrón 3	ATCCATGACT AAGCCAGAGA	0	6073	6092	0	150

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Inhibición de los niveles de ARNm de la transtiretina humana por oligonucleótidos antisentido híbridos con alas MOE 5-10-5 y separación desoxi dirigidos a la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4									
ISIS NO	Sitio de inicio humano	Sitio de parada humano	Región	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio de mono rhesus	Sitio de parada de mono rhesus	Desapareamientos	ID NO
470986	5185	5204	intrón 3	ATGGTTCCCAT CAGGCIGAG	0	6379	6398	0	151
420987	5542	5561	intrón 3	GCATTTATCAG AAGAAAGCTG	0	6732	6751	0	152
420988	6030	6049	intrón 3	TTGACCTTCAG CCCACCTTGA	0	7226	7245	0	153
420989	6133	6152	intrón 3	AGGAAAGTGAG AATCAOCCTAA	0	7641	7660	0	154
420990	6320	6339	intrón 3	AGAAGACAGT AAAGATGTGT	0	7828	7847	0	155
420991	6457	6476	intrón 3	AAATTGTGGA TCAAAAATGCT	0	7966	7985	0	156
420992	6736	6755	intrón 3	AACCAGACTT GAAATTATTGT	0	8246	8265	0	157
420993	6811	6830	intrón 3	AGTGGCTGCC AACCACAGAC	0	8321	8340	0	158
420994	7106	7125	intrón 3	GGAAGTCCAG TGCCAACTTA	0	8615	8634	0	159
420995	7162	7181	intrón 3	ATCCATTTCOA CCAGAGGCC	0	8670	8689	0	160

Debido a la escasa longitud del ARNm de la transtiretina humana, se diseñó un segundo juego de cebador y sonda alejado del primer juego de cebador y sonda, RTS1396, para evitar oligonucleótidos amplicones. Los oligonucleótidos antisentido también se ensayaron para determinar sus efectos sobre el ARNm de la transtiretina *in vitro* utilizando un nuevo juego de cebador y sonda de ser humano RTS3029 (secuencia directa CTTGCTGGACTGGTATTTGTGTCT, indicada en el presente documento como SEQ ID NO: 161, secuencia inversa AGAACTTTGACCATCAGAGGACACT, indicada en el presente documento como SEQ ID NO: 162; secuencia de sonda CCCTACGGGCACCGGTGAATCCX, indicada en el presente documento como SEQ ID NO: 163). Se transfirieron células HepG2 cultivadas a una densidad de 10.000 células por pocillo utilizando el reactivo lipofectina con 50 nM de oligonucleótido antisentido. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de la transtiretina mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los niveles de ARNm de la transtiretina se ajustaron según el contenido total de ARN, medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la transtiretina, con respecto a las células testigo sin tratar. Los resultados se presentan en la Tabla 3 como porcentaje de inhibición del conjunto de células testigo con PBS.

Tabla 3

Inhibición de los niveles de ARNm de la transtiretina humana por oligonucleótidos antisentido híbridos que tienen alas MOE 5-10-5 y separación desoxi con el juego de cebador y sonda RTS3029		
ISIS NO	Región	% de inhibición
304267	codificante	13
304268	codificante	10
304280	codificante	23
304284	codificante	10
304285	codificante	34
304286	codificante	0
304287	codificante	34
304288	codificante	45
304289	codificante	3
304290	codificante	16
304291	codificante-codón de terminación	4
304292	codificante-codón de terminación	10
304293	codificante-codón de terminación	14
304294	codón de terminación -3' UTR	30
304296	exón 4	78
304297	exón 4	29
304298	exón 4	19
304299	exón 4	85
304300	exón 4	52
304301	exón 4	15
304302	exón 4	45
304303	exón 4	51
304304	exón 4	62
304307	exón 4	76
304308	exón 4	63
304309	exón 4	75
304311	exón 4	81
304312	exón 4	68
420871	codificante	0
420872	codificante	5
420873	codificante	19
420874	codificante	0
420875	codificante	6
420876	codificante	20
420877	codificante	28
420878	codificante	37
420879	codificante	34
420880	codificante	36

ES 2 625 689 T3

	420881	codificante	10
	420882	codificante	27
5	420883	codificante	13
	420884	codificante	28
	420885	codificante	4
	420886	codificante	21
	420887	codificante	39
10	420888	codificante	37
	420889	codificante	9
	420890	codificante	27
	420891	codificante	39
	420892	codificante	43
15	420893	codificante	39
	420894	codificante	0
	420895	codificante	0
	420896	codificante	24
	420897	codificante	31
20	420898	codificante-	0
	420899	codón de terminación -3'UTR	41
	420900	codón de terminación -3'UTR	26
	420901	codón de terminación -3'UTR	28
25	420902	codón de terminación -3'UTR	20
	420903	codón de terminación -3'UTR	20
	420904	codón de terminación -3'UTR	22
	420905	codón de terminación -3'UTR	32
	420906	codón de terminación -3'UTR	13
30	420907	-codón de terminación -3'UTR	0
	420908	codón de terminación -3'UTR	45
	420909	3'UTR	41
	420910	3'UTR	14
	420911	3'UTR	45
35	420912	3'UTR	62
	420913	3'UTR	81
	420914	3'UTR	68
	420915	3'UTR	71
	420916	3'UTR	54
40	420917	3'UTR	50
	420918	3'UTR	43
	420919	3'UTR	65
	420920	3'UTR	61
45	420921	3'UTR	65
	420922	3'UTR	68
	420923	3'UTR	62
	420924	3'UTR	9
	420925	3'UTR	17
50	420926	3'UTR	47
	420927	3'UTR	57
	420928	3'UTR	51
	420929	3'UTR	46
	420930	3'UTR	39
55	420931	3'UTR	14
	420932	3'UTR	6
	420933	3'UTR	1
	420934	3'UTR	48
	420935	3'UTR	13
60	420936	3'UTR	62
	420937	3'UTR	65
	420938	3'UTR	48
	420939	3'UTR	7
65	420940	3'UTR	3

ES 2 625 689 T3

	420941	3'UTR	31
	420942	3'UTR	0
5	420943	3'UTR	40
	420944	3'UTR	78
	420945	3'UTR	58
	420946	3'UTR	52
	420947	3'UTR	71
10	420948	3'UTR	73
	420949	3'UTR	88
	420950	3'UTR	82
	420951	3'UTR	90
15	420952	3'UTR	82
	420953	3'UTR	71
	420954	3'UTR	67
	420955	3'UTR	73
	420956	3'UTR	65
20	420957	3'UTR	74
	420958	3'UTR	69
	420959	3'UTR	63
	420960	exón1-intrón1	14
	420961	intrón 1	16
25	420962	intrón 1	0
	420963	intrón 1	0
	420964	intrón 1	14
	420965	intrón 1	23
30	420966	intrón 1	25
	420967	intrón 1	12
	420968	intrón 1	0
	420969	intrón 1	0
	420970	intrón 2	25
35	420971	intrón 2	0
	420972	intrón 2	25
	420973	intrón 2	7
	420974	intrón 2	28
	420975	intrón 2	9
40	420976	intrón 2	21
	420977	intrón 2	14
	420978	intrón 2	37
	420979	intrón 2	37
	420980	intrón 2-exón 3	16
45	420981	intrón 3	0
	420982	intrón 3	28
	420983	intrón 3	0
	420984	intrón 3	0
50	420985	intrón 3	0
	420986	intrón 3	7
	420987	intrón 3	0
	420988	intrón 3	0
	420989	intrón 3	0
55	420990	intrón 3	6
	420991	intrón 3	15
	420992	intrón 3	0
	420993	intrón 3	0
	420994	intrón 3	0
60	420995	intrón 3	10

Basándose en los resultados de inhibición utilizando el nuevo juego de cebador y sonda RTS3029, se seleccionaron para posteriores estudios los oligonucleótidos antisentido que presentaron una inhibición del ARNm de la transtiretina del 50% o más.

65

Ejemplo 2: Inhibición por antisentido de la transtiretina humana en células HepG2 por oligonucleótidos diseñados mediante micro-paseo

Se diseñaron *gapmers* adicionales basándose en los *gapmers* presentados en la Tabla 3 que demostraron una inhibición de al menos un 50%. Estos *gapmers* se diseñaron creando *gapmers* ligeramente desplazados cadena arriba y cadena abajo (es decir, "micro-paseo") con respecto a los *gapmers* originales de la Tabla 3. También se crearon *gapmers* con diversos motivos, por ejemplo, motivos MOE 5-10-5, MOE 3-14-3, MOE 2-13-5 y MOE 4-11-5. Estos *gapmers* se ensayaron *in vitro*. Se transfectaron células HepG2 cultivadas a una densidad de 10.000 células por pocillo utilizando el reactivo lipofectina con 50 nM de oligonucleótido antisentido. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de la transtiretina mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó el juego de cebador y sonda de ser humano RTS3029 para medir los niveles de ARNm de la transtiretina. Los niveles de ARNm de la transtiretina se ajustaron según el contenido total de ARN, medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la transtiretina, con respecto a las células testigo sin tratar. Los resultados se presentan en la Tabla 4.

Los oligonucleótidos antisentido híbridos de la Tabla 4 se diseñaron como *gapmers* MOE 5-10-5, MOE 3-14-3, MOE 2-13-5 o MOE 4-11-5. Los *gapmers* indicados con un asterisco (*) en la Tabla 4 son los *gapmers* originales a partir de los cuales se diseñaron los *gapmers*, ISIS 425650-425763, mediante micro-paseo. Los *gapmers* 5-10-5 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento de separación central está compuesto por diez 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden cinco nucleótidos cada una. Los *gapmers* 3-14-3 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento de separación central está compuesto por catorce 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden tres nucleótidos cada una. Los *gapmers* 2-13-5 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento de separación central está compuesto por trece 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en las direcciones 5' y 3' con alas que comprenden dos y cinco nucleótidos respectivamente. Los *gapmers* 4-11-5 tienen una longitud de 20 nucleótidos, en los que el segmento de separación central está compuesto por once 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en las direcciones 5' y 3' con alas que comprenden cuatro y cinco nucleótidos respectivamente. Para cada uno de los motivos (5-10-5, 3-14-3, 2-13-5 y 4-11-5), cada nucleótido del segmento de ala 5' y cada nucleótido del segmento de ala 3' tiene una modificación 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada *gapmer* son enlaces fosforotioato (P=S). Todos los residuos de citidina a lo largo de cada *gapmer* son 5-metilcitidinas. "Sitio de inicio diana" indica el nucleótido más cercano al extremo 5' al que se dirige el *gapmer*. "Sitio de parada diana" indica el nucleótido más cercano al extremo 3' al que se dirige el *gapmer*. Cada *gapmer* que aparece en la Tabla 4 se dirige a la región diana que abarca las bases nitrogenadas 481-619 de la SEQ ID NO: 1 (nº de registro del GENBANK NM_000371.2).

Como se muestra en la Tabla 4, varios de los *gapmers* presentaron una inhibición de al menos un 50%, incluidos los números ISIS: 304296, 425655, 425695, 425735, 425649, 425656, 425696, 425736, 420912, 425657, 425697, 425737, 420913, 425658, 425698, 425738, 420914, 425659, 425699, 425739, 304299, 425660, 425700, 425740, 420915, 420916, 425662, 425702, 420919, 425703, 420920, 425664, 425704, 425742, 420921, 425665, 425705, 425743, 420922, 425666, 425706, 420923, 420937, 420944, 425669, 425709, 425746, 425710, 425711, 425747, 420948, 425712, 425748, 425673, 425713, 425749, 425651, 425675, 425715, 425751, 304309, 425676, 425716, 425752, 420949, 425677, 425717, 425753, 420950, 425678, 425718, 425754, 420951, 425679, 425719, 425755, 420952, 425680, 425720, 425756, 420953, 425681, 425721, 425757, 420954, 425722, 425758, 420955, 425759, 425724, 425760, 425762, 304310, 425729, 425764, 425653, 425690, 425730, 425765, 304311, 425691, 425731; 425766, 304312, 425692, 425732, 425767, 425654, 425693, 425733, 425768, 304313, 425734 y 425769.

Varios de los *gapmers* presentaron una inhibición de al menos un 60%, incluidos los números ISIS: 304296, 425655, 425695, 425735, 425649, 425656, 425696, 425736, 420912, 425657, 425697, 425737, 420913, 425658, 425698, 425738, 420914, 425659, 425739, 304299, 425740, 420915, 425702, 420919, 420920, 425742, 420921, 425665, 425705, 425706, 420923, 425746, 425711, 425747, 420948, 425712, 425748, 425651, 425715, 425751, 304309, 425716, 425752, 425677, 425717, 425753, 420950, 425718, 425754, 420951, 425679, 425719, 425755, 420952, 425680, 425720, 420953, 425681, 425721, 425757, 420954, 425722, 425758, 420955, 425724, 425760, 425764, 425653, 425690, 425730, 425765, 304311, 425691, 425731, 425766, 304312, 425692, 425732, 425767, 425654, 425693, 425733, 304313 y 425769.

Varios de los *gapmers* presentaron una inhibición de al menos un 70%, incluidos los números ISIS: 304296, 425655, 425695, 425735, 425649, 425656, 425696, 425736, 420912, 425657, 425737, 420913, 425738, 420914, 425659, 304299, 420915, 420920, 425742, 425712, 425748, 425716, 425754, 420951, 425679, 425719, 425755, 425680, 425721, 425757, 425760, 425653, 425690, 425730, 425765, 304311, 425691, 425731, 425766, 304312, 425767, 425693 y 304313.

Varios de los *gapmers* presentaron una inhibición de al menos un 80%, incluidos los números ISIS: 304296, 425655, 425695, 425736, 420913, 425659, 304299, 420915, 425716, 425754, 425719, 425757, 425765 y 425767.

Varios de los *gapmers* presentaron una inhibición de al menos un 85%, incluidos los números ISIS: 420913, 425716, 425754 y 425719.

Un *gapmer*, ISIS 425719, presentó una inhibición del 90%.

Tabla 4

Inhibición de los niveles de ARNm de la transtiretina humana por oligonucleótidos antisentido híbridos dirigidos a la SEQ ID NO: 1 (nº de registro del GENBANK NM_000371.2)						
OligoID	Sitio de inicio	Sitio de parada	Secuencia	Motivo	% de inhibición	SEQ ID NO
*304296	481	500	GTCCTTCAGGTCCACTGGAG	5-10-5	83	22
425655	481	500	GTCCTTCAGGTCCACTGGAG	3-14-3	80	22
425695	481	500	GTCCTTCAGGTCCACTGGAG	2-13-5	80	22
425735	481	500	GTCCTTCAGGTCCACTGGAG	4-11-5	72	22
425649	482	501	CGTCCTTCAGGTCCACTGGA	5-10-5	75	170
425656	482	501	CGTCCTTCAGGTCCACTGGA	3-14-3	78	170
425696	482	501	CGTCCTTCAGGTCCACTGGA	2-13-5	74	170
425736	482	501	CGTCCTTCAGGTCCACTGGA	4-11-5	83	170
*420912	504	523	GGTTACATGAAATCCCATCC	5-10-5	73	77
425657	504	523	GGTTACATGAAATCCCATCC	3-14-3	76	77
425697	504	523	GGTTACATGAAATCCCATCC	2-13-5	69	77
425737	504	523	GGTTACATGAAATCCCATCC	4-11-5	78	77
*420913	505	524	TGGTTACATGAAATCCCATC	5-10-5	89	78
425658	505	524	TGGTTACATGAAATCCCATC	3-14-3	69	78
425698	505	524	TGGTTACATGAAATCCCATC	2-13-5	61	78
425738	505	524	TGGTTACATGAAATCCCATC	4-11-5	78	78
*420914	506	525	TTGGTTACATGAAATCCCAT	5-10-5	70	79
425659	506	525	TTGGTTACATGAAATCCCAT	3-14-3	83	79
425699	506	525	TTGGTTACATGAAATCCCAT	2-13-5	56	79
425739	506	525	TTGGTTACATGAAATCCCAT	4-11-5	69	79
*304299	507	526	C TTGGTTACATGAAATCCCA	5-10-5	83	25
425660	507	526	C TTGGTTACATGAAATCCCA	3-14-3	59	25
425700	507	526	C TTGGTTACATGAAATCCCA	2-13-5	52	25
425740	507	526	C TTGGTTACATGAAATCCCA	4-11-5	69	25
*420915	508	527	TCTTGGTTACATGAAATCCC	5-10-5	81	80
425661	508	527	TCTTGGTTACATGAAATCCC	3-14-3	48	80
425701	508	527	TCTTGGTTACATGAAATCCC	2-13-5	41	80
425741	508	527	TCTTGGTTACATGAAATCCC	4-11-5	37	80
*420916	509	528	CTCTTGGTTACATGAAATCC	5-10-5	52	81
425662	509	528	CTCTTGGTTACATGAAATCC	3-14-3	57	81
425702	509	528	CTCTTGGTTACATGAAATCC	2-13-5	63	81
*420919	512	531	ATACTCTTGGTTACATGAAA	5-10-5	69	84
425663	512	531	ATACTCTTGGTTACATGAAA	3-14-3	46	84
425703	512	531	ATACTCTTGGTTACATGAAA	2-13-5	52	84
*420920	514	533	GAATACTCTTGGTTACATGA	5-10-5	71	85
425664	514	533	GAATACTCTTGGTTACATGA	3-14-3	57	85
425704	514	533	GAATACTCTTGGTTACATGA	2-13-5	58	85
425742	514	533	GAATACTCTTGGTTACATGA	4-11-5	71	85
*420921	515	534	GGAATACTCTTGGTTACATG	5-10-5	68	86
425665	515	534	GGAATACTCTTGGTTACATG	3-14-3	65	86
425705	515	534	GGAATACTCTTGGTTACATG	2-13-5	60	86
425743	515	534	GGAATACTCTTGGTTACATG	4-11-5	56	86
*420922	516	535	TGGAATACTCTTGGTTACAT	5-10-5	54	87
425666	516	535	TGGAATACTCTTGGTTACAT	3-14-3	56	87
425706	516	535	TGGAATACTCTTGGTTACAT	2-13-5	64	87
425744	516	535	TGGAATACTCTTGGTTACAT	4-11-5	39	87
*420923	517	536	ATGGAATACTCTTGGTTACA	5-10-5	62	88
425667	517	536	ATGGAATACTCTTGGTTACA	3-14-3	44	88
425707	517	536	ATGGAATACTCTTGGTTACA	2-13-5	30	88
*420937	533	552	CACTGCTTTAGTAAAAATGG	5-10-5	59	102
425668	533	552	CACTGCTTTAGTAAAAATGG	3-14-3	37	102
425708	533	552	CACTGCTTTAGTAAAAATGG	2-13-5	32	102
425745	533	552	CACTGCTTTAGTAAAAATGG	4-11-5	43	102
*420944	541	560	GGTGAAAACACTGCTTTAGT	5-10-5	52	109
425669	541	560	GGTGAAAACACTGCTTTAGT	3-14-3	54	109
425709	541	560	GGTGAAAACACTGCTTTAGT	2-13-5	54	109

ES 2 625 689 T3

	425746	541	560	GGTGAAAACACTGCTTTAGT	4-11-5	60	109
	*420945	542	561	AGGTGAAAACACTGCTTTAG	5-10-5	38	110
5	425670	542	561	AGGTGAAAACACTGCTTTAG	3-14-3	38	110
	425710	542	561	AGGTGAAAACACTGCTTTAG	2-13-5	52	110
	*420947	544	563	TGAGGTGAAAACACTGCTTT	5-10-5	34	112
	425671	544	563	TGAGGTGAAAACACTGCTTT	3-14-3	27	112
	425711	544	563	TGAGGTGAAAACACTGCTTT	2-13-5	68	112
10	425747	544	563	TGAGGTGAAAACACTGCTTT	4-11-5	61	112
	*420948	545	564	ATGAGGTGAAAACACTGCTT	5-10-5	66	113
	425672	545	564	ATGAGGTGAAAACACTGCTT	3-14-3	47	113
	425712	545	564	ATGAGGTGAAAACACTGCTT	2-13-5	70	113
	425748	545	564	ATGAGGTGAAAACACTGCTT	4-11-5	71	113
15	*304304	546	565	TATGAGGTGAAAACACTGCT	5-10-5	46	30
	425673	546	565	TATGAGGTGAAAACACTGCT	3-14-3	51	30
	425713	546	565	TATGAGGTGAAAACACTGCT	2-13-5	50	30
	425749	546	565	TATGAGGTGAAAACACTGCT	4-11-5	58	30
	425650	547	566	ATATGAGGTGAAAACACTGC	5-10-5	28	171
20	425674	547	566	ATATGAGGTGAAAACACTGC	3-14-3	40	171
	425714	547	566	ATATGAGGTGAAAACACTGC	2-13-5	44	171
	425750	547	566	ATATGAGGTGAAAACACTGC	4-11-5	47	171
	425651	577	596	TATTGTCTCTGCCTGGACTT	5-10-5	65	172
	425675	577	596	TATTGTCTCTGCCTGGACTT	3-14-3	55	172
25	425715	577	596	TATTGTCTCTGCCTGGACTT	2-13-5	65	172
	425751	577	596	TATTGTCTCTGCCTGGACTT	4-11-5	62	172
	*304309	578	597	TTATTGTCTCTGCCTGGACT	5-10-5	66	33
	425676	578	597	TTATTGTCTCTGCCTGGACT	3-14-3	59	33
30	425716	578	597	TTATTGTCTCTGCCTGGACT	2-13-5	87	33
	425752	578	597	TTATTGTCTCTGCCTGGACT	4-11-5	67	33
	*420949	579	598	TTTATTGTCTCTGCCTGGAC	5-10-5	57	114
	425677	579	598	TTTATTGTCTCTGCCTGGAC	3-14-3	67	114
	425717	579	598	TTTATTGTCTCTGCCTGGAC	2-13-5	68	114
35	425753	579	598	TTTATTGTCTCTGCCTGGAC	4-11-5	69	114
	*420950	580	599	TTTTATTGTCTCTGCCTGGA	5-10-5	61	115
	425678	580	599	TTTTATTGTCTCTGCCTGGA	3-14-3	59	115
	425718	580	599	TTTTATTGTCTCTGCCTGGA	2-13-5	69	115
	425754	580	599	TTTTATTGTCTCTGCCTGGA	4-11-5	86	115
40	*420951	581	600	GTTTTATTGTCTCTGCCTGG	5-10-5	78	116
	425679	581	600	GTTTTATTGTCTCTGCCTGG	3-14-3	73	116
	425719	581	600	GTTTTATTGTCTCTGCCTGG	2-13-5	90	116
	425755	581	600	GTTTTATTGTCTCTGCCTGG	4-11-5	73	116
45	*420952	582	601	TGTTTTATTGTCTCTGCCTG	5-10-5	61	117
	425680	582	601	TGTTTTATTGTCTCTGCCTG	3-14-3	77	117
	425720	582	601	TGTTTTATTGTCTCTGCCTG	2-13-5	67	117
	425756	582	601	TGTTTTATTGTCTCTGCCTG	4-11-5	57	117
	*420953	583	602	ATGTTTTATTGTCTCTGCCT	5-10-5	65	118
50	425681	583	602	ATGTTTTATTGTCTCTGCCT	3-14-3	61	118
	425721	583	602	ATGTTTTATTGTCTCTGCCT	2-13-5	77	118
	425757	583	602	ATGTTTTATTGTCTCTGCCT	4-11-5	83	118
	*420954	584	603	AATGTTTTATTGTCTCTGCC	5-10-5	63	119
	425682	584	603	AATGTTTTATTGTCTCTGCC	3-14-3	42	119
55	425722	584	603	AATGTTTTATTGTCTCTGCC	2-13-5	69	119
	425758	584	603	AATGTTTTATTGTCTCTGCC	4-11-5	61	119
	*420955	585	604	GAATGTTTTATTGTCTCTGC	5-10-5	65	120
	425683	585	604	GAATGTTTTATTGTCTCTGC	3-14-3	30	120
	425723	585	604	GAATGTTTTATTGTCTCTGC	2-13-5	44	120
60	425759	585	604	GAATGTTTTATTGTCTCTGC	4-11-5	50	120
	*420956	586	605	GGAATGTTTTATTGTCTCTG	5-10-5	47	121
	425684	586	605	GGAATGTTTTATTGTCTCTG	3-14-3	44	121
	425724	586	605	GGAATGTTTTATTGTCTCTG	2-13-5	65	121
65	*420957	587	606	AGGAATGTTTTATTGTCTCT	5-10-5	37	122
	425685	587	606	AGGAATGTTTTATTGTCTCT	3-14-3	46	122
	425725	587	606	AGGAATGTTTTATTGTCTCT	2-13-5	43	122

	425760	587	606	AGGAATGTTTTATTGTCTCT	4-11-5	78	122
	*420958	588	607	CAGGAATGTTTTATTGTCTC	5-10-5	41	123
5	425686	588	607	CAGGAATGTTTTATTGTCTC	3-14-3	6	123
	425726	588	607	CAGGAATGTTTTATTGTCTC	2-13-5	41	123
	425761	588	607	CAGGAATGTTTTATTGTCTC	4-11-5	39	123
	*420959	589	608	ACAGGAATGTTTTATTGTCT	5-10-5	43	124
	425687	589	608	ACAGGAATGTTTTATTGTCT	3-14-3	22	124
10	425727	589	608	ACAGGAATGTTTTATTGTCT	2-13-5	25	124
	425762	589	608	ACAGGAATGTTTTATTGTCT	4-11-5	57	124
	425652	590	609	CACAGGAATGTTTTATTGTC	5-10-5	23	173
	425688	590	609	CACAGGAATGTTTTATTGTC	3-14-3	11	173
	425728	590	609	CACAGGAATGTTTTATTGTC	2-13-5	37	173
15	425763	590	609	CACAGGAATGTTTTATTGTC	4-11-5	38	173
	304310	595	614	CCTTTCACAGGAATGTTTTA	5-10-5	57	174
	425689	595	614	CCTTTCACAGGAATGTTTTA	3-14-3	38	174
	425729	595	614	CCTTTCACAGGAATGTTTTA	2-13-5	58	174
	425764	595	614	CCTTTCACAGGAATGTTTTA	4-11-5	60	174
20	425653	596	615	GCCTTTCACAGGAATGTTTT	5-10-5	79	175
	425690	596	615	GCCTTTCACAGGAATGTTTT	3-14-3	73	175
	425730	596	615	GCCTTTCACAGGAATGTTTT	2-13-5	76	175
	425765	596	615	GCCTTTCACAGGAATGTTTT	4-11-5	83	175
25	*304311	597	616	TGCCTTTCACAGGAATGTTT	5-10-5	71	34
	425691	597	616	TGCCTTTCACAGGAATGTTT	3-14-3	74	34
	425731	597	616	TGCCTTTCACAGGAATGTTT	2-13-5	73	34
	425766	597	616	TGCCTTTCACAGGAATGTTT	4-11-5	79	34
30	*304312	598	617	GTGCCTTTCACAGGAATGTT	5-10-5	71	35
	425692	598	617	GTGCCTTTCACAGGAATGTT	3-14-3	69	35
	425732	598	617	GTGCCTTTCACAGGAATGTT	2-13-5	67	35
	425767	598	617	GTGCCTTTCACAGGAATGTT	4-11-5	83	35
	425654	599	618	AGTGCCTTTCACAGGAATGT	5-10-5	64	176
	425693	599	618	AGTGCCTTTCACAGGAATGT	3-14-3	79	176
35	425733	599	618	AGTGCCTTTCACAGGAATGT	2-13-5	68	176
	425768	599	618	AGTGCCTTTCACAGGAATGT	4-11-5	50	176
	304313	600	619	AAGTGCCTTTCACAGGAATG	5-10-5	73	177
	425694	600	619	AAGTGCCTTTCACAGGAATG	3-14-3	45	177
	425734	600	619	AAGTGCCTTTCACAGGAATG	2-13-5	55	177
40	425769	600	619	AAGTGCCTTTCACAGGAATG	4-11-5	62	177

Ejemplo 3: inhibición por antisentido dependiente de la dosis de la transtiretina humana en células HepG2

45 Los *gapmers* del Ejemplo 2 que presentaron una inhibición de la transtiretina humana *in vitro* significativa se ensayaron a diversas dosis en células HepG2. Las células se sembraron a una densidad de 20.000 células por pocillo y se transfectaron mediante electroporación con concentraciones 625 nM, 1.250 nM, 2.500 nM, 5.000 nM y 10.000 nM de oligonucleótido antisentido, tal como se especifica en la Tabla 5. Después de un período de
50 tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de la transtiretina mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó el juego de cebador y sonda para la transtiretina humana RTS3029 para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de la transtiretina se ajustaron según el contenido total de ARN, medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la transtiretina, con respecto a las células testigo sin tratar.

55 En la Tabla 5 también se presenta la mitad de la concentración inhibitoria máxima (CI₅₀) de cada oligonucleótido y se calculó representando gráficamente las concentraciones de oligonucleótidos utilizados frente al porcentaje de inhibición de la expresión del ARNm de la transtiretina alcanzado a cada concentración, y registrando la concentración de oligonucleótido a la que se alcanzaba una inhibición del 50% de la expresión del ARNm de la transtiretina en comparación con el testigo. Tal como se ilustra en la Tabla 5, los niveles de ARNm de la transtiretina
60 se redujeron significativamente de manera dependiente de la dosis en las células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

65

Tabla 5

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de la transtiretina humana en células HepG2 mediante electroporación						
ISIS NO	625 nM	1.250 nM	2.500 nM	5.000 nM	10.000 nM	CI ₅₀ (µM)
304296	57	74	83	91	96	<0,625
304299	43	76	82	95	94	0,627
420913	59	75	90	88	98	<0,625
420915	60	85	91	95	99	<0,625
420951	64	77	90	97	99	<0,625
425653	70	86	86	88	82	<0,625
425655	48	80	85	97	96	<0,625
425656	70	89	92	92	96	<0,625
425659	46	56	68	82	93	0,8
425679	63	77	72	94	97	<0,625
425680	28	79	85	93	98	0,8
425693	2	64	74	76	81	1,7
425695	74	87	91	97	98	<0,625
425716	69	84	95	97	98	<0,625
425719	58	84	92	96	98	<0,625
425721	40	75	89	95	98	0,7
425736	64	71	86	93	93	<0,625
425737	78	93	95	97	98	<0,625
425738	40	77	88	94	95	0,7
425754	56	75	87	96	99	<0,625
425755	58	84	88	94	97	<0,625
425757	62	82	94	97	99	<0,625
425760	58	42	74	85	93	<0,625
425765	81	86	87	83	88	<0,625
425766	83	89	81	75	74	<0,625
425767	56	75	83	81	80	<0,625

También se ensayaron los *gapmers* del Ejemplo 2 a diversas dosis en células HepG2 utilizando el reactivo de transfección, lipofectina. Las células se sembraron a una densidad de 10.000 células por pocillo y se transfectoron mediante electroporación con concentraciones 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM y 100 nM de oligonucleótido antisentido, tal como se especifica en la Tabla 6. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de la transtiretina mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó el juego de cebador y sonda para la transtiretina humana RTS3029 para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de la transtiretina se ajustaron según el contenido total de ARN, medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la transtiretina, con respecto a las células testigo sin tratar. Tal como se ilustra en la Tabla 6, los niveles de ARNm de la transtiretina se redujeron significativamente de manera dependiente de la dosis en las células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

Tabla 6

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de la transtiretina humana en células HepG2 utilizando el reactivo lipofectina						
ISIS NO	6,25 nM	12,5 nM	25 nM	50 nM	100 nM	CI ₅₀ (nM)
304296	26	41	43	52	65	39
304299	22	70	43	74	83	20
420913	4	60	60	68	82	30
420915	36	31	46	64	67	28
420951	10	37	56	85	84	19
425653	25	38	60	74	77	18
425655	27	15	62	79	81	16
425656	37	62	47	69	82	15
425659	17	35	33	79	73	30
425679	32	6	63	79	77	14
425680	16	48	41	84	84	28
425693	10	19	51	66	61	26
425695	36	23	54	76	84	28
425716	57	52	36	85	81	38
425719	25	39	28	60	76	45

425721	0	22	38	73	75	32
425736	25	60	30	77	80	22
425737	36	52	50	60	76	14
425738	13	15	19	65	70	27
425754	8	18	38	75	71	42
425755	26	46	54	77	86	20
425757	0	37	81	83	71	19
425760	28	46	72	70	80	18
425765	0	52	48	66	69	29
425766	24	19	48	69	71	29
425767	41	49	48	65	75	14

15 Ejemplo 4: inhibición por antisentido dependiente de la dosis de la transtiretina humana en células HepG2

Se ensayaron los *gapmers* seleccionados del Ejemplo 3 a diversas dosis en células HepG2. Las células se sembraron a una densidad de 20.000 células por pocillo y se transfectaron mediante electroporación con concentraciones 0,0617 μ M, 0,1852 μ M, 0,5556 μ M, 1,6667 μ M y 5 μ M de oligonucleótido antisentido, tal como se especifica en la Tabla 7. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de la transtiretina humana mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó el juego de cebador y sonda para la transtiretina humana RTS3029 para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de la transtiretina se ajustaron según el contenido total de ARN, medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la transtiretina, con respecto a las células testigo sin tratar. Tal como se ilustra en la Tabla 7, los niveles de ARNm de la transtiretina se redujeron de manera dependiente de la dosis en las células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

Tabla 7

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de la transtiretina humana en células HepG2 mediante electroporación						
ISIS NO	0,0617 μ M	0,1852 μ M	0,5556 μ M	1,6667 μ M	5 μ M	CI ₅₀ (μ M)
304296	0	6	44	58	83	1,2
304299	38	10	57	83	92	0,6
420913	51	51	54	73	93	0,2
420915	33	35	62	65	93	0,2
420951	40	33	36	82	96	0,4
425653	55	58	74	72	84	<0,06
425655	8	35	54	57	90	0,5
425656	12	43	43	78	94	0,4
425659	14	35	19	46	82	0,6
425679	30	13	23	69	91	0,8
425680	0	35	45	74	84	0,7
425693	0	6	14	32	59	3,4
425695	15	47	61	81	91	0,3
425716	20	17	53	77	91	0,6
425719	0	14	45	78	94	0,8
425721	0	0	22	74	84	0,9
425736	42	43	56	76	91	0,3
425737	21	29	61	81	97	0,3
425738	14	39	57	74	93	0,4
425754	29	34	45	78	94	0,4
425755	8	21	57	78	95	0,5
425757	29	28	62	83	95	0,4
425760	3	6	9	56	77	1,4
425765	24	51	75	77	88	0,3
425766	7	41	59	73	77	0,3
425767	1	18	49	66	79	1,0

Ejemplo 5: confirmación de respuesta a la dosis de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la transtiretina humana en células Hep3B

Los *gapmers* del Ejemplo 4 que presentaron una inhibición de la transtiretina humana *in vitro* significativa se ensayaron a diversas dosis en células Hep3B. Las células se sembraron a una densidad de 20.000 células por

pocillo y se transfectaron mediante electroporación con concentraciones 0,0206 μM , 0,062 μM , 0,185 μM , 0,556 μM , 1,667 μM y 5 μM de oligonucleótido antisentido, tal como se especifica en la Tabla 8. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de la transtiretina mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó el juego de cebador y sonda para la transtiretina humana RTS1396 para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de la transtiretina se ajustaron según el contenido total de ARN, medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la transtiretina, con respecto a las células testigo sin tratar. Tal como se ilustra en la Tabla 8, los niveles de ARNm de la transtiretina se redujeron de manera dependiente de la dosis en las células tratadas con oligonucleótidos antisentido. En la Tabla 8 también se presenta la CI_{50} de cada oligonucleótido.

Tabla 8

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de la transtiretina humana en células Hep3B mediante electroporación							
ISIS NO	0,0206 μM	0,062 μM	0,185 μM	0,556 μM	1,667 μM	5 μM	CI_{50} (μM)
304299	27	2	25	52	76	96	0,5
420915	0	12	27	30	69	93	0,8
425653	23	13	55	86	88	91	0,1
425655	3	30	32	62	84	94	0,3
425656	0	0	29	66	82	95	0,5
425679	0	21	36	71	92	97	0,3
425695	37	23	63	79	94	98	0,1
425736	31	43	40	64	82	95	0,1
425737	0	13	62	82	95	98	0,2
425755	17	8	18	69	86	98	0,4
425757	22	47	53	79	96	98	0,2

Ejemplo 6: confirmación de respuesta a la dosis de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la transtiretina humana en hepatocitos primarios de ratón transgénico para la transtiretina humana

También se ensayaron los *gapmers* del Ejemplo 5 a diversas dosis en hepatocitos primarios de ratones transgénicos para la transtiretina humana. También se ensayaron de nuevo ISIS 304309, ISIS 304311, ISIS 304312 e ISIS 420951 (véase el Ejemplo 2) junto con estos *gapmers* en las mismas condiciones de cultivo. Las células se sembraron a una densidad de 10.000 células por pocillo y se transfectaron utilizando citofectina con concentraciones 18,75 nM, 37,5 nM, 75 nM y 300 nM de oligonucleótido antisentido, tal como se especifica en la Tabla 9. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de la transtiretina mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó el juego de cebador y sonda para la transtiretina humana RTS1396 para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de la transtiretina se ajustaron según el contenido total de ARN, medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la transtiretina, con respecto a las células testigo sin tratar. Tal como se ilustra en la Tabla 9, los niveles de ARNm de la transtiretina se redujeron de manera dependiente de la dosis en las células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

Tabla 9

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de la transtiretina humana en hepatocitos primarios de ratón utilizando citofectina						
ISIS NO	18,75 nM	37,5 nM	75 nM	150 nM	300 nM	Motivo
304299	54	79	97	98	99	5-10-5
304309	48	77	94	99	99	5-10-5
304311	45	79	92	96	98	5-10-5
304312	33	71	89	96	98	5-10-5
420915	40	70	92	98	99	5-10-5
420951	41	86	96	98	99	5-10-5
425653	44	81	93	96	99	5-10-5
425655	61	88	96	99	99	3-14-3
425656	61	84	94	98	99	3-14-3
425679	74	78	97	98	99	3-14-3
425695	66	84	96	98	99	2-13-5
425736	58	84	95	98	99	4-11-5
425737	57	77	95	98	99	4-11-5
425755	61	82	96	99	99	4-11-5
425757	37	77	93	98	98	4-11-5

Ejemplo 7: confirmación de respuesta a la dosis de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la transtiretina humana en células HepG2

Se ensayaron los *gapmers* del Ejemplo 6 a diversas dosis en células HepG2. Las células se sembraron a una densidad de 10.000 células por pocillo y se transfectaron mediante electroporación con concentraciones 0,062 µM, 0,185 µM, 0,556 µM, 1,66 µM y 5,000 µM de oligonucleótido antisentido, tal como se especifica en la Tabla 10. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de la transtiretina mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó el juego de cebador y sonda para la transtiretina humana RTS1396 para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de la transtiretina se ajustaron según el contenido total de ARN, medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la transtiretina, con respecto a las células testigo sin tratar. Tal como se ilustra en la Tabla 10, los niveles de ARNm de la transtiretina se redujeron de manera dependiente de la dosis en las células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

Tabla 10

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de la transtiretina humana en células HepG2 mediante electroporación							
ISIS NO	0,062 µM	0,185 µM	0,556 µM	1,667 µM	5,000 µM	CI ₅₀ (µM)	Motivo
304299	55	66	72	87	96	0,037	5-10-5
304309	41	65	72	91	96	0,087	5-10-5
304311	57	83	88	89	83	0,001	5-10-5
304312	46	69	74	84	81	0,038	5-10-5
420915	38	62	80	90	98	0,096	5-10-5
420951	45	71	84	93	97	0,049	5-10-5
425653	48	73	87	88	82	0,017	5-10-5
425655	40	57	77	85	95	0,105	3-14-3
425656	28	54	70	94	97	0,177	3-14-3
425679	43	51	81	95	99	0,106	3-14-3
425695	49	67	90	96	99	0,043	2-13-5
425736	32	63	85	95	98	0,108	4-11-5
425737	42	71	90	98	99	0,053	4-11-5
425755	24	63	85	95	99	0,137	4-11-5
425757	21	62	86	96	99	0,148	4-11-5

Ejemplo 8: confirmación de respuesta a la dosis de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la transtiretina humana en hepatocitos primarios de ratón transgénico para la transtiretina humana

También se ensayaron los *gapmers* del Ejemplo 6 a diversas dosis en hepatocitos primarios de ratones transgénicos para la transtiretina humana. Las células se sembraron a una densidad de 10.000 células por pocillo y se transfectaron utilizando citofectina con concentraciones 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM y 80 nM de oligonucleótido antisentido, tal como se especifica en la Tabla 11. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de la transtiretina mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó el juego de cebador y sonda para la transtiretina humana RTS3029 para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de la transtiretina se ajustaron según el contenido total de ARN, medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la transtiretina, con respecto a las células testigo sin tratar. Tal como se ilustra en la Tabla 11, los niveles de ARNm de la transtiretina se redujeron de manera dependiente de la dosis en las células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

Tabla 11

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de la transtiretina humana en hepatocitos primarios de ratón utilizando citofectina						
ISIS NO	5 nM	10 nM	10 nM	40 nM	80 nM	Motivo
304299	0	8	37	69	90	5-10-5
304309	0	9	39	75	93	5-10-5
304311	1	13	43	70	81	5-10-5
304312	0	3	32	64	76	5-10-5
420915	0	0	34	59	87	5-10-5
420951	0	12	57	84	92	5-10-5
425653	0	9	44	72	84	5-10-5
425655	0	19	45	80	91	3-14-3
425656	0	2	33	70	93	3-14-3

425679	0	13	42	72	90	3-14-3
425695	3	12	33	70	90	2-13-5
425736	2	7	37	70	89	4-11-5
425737	0	4	36	65	89	4-11-5
425755	0	25	50	75	94	4-11-5
425757	0	5	43	72	92	4-11-5

También se ensayaron los *gapmers* utilizando la electroporación como agente de transfección. Las células se sembraron a una densidad de 35.000 células por pocillo y se transfectaron mediante electroporación con concentraciones 148,148 nM, 444,444 nM, 1.333,333 nM, 4.000 nM y 12.000 nM de oligonucleótido antisentido, tal como se especifica en la Tabla 12. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de la transtiretina mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó el juego de cebador y sonda para la transtiretina humana RTS3029 para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de la transtiretina se ajustaron según el contenido total de ARN, medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la transtiretina, con respecto a las células testigo sin tratar.

Tabla 12

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de la transtiretina humana en hepatocitos primarios de ratón mediante electroporación						
ISIS NO	148,148 nM	444,444 nM	1.333,333 nM	4.000 nM	12.000 nM	Motivo
304299	75	96	98	98	99	5-10-5
304309	72	96	98	98	98	5-10-5
304311	68	92	93	94	97	5-10-5
304312	50	84	92	93	97	5-10-5
420915	55	89	96	96	97	5-10-5
420951	65	92	95	96	98	5-10-5
425653	68	89	91	93	95	5-10-5
425655	63	94	96	96	96	3-14-3
425656	69	93	98	98	98	3-14-3
425679	63	92	97	98	98	3-14-3
425695	69	92	96	96	95	2-13-5
425736	75	93	96	96	96	4-11-5
425737	71	94	96	96	95	4-11-5
425755	70	93	95	95	95	4-11-5
425757	61	91	95	95	95	4-11-5

Ejemplo 9: confirmación de respuesta a la dosis de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la transtiretina humana en hepatocitos primarios de mono Cynomolgus

También se ensayaron los *gapmers* del Ejemplo 6 a diversas dosis en hepatocitos primarios de monos Cynomolgus. Las células se sembraron a una densidad de 35.000 células por pocillo y se transfectaron mediante electroporación con concentraciones 1.250 nM, 2.500 nM, 5.000 nM, 10.000 nM y 20.000 nM de oligonucleótido antisentido, tal como se especifica en la Tabla 13. Después de un periodo de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de la transtiretina mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó el juego de cebador y sonda para la transtiretina humana RTS1396 para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de la transtiretina se ajustaron según el contenido total de ARN, medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la transtiretina, con respecto a las células testigo sin tratar. Tal como se ilustra en la Tabla 13, los niveles de ARNm de la transtiretina se redujeron de manera dependiente de la dosis en los hepatocitos tratados con los oligonucleótidos ISIS.

En ausencia de una secuencia génica completa de mono Cynomolgus en la base de datos del NCBI, los oligonucleótidos se ensayaron para determinar la reactividad cruzada frente a la secuencia del gen de mono rhesus, ya que las dos especies son del mismo género, "Macaca". Los oligonucleótidos humanos presentan reactividad cruzada con el gen de la transtiretina de mono rhesus, indicado en el presente documento como SEQ ID NO: 4 (exones 1-4 extraídos del n° de registro del GENBANK NW_001105671.1). "Desapareamientos" indica el número de desapareamientos entre el oligonucleótido humano y el gen de la transtiretina de mono rhesus. "N/a" indica que el oligonucleótido humano tiene más de 3 desapareamientos con el gen de la transtiretina de mono rhesus y, por lo tanto, no presenta reactividad cruzada con él.

Tabla 13

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de la transtiretina humana en hepatocitos primarios de mono rhesus mediante electroporación									
ISIS NO	1.250 nM	2.500 nM	5.000 nM	10.000 nM	2.0000 nM	Cl ₅₀ (μM)	Sitio de inicio diana de mono rhesus	Sitio de parada diana de mono rhesus	Desapareamientos
304299	21	45	69	80	95	3,1	504	523	0
304309	53	66	79	85	93	<1,25	575	594	0
304311	75	78	82	86	90	<1,25	594	613	0
304312	37	53	65	75	80	2,3	595	614	0
420915	59	54	77	87	94	<1,25	505	524	0
420951	67	77	91	93	96	<1,25	578	597	0
425653	56	72	84	83	85	<1,25	593	612	0
425655	0	7	0	21	45	>20	478	497	2
425656	41	20	38	53	51	8,7	479	498	2
425679	68	74	88	94	98	<1,25	578	597	0
425695	42	29	41	49	65	25,8	478	497	2
425736	36	27	37	49	74	8,2	479	498	2
425737	76	78	89	95	97	<1,25	501	520	0
425755	79	80	92	94	97	<1,25	578	597	0
425757	68	74	88	95	96	<1,25	580	599	0

Ejemplo 10: inhibición *in vivo* de la transtiretina humana en ratones transgénicos para la transtiretina humana

Los *gapmers* del Ejemplo 6 que demostraron una inhibición significativa del ARNm de la transtiretina se ensayaron en ratones transgénicos que contenían el gen de la transtiretina humana y se evaluó la eficacia de los *gapmers*.

Tratamiento

A quince grupos de cuatro ratones hembra transgénicos para hTTR cada uno, se les administraron por vía subcutánea, dos veces a la semana, durante cuatro semanas, 25 mg/kg de ISIS 304299, ISIS 304309, ISIS 304311, ISIS 304312, ISIS 420915, ISIS 420951, ISIS 425653, ISIS 425655, ISIS 425656, ISIS 425679, ISIS 425695, ISIS 425736, ISIS 425737, ISIS 425755 o ISIS 425757. A otro grupo de cuatro ratones hembra transgénicos para hTTR se le inocularon 25 mg/kg de oligonucleótido testigo ISIS 141923 (CCTTCCCTGAAGGTTCTCC, indicado en el presente documento como SEQ ID NO: 165) dos veces a la semana, durante cuatro semanas. A otro grupo de cuatro ratones hembra transgénicos para hTTR se le inyectó por vía subcutánea PBS, dos veces a la semana, durante cuatro semanas. Los ratones a los que se inyectó PBS hicieron de grupo testigo. Se recogieron muestras de sangre de todos los grupos las semanas 0, 1, 2, 3 y 4 para el análisis del nivel plasmático de transtiretina. Se sacrificó a los ratones dos días después de la última dosis, y se recolectaron los hígados para el análisis del ARNm diana.

Análisis de ARN

Se extrajo el ARN del tejido hepático para el análisis PCR en tiempo real de la transtiretina utilizando el juego de cebador y sonda RTS3029. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la transtiretina humana, con respecto al testigo con PBS. Tal como se muestra en la Tabla 14, el tratamiento con los oligonucleótidos antisentido ISIS dio como resultado una reducción significativa del ARNm de la transtiretina humana en comparación con el testigo con PBS. El tratamiento con el oligonucleótido testigo, ISIS 141923 no dio como resultado una reducción significativa de la transtiretina, como era de esperar.

Tabla 14

Inhibición del ARNm de la transtiretina humana en el hígado de ratones transgénicos para hTTR en relación con el testigo con PBS	
ISIS NO	% de inhibición
304299	79
304309	83
304311	63
304312	64
420915	82
420951	92

5	425653	66
	425655	76
	425656	76
	425679	93
	425695	82
	425736	63
10	425737	76
	425755	91
	425757	91
	141923	28

Análisis de proteínas

15 Se midieron los niveles proteicos de transtiretina humana en el plasma de ratones transgénicos mediante ELISA utilizando un anticuerpo policlonal contra la transtiretina (Abcam Ab37774) y un anticuerpo de detección de oveja contra TTR marcado con peroxidasa de rábano picante (Abcam, nº de cat. 35217). La reacción coloreada se desarrolló con el kit de sustrato TMB ImmunoPure® y se midió la absorbancia a 450 nm con un espectrofotómetro para placas de microtitulación. Las muestras de plasma se tomaron predosis y los días 7, 14 y 28. Los resultados se presentan en la Tabla 15, expresados como porcentaje de inhibición en comparación con los niveles predosis, y demuestran una reducción dependiente del tiempo de los niveles de proteína con el tratamiento con los oligonucleótidos ISIS.

Tabla 15

Inhibición de la proteína transtiretina humana en el plasma de ratones transgénicos para hTTR con respecto a los niveles predosis										
	PBS	ISIS 304299	ISIS 304309	ISIS 420915	ISIS 420951	ISIS 425679	ISIS 425695	ISIS 425755	ISIS 141923	
30	Día 7	0	50	63	71	92	99	69	57	3
	Día 14	3	76	78	90	98	100	80	72	3
	Día 21	20	88	81	95	100	99	88	78	13
	Día 28	13	89	83	98	100	100	91	79	8

Peso corporal y peso de los órganos

35 Los pesos corporales de los ratones se midieron predosis y al final del período de tratamiento. Los pesos corporales se presentan en la Tabla 16 y se expresan como aumento porcentual frente al peso del testigo con PBS anotado antes del inicio del tratamiento. Los pesos del hígado, bazo y riñón se midieron al final del estudio, y también se presentan en la Tabla 16 como un cambio porcentual frente a los pesos de los órganos respectivos del testigo con PBS. Tal como se muestra en la Tabla 16, no hubo cambio significativo en los pesos corporales o de los órganos como resultado de un tratamiento con oligonucleótidos antisentido.

Tabla 16

Cambio porcentual de los pesos corporales y de los órganos de los ratones transgénicos después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido					
	Peso corporal	Hígado	Bazo	Riñón	
50	PBS	1,1	1,0	1,0	1,0
	ISIS 304299	1,1	1,1	1,0	0,8
	ISIS 304309	1,1	1,1	1,0	1,0
	ISIS 304311	1,1	1,2	1,0	1,2
	ISIS 304312	1,1	1,3	1,0	0,8
55	ISIS 420915	1,1	1,1	1,0	1,1
	ISIS 420951	1,1	1,2	1,0	1,5
	ISIS 425653	1,1	1,1	0,9	1,0
	ISIS 425655	1,1	1,3	1,0	1,2
	ISIS 425656	1,2	1,3	1,0	1,3
60	ISIS 425679	1,2	1,2	1,0	1,6
	ISIS 425695	1,1	1,3	1,0	1,0
	ISIS 425736	1,2	1,2	1,0	1,0
	ISIS 425737	1,1	1,2	1,1	1,2
65	ISIS 425755	1,2	1,3	1,1	1,3

ISIS 425757	1,1	1,9	1,0	1,5
ISIS 141923	1,1	1,1	1,0	0,8

5

Función hepática

10 Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de aminotransferasas con un analizador automatizado de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron las concentraciones plasmáticas de ALT (alanina aminotransferasa) y AST (aspartato aminotransferasa) y los resultados se presentan en la Tabla 17, expresados en IU/l. También se midieron los niveles plasmáticos de bilirrubina con el mismo analizador de química clínica; los resultados también se presentan en la Tabla 17 y se expresan en mg/dl.

15

Tabla 17

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores metabólicos en el hígado de ratones transgénicos			
	ALT (IU/l)	AST (IU/l)	Bilirrubina (mg/dl)
PBS	31	78	0,23
ISIS 304299	40	121	0,19
ISIS 304309	38	119	0,20
ISIS 304311	34	60	0,16
ISIS 304312	43	67	0,17
ISIS 420915	34	75	0,26
ISIS 420951	75	124	0,17
ISIS 425653	35	78	0,20
ISIS 425655	131	109	0,16
ISIS 425656	68	110	0,19
ISIS 425679	119	180	0,20
ISIS 425695	43	69	0,15
ISIS 425736	23	58	0,16
ISIS 425737	35	64	0,19
ISIS 425755	109	162	0,16
ISIS 425757	1904	937	0,24
ISIS 141923	31	76	0,19

20

25

30

35

40

Función renal

45 Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico en sangre (BUN) con un analizador automatizado de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 18, expresados en mg/dl. Los datos indican que la Inhibición por antisentido de la transtiretina no tiene efecto sobre los niveles de BUN en estos ratones transgénicos.

50

Tabla 18

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el BUN (mg/dl) en el riñón de ratones transgénicos	
	BUN (mg/dl)
PBS	26
ISIS 304299	24
ISIS 304309	29
ISIS 304311	28
ISIS 304312	26
ISIS 420915	25
ISIS 420951	25
ISIS 425653	24
ISIS 425655	28
ISIS 425656	25
ISIS 425679	26
ISIS 425695	28
ISIS 425736	25
ISIS 425737	23

55

60

65

ISIS 425755	24
ISIS 425757	25
ISIS 141923	23

Ejemplo 11: tolerabilidad de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la transtiretina humana en ratones CD1

Los ratones CD1® (Charles River, MA) son un modelo polivalente de ratones, frecuentemente utilizado para los ensayos de seguridad y eficacia. Se trató a los ratones con los oligonucleótidos antisentido ISIS seleccionados a partir de los estudios descritos en el Ejemplo 10 y se evaluaron para determinar los cambios en los niveles de diversos marcadores metabólicos.

Tratamiento

Se inyectaron a grupos de ocho ratones CD1 cada uno, por vía subcutánea dos veces a la semana, 50 mg/kg de ISIS 304299, ISIS 304309, ISIS 420915, ISIS 420951, ISIS 425655, ISIS 425656, ISIS 425679, ISIS 425695, ISIS 425736, ISIS 425737 e ISIS 425755. Se evaluó a cuatro ratones de cada grupo la semana 2 y la semana 6 del periodo de tratamiento. Tres días después de la última dosis en cada instante de tiempo, se anotaron los pesos corporales, se sacrificó a los ratones, y se recolectaron los órganos y el plasma para su posterior análisis.

Pesos corporales y de los órganos

Los pesos corporales de los ratones se midieron predosis y al final de cada período de tratamiento (dos semanas y seis semanas). Los pesos corporales se presentan en las Tablas 19 y 20, y se expresan como aumento porcentual frente al peso del testigo con PBS anotado antes del inicio del tratamiento. Los pesos del hígado, bazo y riñón se midieron al final del estudio, y también se presentan en las Tablas 19 y 20 como un cambio porcentual frente a los pesos de los órganos respectivos del testigo con PBS.

Tabla 19

Cambio en los pesos corporales y de los órganos de los ratones CD1 después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido (%) la semana 2				
	Peso corporal	Hígado	Bazo	Riñón
PBS	1,1	1,0	1,0	1,0
ISIS 304299	1,1	1,1	1,1	1,1
ISIS 304309	1,1	1,1	1,1	1,0
ISIS 420915	1,1	1,1	1,1	1,0
ISIS 420951	1,1	1,3	1,7	1,2
ISIS 425655	1,1	1,2	1,2	0,9
ISIS 425656	1,1	1,1	1,1	1,0
ISIS 425679	1,1	1,1	1,4	1,1
ISIS 425695	1,1	1,1	0,9	1,1
ISIS 425736	1,1	1,1	1,0	1,1
ISIS 425737	1,2	1,1	1,1	1,1
ISIS 425755	1,2	1,2	1,3	1,2

Tabla 20

Cambio en los pesos corporales y de los órganos de los ratones CD1 después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido (%) la semana 6				
	Peso corporal	Hígado	Bazo	Riñón
PBS	1,2	1,0	1,0	1,0
ISIS 304299	1,3	1,2	1,4	1,0
ISIS 304309	1,3	1,3	2,0	1,0
ISIS 420915	1,3	1,1	1,5	0,9
ISIS 420951	1,3	1,3	2,0	1,1
ISIS 425655	1,4	1,3	1,7	0,9
ISIS 425656	1,3	1,3	1,1	1,0
ISIS 425679	1,3	1,4	2,3	1,2
ISIS 425695	1,3	1,4	1,5	1,0
ISIS 425736	1,3	1,1	1,2	0,9

ISIS 425737	1,2	1,1	1,3	1,0
ISIS 425755	1,3	1,3	2,1	1,0

5

Función hepática

10 Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de aminotransferasas con un analizador automatizado de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron las concentraciones plasmáticas de ALT (alanina aminotransferasa) y AST (aspartato aminotransferasa) y los resultados se presentan en las Tablas 21 y 22, expresados en IU/l. Los niveles plasmáticos de bilirrubina y albúmina también se midieron con el mismo analizador de química clínica y los resultados también se presentan en las Tablas 21 y 22.

15

Tabla 21

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores metabólicos en el hígado de ratones CD1 la semana 2				
	ALT (IU/l)	AST (IU/l)	Bilirrubina (mg/dl)	Albúmina (g/dl)
PBS	38	66	0,19	5,0
ISIS 304299	42	79	0,33	3,8
ISIS 304309	52	77	0,22	3,2
ISIS 420915	32	61	0,28	3,5
ISIS 420951	1184	804	0,17	3,7
ISIS 425655	60	70	0,20	3,9
ISIS 425656	37	53	0,31	3,5
ISIS 425679	88	147	0,23	3,7
ISIS 425695	25	50	0,23	3,6
ISIS 425736	31	79	0,23	3,2
ISIS 425737	39	43	0,23	3,1
ISIS 425755	104	85	0,29	3,6

20

25

30

35

Tabla 22

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores metabólicos en el hígado de ratones CD1 la semana 6				
	ALT (IU/l)	AST (IU/l)	Bilirrubina (mg/dl)	Albúmina (g/dl)
PBS	31	67	0,20	5,6
ISIS 304299	54	71	0,20	5,2
ISIS 304309	1211	504	0,30	5,2
ISIS 420915	89	91	0,17	5,0
ISIS 420951	872	319	0,20	3,6
ISIS 425655	730	247	0,13	4,3
ISIS 425656	502	261	0,17	4,3
ISIS 425679	935	475	0,29	4,5
ISIS 425695	1627	563	0,16	4,0
ISIS 425736	41	47	0,15	4,1
ISIS 425737	32	55	0,16	4,1
ISIS 425755	233	176	0,16	4,3

40

45

50

Función renal

55 Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina con un analizador automatizado de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en las Tablas 23 y 24, expresados en mg/dl.

Tabla 23

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores metabólicos (mg/dl) en el riñón de ratones CD1 la semana 2		
	BUN	Creatinina
PBS	32	0,23
ISIS 304299	26	0,21
ISIS 304309	30	0,19
ISIS 420915	30	0,22

60

65

5	ISIS 420951	24	0,17
	ISIS 425655	29	0,22
	ISIS 425656	25	0,19
	ISIS 425679	28	0,19
	ISIS 425695	29	0,19
	ISIS 425736	24	0,19
10	ISIS 425737	24	0,16
	ISIS 425755	27	0,17

Tabla 24

15	Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores metabólicos (mg/dl) en el riñón de ratones CD1 la semana 6		
	PBS	BUN	Creatinina
20	ISIS 304299	19	0,11
	ISIS 304309	20	0,14
	ISIS 420915	24	0,18
	ISIS 420951	19	0,08
25	ISIS 425655	22	0,11
	ISIS 425656	21	0,10
	ISIS 425679	20	0,06
	ISIS 425695	21	0,08
	ISIS 425736	22	0,07
30	ISIS 425737	18	0,07
	ISIS 425755	22	0,09

Ensayos hematológicos

35 La sangre obtenida de todos los grupos de ratones se envió a Antech Diagnostics para las mediciones y los análisis del hematocrito (HCT), el volumen corpuscular medio (MCV), la hemoglobina corpuscular media (MCH), y la concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), así como las mediciones de los recuentos sanguíneos diferenciales, tales como los de WBC (neutrófilos, linfocitos y monocitos), RBC y plaquetas, y el contenido total de hemoglobina. Los resultados se presentan en las Tablas 25-28. Los porcentajes proporcionados en las tablas indican el cambio porcentual en el recuento sanguíneo completo en comparación con el testigo con PBS. Se seleccionaron para posteriores estudios aquellos oligonucleótidos antisentido que no ocasionaban una disminución en el recuento de plaquetas inferior a un 70% del testigo con PBS o un aumento en el recuento de monocitos superior a dos veces.

45

Tabla 25

50	Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento sanguíneo completo (%) en comparación con el testigo con PBS en ratones CD1 la semana 2							
	ISIS NO.	WBC	RBC	Hemoglobina	HCT	MCV	MCH	MCHC
	304299	-15	-3	-2	0	+3	+1	-1
	304309	-13	-4	-7	-6	-2	-4	-2
55	420915	+7	-7	-7	-5	+2	+1	-2
	420951	+79	-6	-5	-5	+1	+1	0
	425655	+56	-3	-5	-4	-1	-2	-1
	425656	+69	-5	-6	-5	0	-1	-2
	425679	+30	-6	-7	-7	-1	-1	0
	425695	+49	-3	-4	-4	0	0	+1
60	425736	+15	-6	-6	-4	+1	0	-2
	425737	+19	-5	-7	-5	-1	-3	-2
	425755	+85	-3	-6	-6	-4	-3	0

65

Tabla 26

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento sanguíneo completo (%) en comparación con el testigo con PBS en ratones CD1 la semana 6							
ISIS NO.	WBC	RBC	Hemoglobina	HCT	MCV	MCH	MCHC
304299	-7	-9	-10	-13	-5	0	+4
304309	+10	-12	-11	-15	-5	+1	+6
420915	+11	-7	-8	-10	-4	-2	+2
420951	+81	-12	-20	-19	-9	-9	-1
425655	+29	-3	-11	-10	-8	-9	-2
425656	+72	-1	-5	-6	-4	-5	-1
425679	+154	-11	-20	-21	-10	-9	+2
425695	+118	+3	-9	-9	-2	-12	+3
425736	+51	+4	-5	-7	0	-10	+1
425737	+30	+8	-1	-2	0	-8	+1
425755	+54	-1	-11	-12	-8	-10	0

Tabla 27

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento sanguíneo diferencial (%) en comparación con el testigo con PBS en ratones CD1 la semana 2				
ISIS NO.	Neutrófilos	Monocitos	Linfocitos	Plaquetas
304299	11	-3	20	17
304309	-11	5	8	14
420915	1	4	-24	41
420951	18	-7	32	-9
425655	18	-5	20	18
425656	31	-7	-4	24
425679	2	-1	24	-19
425695	-50	15	20	29
425736	8	-1	0	10
425737	-29	10	-8	24
425755	-13	7	-4	9

Tabla 28

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento sanguíneo diferencial (%) en comparación con el testigo con PBS en ratones CD1 la semana 6				
ISIS NO.	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos	Plaquetas
304299	-60	+26	+10	-16
304309	-28	+12	+30	+2
420915	-29	+6	+50	-30
420951	-26	+11	0	-40
425655	-16	+8	-10	-19
425656	-22	+16	-50	-25
425679	-36	+19	-20	-27
425695	-25	+9	-15	-49
425736	-41	+16	-5	-46
425737	-53	+23	-20	-65
425755	-20	+4	+25	-41

Ejemplo 12: medición de la semivida del oligonucleótido antisentido en el hígado de ratón CD1

Se trató a ratones CD1 con los oligonucleótidos antisentido ISIS de los estudios descritos en el Ejemplo 11 y se evaluó la semivida del oligonucleótido, así como el tiempo transcurrido para la degradación y la eliminación del oligonucleótido del hígado.

Tratamiento

Se inyectaron a grupos de doce ratones CD1 cada uno, por vía subcutánea dos veces por semana durante 2 semanas, 50 mg/kg de ISIS 304299, ISIS 304309, ISIS 420915, ISIS 420951, ISIS 425655, ISIS 425656, ISIS

425679, ISIS 425695, ISIS 425736, ISIS 425737 e ISIS 425755. Se sacrificó a cuatro ratones de cada grupo 3 días, 28 días y 56 días después de la dosis final. Los hígados se recolectaron para su análisis.

Medición de la concentración de oligonucleótido

Se midió la concentración del oligonucleótido de longitud completa, así como la concentración total de oligonucleótido (incluida la forma degradada). El método utilizado es una modificación de los métodos publicados anteriormente (Leeds *et al.*, 1996; Geary *et al.*, 1999) que consiste en una extracción con fenol-cloroformo (líquido-líquido) seguida de una extracción en fase sólida. Antes de la extracción se añadió un patrón interno (ISIS 355868, un oligonucleótido fosforotioato modificado 2'-O-metoxietilado 27-mero, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTT, indicado en el presente documento como SEQ ID NO: 166). Las concentraciones de la muestra de tejido se calcularon mediante curvas de calibración, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de aproximadamente 1,14 µg/g. A continuación, se calcularon las semividas mediante el software WinNonlin (PHARSIGHT).

Los resultados se presentan en las Tablas 29 y 30, expresados como µg/g de tejido hepático. En la Tabla 31 se presenta la semivida de cada oligonucleótido. Los oligonucleótidos antisentido con semividas entre los 11-34 días se eligieron para posteriores estudios.

Tabla 29

Concentración de oligonucleótido de longitud completa (µg/g) en el hígado de ratones CD1			
ISIS NO.	3 días	28 días	56 días
304299	180	56	8
304309	317	254	106
420915	248	126	34
420951	173	109	49
425655	191	113	33
425656	256	73	29
425679	201	73	27
425695	315	194	65
425736	219	110	47
425737	190	40	9
425755	211	120	47

Tabla 30

Concentración total de oligonucleótido (µg/g) en el hígado de ratones CD1			
ISIS NO.	3 días	28 días	56 días
304299	268	168	38
304309	389	354	152
420915	314	229	83
420951	262	196	131
425655	298	217	87
425656	328	135	85
425679	333	161	103
425695	364	263	143
425736	298	211	140
425737	266	117	31
425755	337	227	140

Tabla 31

Semivida del oligonucleótido (días) en el hígado de ratones CD1	
ISIS NO.	Semivida (días)
304299	12
304309	33
420915	19
420951	29
425655	21
425656	17
425679	18
425695	23
425736	24
425737	12
425755	24

Ejemplo 13: tolerabilidad de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la transtiretina humana en ratas Sprague-Dawley

Se trató a ratas Sprague-Dawley con los oligonucleótidos antisentido ISIS seleccionados a partir de los estudios descritos en los Ejemplos 11 y 12, y se evaluaron para determinar los cambios en los niveles de diversos marcadores metabólicos.

Tratamiento

Se evaluaron predosis los pesos corporales, el recuento sanguíneo completo y el recuento sanguíneo diferencial, así como la relación proteína/creatinina en orina de las ratas. Se inyectaron a grupos de cuatro ratas Sprague-Dawley cada uno, por vía subcutánea dos veces a la semana, 50 mg/kg de ISIS 304299, ISIS 304309, ISIS 420915, ISIS 420951, ISIS 425655, ISIS 425656, ISIS 425679, ISIS 425695, ISIS 425736, ISIS 425737 e ISIS 425755. Tres días después de la última dosis en cada instante de tiempo, se anotaron los pesos corporales, se sacrificó a las ratas, y se recolectaron los órganos y el plasma para su posterior análisis.

Pesos corporales y de los órganos

Los pesos corporales de las ratas se midieron predosis y al final del período de tratamiento. Los pesos corporales se presentan en la Tabla 32, y se expresan como aumento porcentual frente al peso del testigo con PBS anotado antes del inicio del tratamiento. Los pesos del hígado, bazo y riñón se midieron al final del estudio, y también se presentan en la Tabla 32 como un cambio porcentual frente a los pesos de los órganos respectivos del testigo con PBS.

Tabla 32

Cambio en los pesos corporales y de los órganos de ratas Sprague-Dawley después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido (%)				
	Peso corporal	Hígado	Bazo	Riñón
PBS	1,6	1,0	1,0	1,0
ISIS 304299	1,2	1,7	4,9	1,6
ISIS 304309	1,1	1,6	4,3	1,4
ISIS 420915	1,4	1,4	3,3	1,3
ISIS 420951	1,1	1,4	5,0	1,5
ISIS 425655	1,2	1,5	3,4	1,3
ISIS 425656	1,2	1,5	2,9	1,2
ISIS 425679	1,0	1,9	6,4	1,7
ISIS 425695	1,2	1,6	3,3	1,3
ISIS 425736	1,3	1,5	2,9	1,2
ISIS 425737	1,2	1,7	4,0	1,5
ISIS 425755	1,0	1,5	5,4	1,5

Como se muestra en la Tabla 32, determinados compuestos mostraron un aumento del peso del bazo inferior a 4 veces.

Función hepática

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de aminotransferasas con un analizador automatizado de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron las concentraciones plasmáticas de ALT (alanina aminotransferasa) y AST (aspartato aminotransferasa) y los resultados se presentan en la Tabla 33, expresados en IU/l. Los niveles plasmáticos de bilirrubina y albúmina también se midieron con el mismo analizador de química clínica y los resultados también se presentan en la Tabla 33.

Tabla 33

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores metabólicos en el hígado de ratas Sprague-Dawley				
	ALT (IU/l)	AST (IU/l)	Bilirrubina (mg/dl)	Albúmina (g/dl)
PBS	55	138	0,15	3,3
ISIS 304299	69	154	0,15	2,7
ISIS 304309	80	138	0,11	2,9
ISIS 420915	43	95	0,11	3,0

5	ISIS 420951	353	511	0,32	2,6
	ISIS 425655	312	497	0,47	2,6
	ISIS 425656	277	335	0,20	3,0
	ISIS 425679	537	659	0,38	2,7
	ISIS 425695	228	445	0,23	2,3
10	ISIS 425736	362	553	0,32	2,9
	ISIS 425737	55	79	0,09	1,9
	ISIS 425755	271	303	0,41	2,8

Función renal

15 Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina con un analizador automatizado de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 34, expresados en mg/dl. También se evaluó la relación entre proteína y creatinina total en orina, y se presenta en la Tabla 35.

Tabla 34

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores metabólicos (mg/dl) en el riñón de ratas Sprague-Dawley		
	BUN	Creatinina
25	PBS	20
	ISIS 304299	30
	ISIS 304309	24
	ISIS 420915	20
30	ISIS 420951	37
	ISIS 425655	28
	ISIS 425656	25
	ISIS 425679	46
35	ISIS 425695	30
	ISIS 425736	26
	ISIS 425737	30
	ISIS 425755	29

Tabla 35

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre la proteína/creatinina total en orina en el riñón de ratas Sprague-Dawley		
	Predosis	Semana 6
45	PBS	0,82
	ISIS 304299	0,95
	ISIS 304309	1,10
	ISIS 420915	0,91
50	ISIS 420951	0,90
	ISIS 425655	0,78
	ISIS 425656	0,86
	ISIS 425679	0,91
	ISIS 425695	0,89
55	ISIS 425736	1,00
	ISIS 425737	0,86
	ISIS 425755	0,78

60 Como se muestra en las Tablas 34 y 35, determinados compuestos demostraron un aumento inferior a 7 veces de la proteína/creatinina total en orina en el riñón de estas ratas. Además, determinados compuestos demostraron un aumento inferior a 6 veces en la proteína/creatinina total en orina en el riñón de estas ratas.

Ensayos hematológicos

65 La sangre obtenida de todos los grupos de ratas se envió a Antech Diagnostics para las mediciones y los análisis del hematocrito (HCT), el volumen corpuscular medio (MCV), la hemoglobina corpuscular media (MCH), y la

concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), así como las mediciones de los recuentos sanguíneos diferenciales, tales como los de WBC (neutrófilos, linfocitos y monocitos), RBC y plaquetas, y el contenido total de hemoglobina. Los resultados se presentan en las Tablas 36 y 37. Los porcentajes proporcionados en las tablas indican el cambio porcentual en el recuento sanguíneo completo en comparación con el testigo con PBS.

5

Tabla 36

10

15

20

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento sanguíneo completo (%) en comparación con el testigo con PBS en ratas Sprague-Dawley							
ISIS NO.	WBC	RBC	Hemoglobina	HCT	MCV	MCH	MCHC
304299	+4	-5	-3	+2	+11	+5	-5
304309	-10	-8	-11	-12	-4	-3	+1
420915	-9	-16	-20	-17	+1	-3	-3
420951	+5	-5	-8	-5	+1	-2	-3
425655	+22	-17	-18	-19	-2	0	+2
425656	-1	-13	-19	-16	-3	-6	-2
425679	+49	-42	-32	-28	+26	+19	-5
425695	-2	-25	-31	-29	-4	-8	-3
425736	+18	+1	-3	+2	0	-4	-4
425737	-15	-20	-18	-20	+2	+3	+1
425755	+35	-31	-27	-23	+14	+8	-4

Tabla 37

25

30

35

40

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento sanguíneo completo (%) en comparación con el testigo con PBS en ratas Sprague-Dawley				
ISIS NO.	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos	Plaquetas
304299	-61	+15	-10	-41
304309	-35	+8	+10	-37
420915	-23	+6	0	-29
420951	-62	+15	+10	-67
425655	+23	-8	+80	-13
425656	-14	0	+70	-15
425679	-4	-1	+60	-75
425695	+68	-20	+80	-5
425736	0	-2	+70	-1
425737	-6	+1	+20	-21
425755	-18	+3	+70	-58

Ejemplo 14: estudios farmacocinéticos de la concentración de oligonucleótido antisentido en hígado y riñón de rata Sprague-Dawley

45

Se trató a ratas Sprague Dawley con los oligonucleótidos antisentido ISIS de los estudios descritos en el Ejemplo 13, y se evaluó la semivida del oligonucleótido, así como el tiempo transcurrido para la degradación y la eliminación del oligonucleótido del hígado y del riñón.

50

Tratamiento

Se inyectaron a grupos de cuatro ratas Sprague Dawley cada uno, por vía subcutánea dos veces a la semana durante 2 semanas, 20 mg/kg de ISIS 304299, ISIS 304309, ISIS 420915, ISIS 420951, ISIS 425655, ISIS 425656, ISIS 425679, ISIS 425695, ISIS 425736, ISIS 425737 e ISIS 425755. Tres días después de la última dosis, se sacrificó a las ratas, y se recogieron los hígados y los riñones para su análisis.

55

Medición de la concentración de oligonucleótido

60

Se midió la concentración del oligonucleótido de longitud completa, así como la concentración total de oligonucleótido (incluida la forma degradada). El método utilizado es una modificación de los métodos publicados anteriormente (Leeds *et al.*, 1996; Geary *et al.*, 1999) que consiste en una extracción con fenol-cloroformo (líquido-líquido) seguida de una extracción en fase sólida. Antes de la extracción se añadió un patrón interno (ISIS 355868, un oligonucleótido fosforotioato modificado 2'-O-metoxietilado 27-mero, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTT, indicado en el presente documento como SEQ ID NO: 166). Las concentraciones de la muestra de tejido se calcularon mediante curvas de calibración, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de aproximadamente 1,14 µg/g. Los resultados se presentan en las Tablas 38 y 39, expresados como µg/g de tejido hepático o renal.

65

También se calculó la relación entre riñón e hígado del oligonucleótido de longitud completa, y se presenta en la Tabla 38.

Tabla 38

Concentración de oligonucleótido de longitud completa ($\mu\text{g/g}$) y relación en el hígado y el riñón, de ratas Sprague-Dawley			
ISIS NO.	Hígado	Riñón	Relación riñón/hígado
304299	165	487	2,9
304309	344	606	1,8
420915	171	680	4,0
420951	214	389	1,8
425655	242	466	1,9
425656	286	595	2,1
425679	290	334	1,2
425695	266	566	2,1
425736	245	571	2,3
425737	167	477	2,9
425755	218	379	1,7

Tabla 39

Concentración total de oligonucleótido ($\mu\text{g/g}$) en el hígado y el riñón de ratas Sprague-Dawley		
ISIS NO.	Hígado	Riñón
304299	208	653
304309	409	803
420915	196	844
420951	348	879
425655	340	764
425656	329	703
425679	461	710
425695	369	843
425736	282	738
425737	195	587
425755	351	886

Ejemplo 15: inhibición dependiente de la dosis *in vivo* de la transtiretina humana en ratones transgénicos

Se administró a ratones transgénicos que contenían el gen de la transtiretina humana dosis crecientes de los oligonucleótidos ISIS seleccionados a partir de los estudios descritos en el Ejemplo 14 para evaluar el efecto de inhibición dependiente de la dosis de la transtiretina humana en estos ratones.

Tratamiento

Se inyectaron a grupos de cuatro ratones cada uno, dos machos y dos hembras, por vía subcutánea dos veces a la semana durante 4 semanas, 4 mg/kg, 10 mg/kg o 25 mg/kg de ISIS 304299, ISIS 420915, ISIS 420951, ISIS 425679, ISIS 425736, ISIS 425737 e ISIS 425755. Se inyectaron a un grupo de cuatro ratones, dos machos y dos hembras, por vía subcutánea dos veces a la semana durante 4 semanas, 25 mg/kg del oligonucleótido testigo, ISIS 141923. Se inyectó PBS a un grupo testigo de cuatro ratones, dos machos y dos hembras, por vía subcutánea dos veces a la semana durante 4 semanas. Se tomaron muestras de plasma de cada grupo los días 0, 7, 14, 21 y 28. Dos días después de la última dosis, se sacrificó a los ratones y se recolectaron los órganos para su posterior análisis.

Análisis de ARN

Se extrajo el ARN del tejido hepático para el análisis PCR en tiempo real de la transtiretina utilizando el juego de cebador y sonda RTS3029. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la transtiretina humana, con respecto al testigo con PBS. Tal como se muestra en la Tabla 40, el tratamiento con los oligonucleótidos antisentido ISIS dio como resultado una significativa reducción dependiente de la dosis del ARNm de la transtiretina humana en comparación con el testigo con PBS. El tratamiento con el oligonucleótido testigo, ISIS 141923 no dio como resultado una reducción significativa de la transtiretina, como era de esperar.

Tabla 40

Inhibición del ARNm de la transtiretina humana en el hígado de ratones transgénicos para hTTR con respecto al testigo con PBS		
ISIS NO.	Dosis (mg/kg)	% de inhibición
304299	25	73
	10	60
	4	9
420915	25	78
	10	57
	4	43
420951	25	91
	10	85
	4	52
425679	25	94
	10	88
	4	42
425736	25	49
	10	54
	4	15
425737	25	82
	10	59
	4	21
425755	25	91
	10	79
	4	24
141923	25	0

30 *Análisis de proteínas*

Se midieron los niveles proteicos de transtiretina humana en el plasma de ratones transgénicos mediante ELISA utilizando un anticuerpo policlonal contra la transtiretina (Abcam Ab37774) y un anticuerpo de detección de oveja contra TTR marcado con peroxidasa de rábano picante (Abcam, nº de cat. 35217). La reacción coloreada se desarrolló con el kit de sustrato TMB ImmunoPure® y se midió la absorbancia a 450 nm con un espectrofotómetro para placas de microtitulación. Las muestras de plasma se tomaron predosis y los días 7, 14, 21 y 28. Los resultados se presentan en la Tabla 41, expresados como porcentaje de inhibición en comparación con los niveles predosis, y demuestran una reducción dependiente del tiempo y dependiente de la dosis de los niveles de proteína al tratarse con los oligonucleótidos ISIS.

Tabla 41

Inhibición de la proteína transtiretina humana en el plasma de ratones transgénicos con respecto a los niveles predosis						
ISIS NO.		Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
141923	25	0	0	20	77	41
304299	25	0	44	85	100	88
	10	0	0	8	93	78
	4	0	0	0	57	0
420915	25	0	0	67	86	91
	10	0	21	39	70	71
	4	0	25	0	0	0
420951	25	0	83	96	100	100
	10	0	35	66	91	86
	4	0	7	26	0	0
425679	25	0	93	97	96	98
	10	0	38	80	96	95
	4	0	0	0	0	0
425736	25	0	56	76	82	92
	10	0	0	33	37	66
	4	0	0	0	0	0
425737	25	0	90	96	99	98
	10	0	51	80	88	89
	4	0	29	21	37	31
425755	25	0	88	96	98	99
	10	0	52	76	90	88
	4	0	29	22	36	26

Peso corporal y peso de los órganos

5 Los pesos corporales de los ratones se midieron predosis y al final del período de tratamiento. Los pesos corporales se presentan en la Tabla 42 y se expresan como aumento porcentual frente al peso del testigo con PBS anotado antes del inicio del tratamiento. Los pesos del hígado, bazo y riñón se midieron al final del estudio, y también se presentan en la Tabla 42 como un cambio porcentual frente a los pesos de los órganos respectivos del testigo con PBS.

10

Tabla 42

15

20

25

30

35

40

Cambio en los pesos corporales y de los órganos de los ratones transgénicos después del tratamiento con los oligonucleótidos antisentido (%)					
	Dosis (mg/kg)	Peso corporal	Hígado	Bazo	Riñón
PBS		+13	0	0	0
ISIS 304299	25	+17	+16	+3	-2
	10	+14	+10	-13	-4
	4	+17	+2	+17	-2
ISIS 420915	25	+18	+12	-6	-6
	10	+16	+6	-4	-5
	4	+15	+4	+8	-2
ISIS 420951	25	+22	+23	+32	-2
	10	+16	+11	+10	-3
	4	+24	+7	+19	+5
ISIS 425679	25	+24	+33	+40	-1
	10	+14	+5	+9	-2
	4	+19	+7	+10	0
ISIS 425736	25	+16	+15	0	-5
	10	+28	+8	-12	-6
	4	+20	+10	-9	-2
ISIS 425737	25	+16	+13	0	-2
	10	+19	+6	+18	-3
	4	+19	+5	+4	+1
ISIS 425755	25	+21	+25	+34	-5
	10	+17	+10	+13	-4
	4	+22	+3	+27	+4
ISIS 141923	25	+20	+8	-3	-4

Función hepática

45 Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de aminotransferasas con un analizador automatizado de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron las concentraciones plasmáticas de ALT (alanina aminotransferasa) y AST (aspartato aminotransferasa) y los resultados se presentan en la Tabla 43, expresados en IU/l. También se midieron los niveles plasmáticos de bilirrubina con el mismo analizador de química clínica; los resultados también se presentan en la Tabla 43 y se expresan en mg/dl.

50

Tabla 43

55

60

65

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores metabólicos en el hígado de ratones transgénicos				
	Dosis (mg/kg)	ALT (IU/l)	AST (IU/l)	TBIL (mg/dl)
PBS	-	48	112	0,20
ISIS 304299	25	42	93	0,14
	10	37	56	0,18
	4	35	71	0,15
ISIS 420915	25	63	181	0,22
	10	46	132	0,22
	4	35	114	0,22
ISIS 420951	25	63	85	0,17
	10	42	107	0,21
	4	31	74	0,19

5	ISIS 425679	25	156	150	0,13
		10	93	148	0,23
		4	38	119	0,22
10	ISIS 425736	25	37	78	0,21
		10	33	62	0,20
		4	46	228	0,23
15	ISIS 425737	25	55	121	0,20
		10	41	94	0,18
		4	32	73	0,14
15	ISIS 425755	25	74	160	0,17
		10	31	80	0,16
		4	45	122	0,21
	ISIS 141923	25	66	141	0,17

Función renal

20 Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico en sangre (BUN) con un analizador automatizado de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 44, expresados en mg/dl.

Tabla 44

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el BUN (mg/dl) en el riñón de ratones transgénicos		
	Dosis (mg/kg)	BUN
PBS		22
ISIS 304299	25	22
	10	22
	4	22
ISIS 420915	25	24
	10	25
	4	20
ISIS 420951	25	24
	10	25
	4	26
ISIS 425679	25	26
	10	24
	4	22
ISIS 425736	25	20
	10	22
	4	22
ISIS 425737	25	21
	10	19
	4	23
ISIS 425755	25	23
	10	21
	4	20
ISIS 141923	25	21

Ejemplo 16: Inhibición *in vivo* de la transtiretina humana en ratones transgénicos para la transtiretina humana

60 Oligonucleótidos antisentido con motivos MOE 5-10-5, ISIS 304313, ISIS 420913, ISIS 420919, ISIS 420921, ISIS 420922, ISIS 420937, ISIS 420944, ISIS 420947, ISIS 420949, ISIS 420950, ISIS 420951, ISIS 420952, ISIS 420953, ISIS 420955, ISIS 420957 e ISIS 420959 de la Tabla 4. Estos oligonucleótidos antisentido presentaron una inhibición del 65% o más del ARNm de la transtiretina, se seleccionaron y se ensayaron en ratones transgénicos que contenían el gen de la transtiretina humana. También se diseñaron oligonucleótidos adicionales con secuencias solapantes con ISIS 420951 (GTTTTATTGTCTCTGCCTGG (SEQ ID NO: 116)), y con diversos motivos para ensayarse en los ratones transgénicos. Estos oligonucleótidos adicionales fueron ISIS 450518 (TTTTATTGTCTCTGCCTG (SEQ ID NO: MOE 5-8-5 (SEQ ID NO: 167)), ISIS 450519 (GTTTTATTGTCTCTGCCTGG, MOE 6-8-6 (SEQ ID NO: 116)), ISIS 450520 (GTTTTATTGTCTCTGCCTGG, MOE

3-10-7 (SEQ ID NO: 116)), ISIS 450521 (GTTTTATTGTCTCTGCCTGG, MOE 7-10-3 (SEQ ID NO: 116)), ISIS 450522 (GTTTTATTGTCTCTGCCTGG, MOE 2-10-8 (SEQ ID NO: 116)), e ISIS 450523 (GTTTTATTGTCTCTGCCTGG, MOE 8-10-2 (SEQ ID NO: 116)).

5 *Tratamiento*

Se administraron a grupos de cuatro ratones transgénicos para hTTR cada uno, dos machos y dos hembras, por vía subcutánea dos veces por semana durante cuatro semanas, 25 mg/kg de ISIS 304313, ISIS 420913, ISIS 420919, ISIS 420921, ISIS 420922, ISIS 420937, ISIS 420944, ISIS 420947, ISIS 420949, ISIS 420950, ISIS 420951, ISIS 420952, ISIS 420953, ISIS 420955, ISIS 420957, ISIS 420959, ISIS 425518, ISIS 425519, ISIS 425520, ISIS 425521, ISIS 425522 o ISIS 425523. Se inyectó PBS a un grupo testigo de cuatro ratones transgénicos para hTTR, dos machos y dos hembras, por vía subcutánea dos veces por semana durante cuatro semanas. Se recogieron muestras de sangre de todos los grupos los días 0, 14 y 28 para el análisis del nivel plasmático de transtiretina. Se sacrificó a los ratones dos días después de la última dosis, y se recolectaron los hígados para el análisis del ARNm diana.

Análisis de ARN

Se extrajo el ARN del tejido hepático para el análisis PCR en tiempo real de la transtiretina utilizando el juego de cebador y sonda RTS3029. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la transtiretina humana, con respecto al testigo con PBS. Tal como se muestra en la Tabla 45, el tratamiento con los oligonucleótidos antisentido ISIS dio como resultado una reducción significativa del ARNm de la transtiretina humana en comparación con el testigo con PBS.

Tabla 45

Inhibición del ARNm de la transtiretina humana en el hígado de ratones transgénicos para hTTR con respecto al testigo con PBS	
ISIS NO.	% de inhibición
304313	68
420913	83
420919	64
420921	70
420922	82
420937	46
420944	58
420947	62
420949	87
420950	94
420952	95
420953	93
420955	93
420957	90
420959	73
450518	80
450519	87
450520	85
450521	94
450522	73
450523	94
420951	94

Análisis de proteínas

Se midieron los niveles proteicos de transtiretina humana en el plasma de ratones transgénicos mediante ELISA utilizando un anticuerpo policlonal contra la transtiretina (Abcam Ab37774) y un anticuerpo de detección de oveja contra TTR marcado con peroxidasa de rábano picante (Abcam, nº de cat. 35217). La reacción coloreada se desarrolló con el kit de sustrato TMB ImmunoPure® y se midió la absorbancia a 450 nm con un espectrofotómetro para placas de microtitulación. Las muestras de plasma se tomaron predosis y los días 7, 14 y 28. Los resultados se presentan en la Tabla 46, expresados como porcentaje de inhibición en comparación con los niveles predosis, y demuestran una reducción dependiente del tiempo de los niveles de proteína al tratarse con los oligonucleótidos ISIS.

Tabla 46

Inhibición de la proteína transtiretina humana en el plasma de ratones transgénicos para hTTR con respecto a los niveles predosis			
	Día 0	Día 14	Día 28
PBS	0	0	0
ISIS 304313	0	62	77
ISIS 420913	0	91	97
ISIS 420919	0	70	82
ISIS 420921	0	83	87
ISIS 420922	0	95	97
ISIS 420937	0	37	59
ISIS 420944	0	57	72
ISIS 420947	0	57	65
ISIS 420949	0	93	99
ISIS 420950	0	97	100
ISIS 420952	0	98	100
ISIS 420953	0	99	100
ISIS 420955	0	89	100
ISIS 420957	0	92	94
ISIS 420959	0	69	87
ISIS 450518	0	80	97
ISIS 450519	0	94	100
ISIS 450520	0	83	100
ISIS 450521	0	100	100
ISIS 450522	0	93	97
ISIS 450523	0	100	100
ISIS 420951	0	99	100

Función hepática

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de aminotransferasas con un analizador automatizado de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron las concentraciones plasmáticas de ALT (alanina aminotransferasa) y AST (aspartato aminotransferasa) y los resultados se presentan en la Tabla 47, expresados en IU/l. También se midieron los niveles plasmáticos de bilirrubina con el mismo analizador de química clínica; los resultados también se presentan en la Tabla 47 y se expresan en mg/dl.

Tabla 47

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores metabólicos en el hígado de ratones transgénicos			
	ALT (IU/l)	AST (IU/l)	Bilirrubina (mg/dl)
PBS	34	88	0,20
ISIS 304313	42	79	0,16
ISIS 420913	35	67	0,17
ISIS 420919	63	177	0,20
ISIS 420921	47	103	0,15
ISIS 420922	42	128	0,16
ISIS 420937	33	160	0,15
ISIS 420944	38	84	0,15
ISIS 420947	42	120	0,17
ISIS 420949	46	125	0,15
ISIS 420950	73	106	0,15
ISIS 420952	151	271	0,19
ISIS 420953	982	452	0,16
ISIS 420955	47	80	0,15
ISIS 420957	53	133	0,18
ISIS 420959	31	89	0,11
ISIS 450518	103	200	0,20
ISIS 450519	64	81	0,12
ISIS 450520	350	270	0,12
ISIS 450521	104	226	0,13

ISIS 450522	109	201	0,14
ISIS 450523	80	170	0,19
ISIS 420951	67	100	0,09

5

Función renal

10

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico en sangre (BUN) con un analizador automatizado de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 48, expresados en mg/dl.

Tabla 48

15

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el BUN (mg/dl) en el riñón de ratones transgénicos	
PBS	35
ISIS 304313	29
ISIS 420913	30
ISIS 420919	29
ISIS 420921	29
ISIS 420922	27
ISIS 420937	29
ISIS 420944	27
ISIS 420947	26
ISIS 420949	25
ISIS 420950	34
ISIS 420952	23
ISIS 420953	34
ISIS 420955	24
ISIS 420957	23
ISIS 420959	29
ISIS 450518	28
ISIS 450519	25
ISIS 450520	29
ISIS 450521	24
ISIS 450522	29
ISIS 450523	27
ISIS 420951	25

20

25

30

35

40

45

Ejemplo 17: tolerabilidad de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la transtiretina humana en ratones CD1

Se trató a ratones CD1 con los oligonucleótidos antisentido ISIS del Ejemplo 16 y se evaluaron para determinar los cambios en los niveles de diversos marcadores metabólicos.

Tratamiento

55

Se inyectaron a grupos de ocho ratones CD1 cada uno, por vía subcutánea dos veces a la semana, 50 mg/kg de ISIS 304313, ISIS 420913, ISIS 420919, ISIS 420921, ISIS 420922, ISIS 420937, ISIS 420944, ISIS 420947, ISIS 420949, ISIS 420950, ISIS 420951, ISIS 420952, ISIS 420953, ISIS 420955, ISIS 420957, ISIS 420959, ISIS 425518, ISIS 425519, ISIS 425520, ISIS 425521, ISIS 425522 o ISIS 425523. Tres días después de la última dosis en cada instante de tiempo, se anotaron los pesos corporales, se sacrificó a los ratones, y se recolectaron los órganos y el plasma para su posterior análisis.

60

Pesos corporales y de los órganos

65

Los pesos corporales de los ratones se midieron predosis y al final de cada período de tratamiento (dos semanas y seis semanas). Los pesos corporales se presentan en la Tabla 49 y se expresan como aumento porcentual frente al peso del testigo con PBS anotado antes del inicio del tratamiento. Los pesos del hígado, bazo y riñón se midieron al final del estudio, y también se presentan en la Tabla 49 como un cambio porcentual frente a los pesos de los órganos respectivos del testigo con PBS.

Tabla 49

Cambio en los pesos corporales y de los órganos de ratones CD1 después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido (%) la semana 6				
	Peso corporal	Hígado	Bazo	Riñón
PBS	1,3	1,0	1,0	1,0
ISIS 304313	1,2	1,2	1,4	1,2
ISIS 420913	1,2	1,2	1,3	1,1
ISIS 420919	1,3	1,2	1,9	1,1
ISIS 420921	1,1	1,1	2,2	1,1
ISIS 420922	1,1	1,0	1,6	0,9
ISIS 420937	1,1	1,0	1,2	1,0
ISIS 420944	1,1	1,1	2,0	1,0
ISIS 420947	1,3	1,2	1,7	1,0
ISIS 420949	1,3	1,2	1,8	1,1
ISIS 420950	1,3	1,0	1,7	1,0
ISIS 420952	1,4	1,3	2,1	0,9
ISIS 420953	1,3	1,5	2,2	1,0
ISIS 420955	1,2	1,2	2,2	1,0
ISIS 420957	1,1	1,1	1,8	1,1
ISIS 420959	1,3	1,2	3,2	1,1
ISIS 450518	1,4	1,3	1,8	1,1
ISIS 450519	1,3	1,5	2,4	1,0
ISIS 450520	1,4	1,4	2,2	1,0
ISIS 450521	1,2	1,2	1,9	1,1
ISIS 450522	1,3	1,5	2,3	1,1
ISIS 450523	1,2	1,3	2,4	1,1
ISIS 420951	1,3	1,2	1,9	1,0

Función hepática

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de aminotransferasas con un analizador automatizado de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron las concentraciones plasmáticas de ALT (alanina aminotransferasa) y AST (aspartato aminotransferasa) y los resultados se presentan en la Tabla 50, expresados en IU/l. Los niveles plasmáticos de bilirrubina y albúmina también se midieron con el mismo analizador de química clínica y los resultados también se presentan en la Tabla 50.

Tabla 50

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores metabólicos en el hígado de ratones CD1			
	ALT	AST	TBIL
PBS	34	88	0,20
ISIS 304313	42	79	0,16
ISIS 420913	35	67	0,17
ISIS 420919	63	177	0,20
ISIS 420921	47	103	0,15
ISIS 420922	42	128	0,16
ISIS 420937	33	160	0,15
ISIS 420944	38	84	0,15
ISIS 420947	42	120	0,17
ISIS 420949	46	125	0,15
ISIS 420950	73	106	0,15
ISIS 420952	151	271	0,19
ISIS 420953	982	452	0,16
ISIS 420955	47	80	0,15
ISIS 420957	53	133	0,18
ISIS 420959	31	89	0,11
ISIS 450518	103	200	0,20
ISIS 450519	64	81	0,12
ISIS 450520	350	270	0,12
ISIS 450521	104	226	0,13

ISIS 450522	109	201	0,14
ISIS 450523	80	170	0,19
ISIS 420951	67	100	0,09

5

Función renal

10 Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina con un analizador automatizado de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 51, expresados en mg/dl.

Tabla 51

15

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el BUN (mg/dl) en el riñón de ratones CD1	
	BUN
PBS	35
ISIS 304313	29
ISIS 420913	30
ISIS 420919	29
ISIS 420921	29
ISIS 420922	27
ISIS 420937	29
ISIS 420944	27
ISIS 420947	26
ISIS 420949	25
ISIS 420950	34
ISIS 420952	23
ISIS 420953	34
ISIS 420955	24
ISIS 420957	23
ISIS 420959	29
ISIS 450518	28
ISIS 450519	25
ISIS 450520	29
ISIS 450521	24
ISIS 450522	29
ISIS 450523	27
ISIS 420951	25

20

25

30

35

40

Ensayos hematológicos

45 La sangre obtenida de todos los grupos de ratones se envió a Antech Diagnostics para las mediciones y los análisis del hematocrito (HCT), el volumen corpuscular medio (MCV), la hemoglobina corpuscular media (MCH), y la concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), así como las mediciones de los recuentos sanguíneos diferenciales, tales como los de WBC (neutrófilos, linfocitos y monocitos), RBC y plaquetas, y el contenido total de hemoglobina. Los resultados se presentan en las Tablas 52 y 53. Los porcentajes proporcionados en las tablas indican el cambio porcentual en el recuento sanguíneo completo en comparación con el testigo con PBS.

50

Tabla 52

55

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento sanguíneo completo (%) en comparación con el testigo con PBS en ratones CD1							
	WBC	RBC	Hemoglobina	HCT	MCV	MCH	MCHC
ISIS 304313	+80	-5	-7	-9	-4	-2	+4
ISIS 420913	-10	-1	-3	-5	-4	-2	+3
ISIS 420919	+26	-2	-7	-9	-7	-5	+4
ISIS 420921	+60	-9	-12	-15	-6	-3	+5
ISIS 420922	+18	-6	-11	-16	-11	-6	+6
ISIS 420937	+42	-3	-4	-7	-5	-1	+5
ISIS 420944	+49	-5	-9	-13	-8	-4	+6
ISIS 420947	+36	-2	-2	-5	-3	0	+4
ISIS 420949	+61	-4	-6	-9	-7	-3	+5

60

65

5	ISIS 420950	+56	-14	-16	-19	-7	-3	+6
	ISIS 420952	+36	-20	-24	-25	-7	-5	+4
	ISIS 420953	+105	-21	-24	-26	-6	-4	+4
	ISIS 420955	+107	-14	-19	-21	-9	-5	+6
	ISIS 420957	+79	-5	-10	-13	-9	-6	+5
	ISIS 420959	+92	-8	-14	-18	-11	-7	+6
10	ISIS 450518	+138	-5	-10	-12	-7	-4	+4
	ISIS 450519	+118	-17	-21	-24	-9	-5	+6
	ISIS 450520	+151	-18	-21	-23	-7	-4	+4
	ISIS 450521	+118	-15	-21	-23	-11	-7	+5
	ISIS 450522	+63	-22	-28	-31	-12	-8	+6
15	ISIS 450523	+116	-22	-27	-29	-11	-7	+6
	ISIS 420951	+54	-15	-21	-24	-10	-6	+5

Tabla 53

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento sanguíneo diferencial (%) en comparación con el testigo con PBS en ratones CD1					
	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos	Plaquetas	
20	ISIS 304313	-54	+49	-45	+36
	ISIS 420913	-46	+39	-21	-2
25	ISIS 420919	-57	+49	-21	+19
	ISIS 420921	-55	+47	-24	+25
	ISIS 420922	-53	+46	-31	+24
	ISIS 420937	-63	+57	-48	+20
30	ISIS 420944	-40	+37	-28	+18
	ISIS 420947	-55	+49	-38	-9
	ISIS 420949	-30	+24	+7	+17
	ISIS 420950	-50	+40	0	+6
	ISIS 420952	-34	+33	-28	+13
35	ISIS 420953	-37	+35	-34	+11
	ISIS 420955	-37	+34	-21	+30
	ISIS 420957	-71	+61	-28	+16
	ISIS 420959	-52	+45	-24	-1
40	ISIS 450518	-56	+49	-28	+18
	ISIS 450519	-18	+11	+41	+55
	ISIS 450520	-41	+34	0	+7
	ISIS 450521	-41	+36	-14	+21
	ISIS 450522	-41	+31	+17	+58
45	ISIS 450523	-28	+19	+31	+51
	ISIS 420951	-28	+24	0	+26

Ejemplo 18: tolerabilidad de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la transtiretina humana en ratas Sprague-Dawley

Los oligonucleótidos ISIS seleccionados a partir de los estudios descritos en el Ejemplo 17 también se ensayaron en ratas Sprague-Dawley y se evaluaron para determinar los cambios en los niveles de diversos marcadores metabólicos.

Tratamiento

Se evaluaron predosis los pesos corporales, el recuento sanguíneo completo y el recuento sanguíneo diferencial, así como la relación proteína/creatinina en orina de las ratas. Se inyectaron a grupos de cuatro ratas Sprague-Dawley cada uno, por vía subcutánea dos veces a la semana, 50 mg/kg de ISIS 420913, ISIS 420921, ISIS 420922, ISIS 420950, ISIS 420955, ISIS 420957 e ISIS 420959. Tres días después de la última dosis en cada instante de tiempo, se anotaron los pesos corporales, se sacrificó a las ratas, y se recolectaron los órganos y el plasma para su posterior análisis.

Pesos corporales y de los órganos

Los pesos corporales de las ratas se midieron predosis y al final del período de tratamiento. Los pesos corporales se presentan en la Tabla 54, y se expresan como aumento porcentual frente al peso del testigo con PBS anotado antes del inicio del tratamiento. Los pesos del hígado, bazo y riñón se midieron al final del estudio, y también se presentan en la Tabla 54 como un cambio porcentual frente a los pesos de los órganos respectivos del testigo con PBS.

Tabla 54

Cambio en los pesos corporales y de los órganos de ratas Sprague-Dawley después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido (%)				
	Peso corporal	Hígado	Bazo	Riñón
PBS	2,1	1,0	1,0	1,0
ISIS 420913	1,5	1,5	4,7	1,1
ISIS 420921	1,6	1,5	4,2	1,3
ISIS 420922	1,3	1,5	4,4	1,4
ISIS 420950	1,4	1,5	6,4	1,7
ISIS 420955	1,5	1,6	5,9	1,4
ISIS 420957	1,4	1,4	6,8	1,3
ISIS 420959	1,5	1,4	5,5	1,4

Como se muestra en la Tabla 54, los compuestos demostraron un aumento del peso de los órganos de estas ratas inferior a 10 veces. Además, determinados compuestos demostraron un aumento del peso de los órganos de estas ratas inferior a 7 veces. Aunque determinados compuestos demostraron un aumento del peso de los órganos de estas ratas inferior a 6 veces. Determinados compuestos demostraron un aumento del peso de los órganos de estas ratas inferior a 5 veces.

Función hepática

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de aminotransferasas con un analizador automatizado de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron las concentraciones plasmáticas de ALT (alanina aminotransferasa) y AST (aspartato aminotransferasa) y los resultados se presentan en la Tabla 55, expresados en IU/l. Los niveles plasmáticos de bilirrubina y albúmina también se midieron con el mismo analizador de química clínica y los resultados también se presentan en la Tabla 55.

Tabla 55

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores metabólicos en el hígado de ratas Sprague-Dawley				
	ALT (IU/l)	AST (IU/l)	TBIL (mg/dl)	Albúmina (g/dl)
PBS	26	66	0,09	4,5
ISIS 420913	38	95	0,08	3,3
ISIS 420921	65	151	0,11	3,2
ISIS 420922	40	121	0,11	4,0
ISIS 420950	398	327	0,19	4,0
ISIS 420955	78	241	0,18	4,1
ISIS 420957	84	244	0,14	3,7
ISIS 420959	82	405	0,17	4,6

Función renal

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina con un analizador automatizado de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 56, expresados en mg/dl. También se evaluó la relación entre proteína y creatinina total en orina, y se presenta en la Tabla 56.

Tabla 56

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores metabólicos (mg/dl) en el riñón de ratas Sprague-Dawley		
	BUN	Creatinina
PBS	14	0,05
ISIS 420913	22	0,09
ISIS 420921	23	0,07
ISIS 420922	21	0,08

5	ISIS 420950	20	0,11
	ISIS 420955	22	0,06
	ISIS 420957	23	0,18
	ISIS 420959	24	0,17

Tabla 57

10	Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre la proteína/creatinina total en orina en el riñón de ratas Sprague-Dawley	
		Relación proteína/creatinina en orina
	PBS	1,50
15	ISIS 420913	19,51
	ISIS 420921	5,07
	ISIS 420922	4,72
	ISIS 420950	5,61
	ISIS 420955	5,57
20	ISIS 420957	5,40
	ISIS 420959	4,39

Ensayos hematológicos

25 La sangre obtenida de todos los grupos de ratas se envió a Antech Diagnostics para las mediciones y los análisis del hematocrito (HCT), el volumen corpuscular medio (MCV), la hemoglobina corpuscular media (MCH), y la concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), así como las mediciones de los recuentos sanguíneos diferenciales, tales como los de WBC (neutrófilos, linfocitos y monocitos), RBC y plaquetas, y el contenido total de hemoglobina. Los resultados se presentan en las Tablas 58 y 59. Los porcentajes indicados en las tablas indican el cambio porcentual en el recuento sanguíneo completo en comparación con el testigo con PBS.

Tabla 58

35	Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento sanguíneo completo (%) en comparación con el testigo con PBS en ratas Sprague-Dawley							
		WBC	RBC	Hemoglobina	HCT	MCV	MCH	MCHC
	PBS	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
40	ISIS 420913	1,7	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	1,0
	ISIS 420921	1,6	0,9	0,9	0,9	1,0	1,0	1,0
	ISIS 420922	1,6	0,9	0,9	0,8	1,0	1,0	1,0
	ISIS 420950	2,2	0,7	0,7	0,7	1,0	1,0	1,0
	ISIS 420955	1,9	0,7	0,8	0,7	1,1	1,2	1,0
45	ISIS 420957	3,1	0,8	0,8	0,8	1,0	1,0	1,0
	ISIS 420959	2,2	0,8	0,8	0,8	1,0	1,0	1,0

Tabla 59

50	Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el recuento sanguíneo diferencial (%) en comparación con el testigo con PBS en ratas Sprague-Dawley				
		Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos	Plaquetas
	PBS	1,0	1,0	1,0	1,0
55	ISIS 420913	0,5	1,1	1,7	0,7
	ISIS 420921	0,7	1,0	1,6	0,6
	ISIS 420922	0,5	1,1	1,3	0,7
	ISIS 420950	0,8	1,0	2,3	0,7
	ISIS 420955	0,5	1,0	2,4	0,7
60	ISIS 420957	0,7	1,0	1,6	0,3
	ISIS 420959	0,5	1,1	1,3	n.d.

Ejemplo 19: estudios farmacocinéticos de la semivida de la concentración de oligonucleótido antisentido en hígado y riñón de rata Sprague-Dawley

65

Se trató a ratas Sprague Dawley con los oligonucleótidos antisentido ISIS seleccionados a partir de los estudios descritos en el Ejemplo 18, y se evaluó la semivida del oligonucleótido, así como el tiempo transcurrido para la degradación y la eliminación del oligonucleótido del hígado y del riñón.

5 Tratamiento

Se inyectaron a grupos de cuatro ratas Sprague Dawley cada uno, por vía subcutánea dos veces a la semana durante 2 semanas, 20 mg/kg de ISIS 420913, ISIS 420921, ISIS 420922, ISIS 420950, ISIS 420955, ISIS 420957 e ISIS 420959. Tres días después de la última dosis, se sacrificó a las ratas y se recolectaron los hígados y los riñones para su análisis.

Medición de la concentración de oligonucleótido

Se midió la concentración del oligonucleótido de longitud completa, así como la concentración total de oligonucleótido (incluida la forma degradada). El método utilizado es una modificación de los métodos publicados anteriormente (Leeds *et al.*, 1996; Geary *et al.*, 1999) que consiste en una extracción con fenol-cloroformo (líquido-líquido) seguida de una extracción en fase sólida. Antes de la extracción se añadió un patrón interno (ISIS 355868, un oligonucleótido fosforotioato modificado 2'-O-metoxietilado 27-mero, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTT, indicado en el presente documento como SEQ ID NO: 166). Las concentraciones de la muestra de tejido se calcularon mediante curvas de calibración, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de aproximadamente 1,14 µg/g. Los resultados se presentan en las Tablas 60 y 61, expresados como µg/g de tejido hepático o renal. También se calculó la relación entre riñón e hígado de la concentración de oligonucleótido, y se presenta en las Tablas 60 y 61.

Tabla 60

Concentración de oligonucleótido de longitud completa (µg/g) y relación en el hígado y el riñón de ratas Sprague-Dawley			
ISIS NO.	Hígado	Riñón	Relación riñón/hígado
420913	154	285	1,9
420921	147	293	2,0
420922	226	497	2,2
420950	161	411	2,6
420955	152	383	2,5
420957	235	453	1,9
420959	187	513	2,7

Tabla 61

Concentración total de oligonucleótido (µg/g) en el hígado y el riñón de ratas Sprague-Dawley			
ISIS NO.	Hígado	Riñón	Relación riñón/hígado
420913	180	310	1,7
420921	159	305	1,9
420922	238	544	2,3
420950	168	466	2,8
420955	156	442	2,8
420957	244	551	2,3
420959	202	534	2,6

Ejemplo 20: inhibición dependiente de la dosis *in vivo* de la transtiretina humana en ratones transgénicos

Se eligieron ISIS 420913, ISIS 420921, ISIS 420922, ISIS 420957 e ISIS 420959, que presentaron una buena eficacia y tolerabilidad, como se demuestra en los Ejemplos 16-19, para el estudio de atenuación génica de la diana dependiente de la dosis en ratones transgénicos que contenían el gen de la transtiretina humana. ISIS 420950 e ISIS 420955, que demostraron un 90% o más de atenuación génica de la diana, pero que también demostraron toxicidad en ratones CD1 (Ejemplos 16-19), también se eligieron para este estudio para la comparación.

Tratamiento

Se inyectaron a grupos de cuatro ratones cada uno, dos machos y dos hembras, por vía subcutánea dos veces a la semana durante 4 semanas, 4 mg/kg, 10 mg/kg o 25 mg/kg de ISIS 420913, ISIS 420921, ISIS 420922, ISIS 420950, ISIS 420955, ISIS 420957 o ISIS 420959. Se inyectaron a un grupo de cuatro ratones, dos machos y dos hembras, por vía subcutánea dos veces a la semana durante 4 semanas, 25 mg/kg del oligonucleótido testigo, ISIS 141923. Se inyectó PBS a un grupo testigo de cuatro ratones, dos machos y dos hembras, por vía subcutánea

dos veces a la semana durante 4 semanas. Se tomaron muestras de plasma de cada grupo los días 0, 14 y 28. Dos días después de la última dosis, se sacrificó a los ratones y se recolectaron los órganos para su posterior análisis.

Análisis de ARN

Se extrajo el ARN del tejido hepático para el análisis PCR en tiempo real de la transtiretina utilizando el juego de cebador y sonda RTS3029. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la transtiretina humana, con respecto al testigo con PBS. Tal como se muestra en la Tabla 62, el tratamiento con los oligonucleótidos antisentido ISIS dio como resultado una significativa reducción dependiente de la dosis del ARNm de la transtiretina humana en comparación con el testigo con PBS. El tratamiento con el oligonucleótido testigo, ISIS 141923 no dio como resultado una reducción significativa de la transtiretina, como era de esperar.

Tabla 62

Inhibición del ARNm de la transtiretina humana en el hígado de ratones transgénicos para hTTR con respecto al testigo con PBS		
ISIS NO.	Dosis (mg/kg)	% de inhibición
420913	25	78
	10	65
	4	32
420921	25	76
	10	64
	4	13
420922	25	80
	10	53
	4	21
420950	25	92
	10	77
	4	57
420955	25	88
	10	56
	4	23
420957	25	85
	10	72
	4	32
420959	25	75
	10	26
	4	11
141923	25	0

Análisis de proteínas

Se midieron los niveles proteicos de transtiretina humana en el plasma de ratones transgénicos mediante ELISA utilizando un anticuerpo policlonal contra la transtiretina (Abcam Ab37774) y un anticuerpo de detección de oveja contra TTR marcado con peroxidasa de rábano picante (Abcam, n° de cat. 35217). La reacción coloreada se desarrolló con el kit de sustrato TMB ImmunoPure® y se midió la absorbancia a 450 nm con un espectrofotómetro para placas de microtitulación. Las muestras de plasma se tomaron predosis y los días 7, 14, 21 y 28. Los resultados se presentan en la Tabla 63, expresados como porcentaje de inhibición en comparación con los niveles predosis, y demuestran una reducción dependiente del tiempo y dependiente de la dosis de los niveles de proteína al tratarse con los oligonucleótidos ISIS.

Tabla 63

Inhibición de la proteína transtiretina humana en el plasma de ratones transgénicos para hTTR con respecto a los niveles predosis				
ISIS NO.	Dosis (mg/kg)	d0	d14	d28
420913	25	0	73	93
	10	0	27	96
	4	0	25	54
420921	25	0	73	90
	10	0	63	79
	4	0	42	67
420922	25	0	63	96
	10	0	57	89
	4	0	38	77

5	420950	25	0	95	97
		10	0	71	96
		4	0	29	53
10	420955	25	0	84	96
		10	0	53	91
		4	0	20	30
15	420957	25	0	83	93
		10	0	51	66
		4	0	32	49
20	420959	25	0	74	80
		10	0	31	58
		4	0	0	0
	141923	25	0	22	0

Peso corporal y peso de los órganos

Los pesos corporales de los ratones se midieron predosis y al final del período de tratamiento. Los pesos corporales se presentan en la Tabla 64 y se expresan como aumento porcentual frente al peso del testigo con PBS anotado antes del inicio del tratamiento. Los pesos del hígado, bazo y riñón se midieron al final del estudio, y también se presentan en la Tabla 64 como un cambio porcentual frente a los pesos de los órganos respectivos del testigo con PBS.

Tabla 64

Cambio en los pesos corporales y de los órganos de ratones transgénicos después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido (%)						
		Peso corporal	Hígado	Bazo	Riñón	
	PBS	6,4	0,0	0,0	0,0	
35	ISIS 420913	25	8,1	0,3	11,4	4,1
		10	10,6	-8,6	14,3	13,6
		4	7,4	3,7	5,0	12,0
40	ISIS 420921	25	10,5	8,8	25,6	-0,1
		10	9,7	5,7	10,8	4,0
		4	8,7	-4,4	16,0	11,0
45	ISIS 420922	25	8,4	5,6	18,0	1,7
		10	9,2	-1,7	27,1	6,3
		4	8,1	-2,1	-11,4	5,1
50	ISIS 420950	25	12,8	14,3	22,8	1,7
		10	8,4	4,3	-2,8	0,6
		4	9,1	0,4	14,2	1,5
55	ISIS 420955	25	10,1	14,6	17,7	-4,4
		10	11,8	5,6	-0,3	1,4
		4	7,9	4,7	-12,3	4,5
60	ISIS 420957	25	12,8	6,4	33,1	2,8
		10	14,5	13,9	-6,3	9,7
		4	7,4	-5,4	12,2	6,2
65	ISIS 420959	25	10,0	2,4	72,7	23,3
		10	7,2	-5,4	40,2	9,8
		4	4,1	-4,4	27,8	-6,6
	ISIS 141923	25	9,2	-1,3	20,4	-5,5

Función hepática

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones plasmáticas de aminotransferasas con un analizador automatizado de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron las concentraciones plasmáticas de ALT (alanina aminotransferasa) y AST (aspartato aminotransferasa) y los resultados se presentan en la Tabla 65, expresados en IU/l. También se

midieron los niveles plasmáticos de bilirrubina con el mismo analizador de química clínica; los resultados también se presentan en la Tabla 65 y se expresan en mg/dl.

5

Tabla 65

10

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores metabólicos en el hígado de ratones transgénicos				
	Dosis (mg/kg)	ALT (IU/l)	AST (IU/l)	TBIL (mg/dl)
PBS		47	63	0,16
ISIS 420913	25	42	69	0,13
	10	49	90	0,17
	4	42	59	0,18
ISIS 420921	25	56	96	0,12
	10	51	68	0,22
	4	42	75	0,14
ISIS 420922	25	50	76	0,12
	10	40	170	0,14
	4	37	48	0,13
ISIS 420950	25	74	116	0,14
	10	37	67	0,13
	4	34	64	0,11
ISIS 420955	25	46	117	0,15
	10	54	76	0,16
	4	50	153	0,17
ISIS 420957	25	40	73	0,13
	10	36	63	0,20
	4	37	61	0,12
ISIS 420959	25	51	92	0,19
	10	48	69	0,13
	4	37	67	0,13
ISIS 141923	25	44	79	0,12

15

20

25

30

35

Función renal

40

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron las concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico en sangre (BUN) con un analizador automatizado de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 66, expresados en mg/dl.

Tabla 66

45

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el BUN (mg/dl) en el riñón de ratones transgénicos		
	Dosis (mg/kg)	BUN
PBS	-	23
ISIS 420913	25	24
	10	22
	4	20
ISIS 420921	25	24
	10	22
	4	23
ISIS 420922	25	23
	10	22
	4	24
ISIS 420950	25	22
	10	26
	4	23
ISIS 420955	25	23
	10	24
	4	25
ISIS 420957	25	20
	10	22
	4	20
ISIS 420959	25	25
	10	22
	4	22
ISIS 141923	25	19

50

55

60

65

Ejemplo 21: confirmación de respuesta a la dosis de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la transtiretina humana en hepatocitos primarios de mono Cynomolgus

Se seleccionaron los *gapmers* que mostraron tolerabilidad en ratones CD1 y ratas Sprague Dawley (estudios descritos en los Ejemplos 17-19), así como potencia en los ratones transgénicos (estudios descritos en los Ejemplos 16 y 20) y se ensayaron a diversas dosis en hepatocitos primarios de monos Cynomolgus. Las células se sembraron a una densidad de 35.000 células por pocillo y se transfectaron mediante electroporación con concentraciones 156,25 nM, 312,5 nM, 625 nM, 1.250 nM 2.500 nM, 5.000 nM, 10.000 nM y 20.000 nM de oligonucleótido antisentido, tal como se especifica en la Tabla 67. Después un periodo de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm de la transtiretina mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó el juego de cebador y sonda para la transtiretina humana RTS1396 para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de la transtiretina se ajustaron según el contenido total de ARN, medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la transtiretina, con respecto a las células testigo sin tratar. Tal como se ilustra en la Tabla 67, los niveles de ARNm de la transtiretina se redujeron de manera dependiente de la dosis en los hepatocitos tratados con todos los oligonucleótidos ISIS, que presentan reactividad cruzada con el gen de la transtiretina de mono rhesus, indicado en el presente documento como SEQ ID NO: 4 (exones 1-4 extraídos del n° de registro del GENBANK NW_001105671.1).

Tabla 67

Inhibición por antisentido dependiente de la dosis de la transtiretina humana en hepatocitos primarios de mono Cynomolgus mediante electroporación										
ISIS No.	156,25 nM	312,5 nM	625 nM	1.250 nM	2.500 nM	5.000 nM	10.000 nM	20.000 nM	CI ₅₀ (µM)	Sitio de inicio diana
304299	0	0	25	42	89	95	98	99	1,4	504
420913	0	0	42	49	84	96	98	98	1,2	502
420915	0	8	46	58	84	94	97	99	1	505
420921	0	0	26	30	53	74	94	97	2	512
420922	4	0	13	29	38	69	87	97	2,9	513
420950	23	27	60	71	88	94	98	98	0,6	577
420955	19	0	25	50	74	86	93	97	1,4	582
420957	0	0	15	34	65	72	87	94	2,2	584
420959	3	12	10	37	71	88	94	94	1,5	586

Ejemplo 22: medición de la viscosidad de los oligonucleótidos antisentido ISIS dirigidos a la transtiretina humana

Se midió la viscosidad de los oligonucleótidos antisentido de los estudios descritos en el Ejemplo 21 con el objetivo de excluir los oligonucleótidos antisentido con una viscosidad superior a 40 cP. Los oligonucleótidos con una viscosidad superior a 40 cP serían demasiado viscosos para administrarse a cualquier sujeto.

Los oligonucleótidos ISIS (32 mg-35 mg) se pesaron en un vial de vidrio, se añadieron 120 µl de agua y el oligonucleótido antisentido se disolvió hasta obtener una solución calentando el vial a 50°C. Parte (75 µl) de la muestra precalentada se pipeteó a un microviscosímetro (Cambridge). La temperatura del microviscosímetro se fijó a 25°C y se midió la viscosidad de la muestra. Otra parte (20 µl) de la muestra precalentada se pipeteó en 10 ml de agua para la lectura UV a 260 nM a 85°C (instrumento Cary UV). Los resultados se presentan en la Tabla 68 e indican que todas las soluciones de oligonucleótidos antisentido son óptimas en cuanto a su viscosidad conforme al criterio indicado anteriormente.

Tabla 68

Viscosidad y concentración de los oligonucleótidos antisentido ISIS dirigidos a la transtiretina humana		
ISIS No.	Viscosidad (cP)	Concentración (mg/ml)
304299	9,9	169
420913	6,5	178
420915	8,4	227
420921	8,2	234
420922	5,3	191
420950	12,5	297
420955	15,7	259
420957	12,9	233
420959	18,7	276

Ejemplo 23: medición de la semivida del oligonucleótido antisentido en el hígado de ratón CD1

5 Se trató a ratones CD1 con los oligonucleótidos antisentido ISIS de los estudios descritos en el Ejemplo 22 y se evaluó la semivida del oligonucleótido, así como el tiempo transcurrido para la degradación y la eliminación del oligonucleótido del hígado.

Tratamiento

10 Se inyectaron a grupos de doce ratones CD1 cada uno, por vía subcutánea dos veces por semana durante 2 semanas, 50 mg/kg de ISIS 420913, ISIS 420921, ISIS 420922, ISIS 420950, ISIS 420955, ISIS 420957 e ISIS 420959. Se sacrificó a cuatro ratones de cada grupo 3 días, 28 días y 56 días después de la dosis final. Los hígados se recolectaron para su análisis.

Medición de la concentración de oligonucleótido

15 Se midió la concentración del oligonucleótido de longitud completa, así como la concentración total de oligonucleótido (incluida la forma degradada). El método utilizado es una modificación de los métodos publicados anteriormente (Leeds *et al.*, 1996 Geary *et al.*, 1999) que consiste en una extracción con fenol-cloroformo (líquido-líquido) seguida de una extracción en fase sólida. Antes de la extracción se añadió un patrón interno (ISIS 355868, un oligonucleótido fosforotioato modificado 2'-O-metoxietilado 27-mero, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTTT, indicado en el presente documento como SEQ ID NO: 166). Las concentraciones de la muestra de tejido se calcularon mediante curvas de calibración, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de aproximadamente 1,14 µg/g. A continuación, se calcularon las semividas mediante el software WinNonlin (PHARSIGHT).

20 Los resultados se presentan en la Tablas 6, expresados como µg/g de tejido hepático. La semivida de cada oligonucleótido se presenta en la Tabla 70.

Tabla 69

Concentración de oligonucleótido de longitud completa (µg/g) en el hígado de ratones CD1			
ISIS No.	3 días	28 días	56 días
420913	243	109	33
420921	225	49	6
420922	310	129	53
420950	254	88	62
420955	308	137	79
420957	325	129	49
420959	258	97	37

Tabla 70

Semivida del oligonucleótido (días) en el hígado de ratones CD1	
ISIS No.	Semivida (días)
420913	18,5
420921	10,0
420922	20,7
420950	26,4
420955	27,2
420957	19,5
420959	18,9

Ejemplo 24: efecto de los oligonucleótidos antisentido ISIS dirigidos a la transtiretina humana en monos Cynomolgus

55 Se trató a monos Cynomolgus con los oligonucleótidos antisentido ISIS de los estudios descritos en los Ejemplos 21, 22 y 23. Se evaluaron la eficacia y la tolerabilidad de los oligonucleótidos antisentido, así como su perfil farmacocinético en el hígado y el riñón.

Tratamiento

60 Antes del estudio, se mantuvo a los monos en cuarentena durante un período de tiempo de 30 días, durante el cual se llevaron a cabo los perfiles hematológico y de química sanguínea convencionales, el examen de

muestras fecales en busca de huevos y parásitos, y una prueba de la tuberculosis, para excluir a los monos enfermos o con anomalías. Se inyectaron a nueve grupos de cuatro monos *Cynomolgus* macho asignados aleatoriamente cada uno, por vía subcutánea tres veces por semana durante la primera semana y, posteriormente, dos veces a la semana durante las siguientes 11 semanas, 25 mg/kg de ISIS 304299, ISIS 420915, ISIS 420921, ISIS 420922, ISIS 420950, ISIS 420955, ISIS 420957 o ISIS 420959. Se inyectó PBS a un grupo testigo de 4 monos *Cynomolgus*, por vía subcutánea tres veces por semana durante la primera semana y, posteriormente, dos veces a la semana durante las siguientes 11 semanas. Se recogieron muestras de sangre 5 días antes del tratamiento, así como en varios días del período de estudio, y se analizaron. Los animales se mantuvieron en ayunas durante al menos 13 horas (una noche) antes de la recogida de sangre. Los sacrificios al final del estudio de todos los grupos se llevaron a cabo el día 86, que fue 48 horas después de la última dosis.

Durante el período de estudio, se observó a los monos diariamente para detectar signos de enfermedad o sufrimiento. Se retiró a cualquier animal que mostrase efectos adversos al tratamiento, y se envió al veterinario y al director del estudio. Todos los animales tratados con ISIS 420955 se retiraron del estudio el día 31 debido a los síntomas de enfermedad que presentaron 2 monos del grupo. Del mismo modo, un mono de cada uno de los grupos tratados con ISIS 420957 e ISIS 420950 se retiró del estudio los días 44 y 76, respectivamente, por la presencia de signos de enfermedad.

Estudios de inhibición

Análisis de ARN

El día 86, se extrajo el ARN del tejido hepático para el análisis PCR en tiempo real de la transtiretina utilizando el juego de cebador y sonda RTS3029. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la transtiretina, con respecto al testigo con PBS, normalizados con respecto a la ciclofilina. Se obtuvieron resultados similares al ser normalizados con RIBOGREEN®. Tal como se muestra en la Tabla 71, el tratamiento con los oligonucleótidos antisentido ISIS dio como resultado una reducción significativa del ARNm de la transtiretina en comparación con el testigo con PBS. En concreto, el tratamiento con ISIS 420915 provocó una mayor inhibición del ARNm de la TTR que el tratamiento con ISIS 304299, a pesar de que los dos oligonucleótidos difieren entre sí en un solo cambio de pares de bases. Los datos para los animales tratados con ISIS 420955 se recogieron el día 31.

Tabla 71

Inhibición del ARNm de la transtiretina en el hígado de mono <i>Cynomolgus</i> con respecto al testigo con PBS	
ISIS No	% de inhibición
304299	59
420915	78
420921	54
420922	61
420950	91
420955*	79
420957	64
420959	55
(*Datos del día 31)	

Análisis de proteínas

Se mantuvo a los monos en ayunas durante la noche antes de la recogida de sangre. Se recogió aproximadamente 1 ml de sangre de todos los animales disponibles y se colocó en tubos que contenían la sal potásica del EDTA. Se centrifugaron los tubos (3.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente) para obtener el plasma. Los niveles proteicos de transtiretina se midieron en el plasma con un analizador clínico. Las muestras de plasma se tomaron predosis (el día -5) y los días 1, 9, 16, 23, 30, 44, 58, 72 y 86. Los resultados se presentan en la Tabla 72, expresados como porcentaje de inhibición en comparación con los niveles predosis, y demuestran una reducción dependiente del tiempo de los niveles de proteína con el tratamiento con los oligonucleótidos ISIS. Los niveles plasmáticos finales de TTR se presentan en la Tabla 73, y demuestran la fuerte correlación entre la reducción del nivel proteico de TTR y la inhibición del ARNm de la TTR (Tabla 71). En concreto, el tratamiento con ISIS 420915 provocó una mayor inhibición de la proteína plasmática TTR que el tratamiento con ISIS 304299 (inhibición del 76% frente a una inhibición del 47%), a pesar de que los dos oligonucleótidos difieren entre sí en un solo cambio de pares de bases.

Tabla 72

Cronología de la reducción del nivel proteico de transtiretina en el plasma de mono <i>Cynomolgus</i> con respecto a los niveles predosis									
ISIS No.	Día 0	Día 9	Día 16	Día 23	Día 30	Día 44	Día 58	Día 72	Día 86
304299	4	15	21	23	26	27	31	38	47

420915	2	8	23	34	42	54	63	70	76
420921	5	11	21	31	23	27	30	40	50
420922	0	17	37	42	49	49	50	49	54
420950	0	39	63	68	72	79	85	82	87
420955	0	42	63	80	81	n/d	n/d	n/d	n/d
420957	2	18	28	26	26	35	35	41	50
420959	0	25	29	28	32	38	42	43	50

n/d= el estudio terminó el día 31 para los animales tratados con ISIS 420955; por lo tanto no hay datos disponibles para los días posteriores.

Tabla 73

Reducción del nivel proteico de transtiretina en el plasma de mono Cynomolgus, el día 86, con respecto a los niveles predosis	
ISIS No.	% de reducción
304299	47
420915	76
420921	50
420922	54
420950	87
420957	50
420959	50

También se midieron en el plasma los niveles proteicos de RBP4 utilizando un kit de ELISA. Las muestras de plasma se tomaron predosis (el día -5) y los días 9, 16, 23, 30, 44, 58, 72 y 86. Los resultados se presentan en la Tabla 74, expresados como porcentaje de inhibición en comparación con los niveles predosis. Algunos de los oligonucleótidos ISIS (ISIS 420915, ISIS 420922, ISIS 420950, ISIS 420955 e ISIS 420959) demostraron una reducción dependiente del tiempo de los niveles de proteína, concomitante con la reducción de TTR. Los niveles plasmáticos finales de RBP4 se presentan en la Tabla 75 y también demuestran la fuerte correlación entre las reducciones del nivel proteico de TTR y RBP4 (Tabla 73) al tratarse con los oligonucleótidos anteriormente mencionados. En concreto, el tratamiento con ISIS 420915 provocó una mayor inhibición de la proteína plasmática RBP4 que el tratamiento con ISIS 304299 (inhibición del 63% frente a una inhibición del 19%), a pesar de que los dos oligonucleótidos difieren entre sí en un solo cambio de pares de bases.

Tabla 74

Cronología de la reducción del nivel proteico de RBP4 en el plasma de mono Cynomolgus con respecto a los niveles predosis								
ISIS No.	Día 9	Día 16	Día 23	Día 30	Día 44	Día 58	Día 72	Día 86
304299	0	6	10	4	1	9	13	19
420915	5	22	22	30	38	47	54	63
420921	0	0	0	0	0	0	6	24
420922	4	19	16	34	33	29	15	32
420950	30	44	46	47	52	54	47	48
420955	6	36	53	65	n/d	n/d	n/d	n/d
420957	0	10	0	0	0	0	3	27
420959	18	22	14	17	19	25	22	34

n/d= el estudio terminó el día 31 para los animales tratados con ISIS 420955; por lo tanto no hay datos disponibles para los días posteriores.

Tabla 75

Reducción del nivel proteico de RBP4 en el plasma de mono Cynomolgus, el día 86, con respecto a los niveles predosis	
ISIS No.	% de reducción
304299	19
420915	63
420921	24
420922	32
420950	48

420957	27
420959	34

5 Estudios de tolerabilidad

Mediciones del peso corporal y de los órganos

10 Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la salud general de los animales, se midieron los pesos corporales y de los órganos el día 86. Los datos para los animales tratados con ISIS 420955 se recogieron el día 31. Los pesos corporales se midieron y se compararon con aquellos a niveles predosis. Se midieron los pesos de los órganos, y los pesos de los grupos de tratamiento se compararon con los correspondientes pesos del testigo con PBS. Los datos se presentan en la Tabla 76.

15 **Tabla 76**

Cambios porcentuales del peso final corporal y de los órganos en el mono Cynomolgus con respecto a los niveles predosis				
ISIS No.	Peso corporal	Peso del hígado	Peso de riñón	Peso del bazo
304299	+6	+27	+37	+53
420915	+6	+37	+26	+41
420921	+4	+42	+43	+22
420922	+4	+45	+39	+63
420950	0	+204	+166	+297
420955	-3	+36	+81	+70
420957	-6	+55	+184	+109
420959	0	+57	+101	+112
(*Datos del día 31)				

30

Función hepática

35 Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se recogieron muestras de sangre de todos los grupos de estudio. Las muestras de sangre se recogieron en tubos sin anticoagulante para la separación del suero. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 90 minutos y, a continuación, se centrifugaron (3.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente) para obtener el suero. Se midieron las concentraciones de aminotransferasas con un analizador de química Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Japón). El día 86 se midieron las concentraciones plasmáticas de ALT (alanina aminotransferasa) y AST (aspartato aminotransferasa), y los resultados se presentan en la Tabla 77, expresados en IU/l. La fosfatasa alcalina, que es sintetizada en mayores cantidades por las células hepáticas dañadas, también es un marcador de enfermedad hepática, y se midió de manera similar. La proteína C-reactiva (CRP), que se sintetiza en el hígado y que sirve de marcador de la inflamación, también se midió de manera similar el día 86. Los datos de la fosfatasa alcalina y de la CRP se presentan también en la Tabla 77. La bilirrubina también es un marcador metabólico hepático y se midió de manera similar, y se presenta en la Tabla 77, expresada en mg/dl.

45 **Tabla 77**

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores metabólicos hepáticos en plasma de mono Cynomolgus					
	AST (IU/l)	ALT (IU/l)	ALP (IU/l)	CRP (mg/l)	Bilirrubina (m/dl)
PBS	60	54	955	2,4	0,24
ISIS 304299	81	101	747	3,3	0,17
ISIS 420915	68	62	672	1,6	0,15
ISIS 420921	98	107	832	3,2	0,14
ISIS 420922	94	96	907	2,4	0,15
ISIS 420950	132	94	1032	12,9	0,11
ISIS 420957	100	73	868	23,5	0,15
ISIS 420959	70	63	811	16,0	0,13

60

Función renal

65 Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se recogieron muestras de sangre de todos los grupos de estudio. Las muestras de sangre se recogieron en tubos sin anticoagulante para la separación del suero. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 90 minutos y, a continuación, se centrifugaron (3.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente) para obtener el suero. El día 86 se midieron

las concentraciones de BUN y creatinina con un analizador de química Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Japón). Los resultados se presentan en la Tabla 78, expresados en mg/dl.

Se recogieron muestras de orina mediante drenaje desde unas bandejas para jaula especiales de acero inoxidable el día 5 antes del estudio y, posteriormente, los días 25 y 84. Se midió la relación entre proteína y creatinina total en orina con un analizador de química Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Japón), y los resultados se presentan en la Tabla 79.

Tabla 78

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los niveles plasmáticos de BUN y creatinina (mg/dl) en monos Cynomolgus		
	BUN	Creatinina
PBS	28	0,86
ISIS 304299	27	0,85
ISIS 420915	25	0,90
ISIS 420921	33	0,99
ISIS 420922	28	0,86
ISIS 420950	36	0,97
ISIS 420957	35	0,86
ISIS 420959	27	0,89

Tabla 79

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre la relación entre proteína y creatinina en orina en monos Cynomolgus			
	Día -5	Día 25	Día 84
PBS	0,003	0,01	0,00
ISIS 304299	0,000	0,01	0,00
ISIS 420915	0,003	0,00	0,00
ISIS 420921	0,033	0,13	0,09
ISIS 420922	0,010	0,05	0,02
ISIS 420950	0,008	0,29	0,21
ISIS 420955	0,000	0,61	n/d
ISIS 420957	0,000	0,48	0,36
ISIS 420959	0,005	0,08	0,03

n/d= el estudio terminó el día 31 para los animales tratados con ISIS 420955; por lo tanto no hay datos disponibles para los días posteriores.

Hematología

Para evaluar cualquier efecto inflamatorio de los oligonucleótidos ISIS en los monos Cynomolgus, se recogieron muestras de sangre de aproximadamente 0,5 ml de sangre de cada uno de los animales del estudio disponibles en tubos que contenían la sal potásica del EDTA. Se analizaron las muestras para el recuento de glóbulos rojos (RBC), el recuento de glóbulos blancos (WBC), los porcentajes de glóbulos blancos individuales, tales como los de monocitos, neutrófilos, linfocitos, así como para el recuento de plaquetas y el hematocrito (%), utilizando un analizador hematológico ADVIA120 (Bayer, EE.UU.). Los datos se presentan en la Tabla 80.

Tabla 80

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los parámetros hematológicos en monos Cynomolgus							
	WBC (x 10³/μl)	RBC (x 10⁶/μl)	Plaquetas (x 1.000/μl)	Hematocrito (%)	Linfocitos (%)	Neutrófilos (%)	Monocitos (%)
PBS	9,6	5,3	415	40	62	35	1,8
ISIS 304299	11,6	5,2	395	38	68	26	3,1
ISIS 420915	10,3	5,1	382	36	72	22	3,5
ISIS 420921	9,8	5,2	385	36	60	34	2,5
ISIS 420922	11,6	5,2	396	37	62	29	5,4
ISIS 420950	13,7	4,4	260	33	51	34	7,8
ISIS 420957	18,6	4,7	298	33	52	35	9,1
ISIS 420959	7,7	4,8	306	32	62	29	5,5

Análisis de los factores de inflamación

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre los factores implicados en la inflamación, el día 86 se recogió sangre de todos los animales disponibles para el análisis del complemento C3, así como para la medición de los niveles de citocinas. Para el análisis del complemento C3, se recogieron muestras de sangre en tubos sin anticoagulante para la separación del suero. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 90 minutos y, a continuación, se centrifugaron (3.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente) para obtener el suero. Se midió el complemento C3 con un analizador automático (analizador de química Toshiba 200 FR NEO, Toshiba co., Japón). Los datos se presentan en la Tabla 81, expresados en mg/dl.

Para los análisis del nivel de citocinas, se recogió sangre en tubos que contenían EDTA para la separación del plasma. A continuación, se centrifugaron los tubos (3.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente) para obtener el plasma. Las muestras de plasma se enviaron a Aushon Biosystems Inc. (Billerica, MA) para la medición de los niveles de quimiocinas y citocinas. Los niveles de TNF- α se midieron mediante los respectivos anticuerpos de primate, y los niveles de MIP-1 α , MCP-1 y MIP-1 β se midieron mediante los respectivos anticuerpos humanos con reactividad cruzada. Las mediciones se tomaron 5 días antes del inicio del tratamiento y los días 3 y 86. Los resultados se presentan en las Tablas 82-85.

Tabla 81

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el complemento C3 (mg/dl) en monos Cynomolgus	
	C3
PBS	133
ISIS 304299	96
ISIS 420915	104
ISIS 420921	91
ISIS 420922	102
ISIS 420950	70
ISIS 420957	69
ISIS 420959	95

Tabla 82

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre MCP-1 (pg/ml) en monos Cynomolgus			
	Día -5	Día 3	Día 86
PBS	232	362	206
ISIS 304299	219	292	427
ISIS 420915	204	342	400
ISIS 420921	281	407	2120
ISIS 420922	215	482	838
ISIS 420950	170	370	3355
ISIS 420957	208	308	3485
ISIS 420959	237	715	2035

Tabla 83

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre TNF- α (pg/ml) en monos Cynomolgus			
	Día -5	Día 3	Día 86
PBS	60	46	16
ISIS 304299	46	35	24
ISIS 420915	113	83	30
ISIS 420921	57	50	56
ISIS 420922	30	59	46
ISIS 420950	48	54	266
ISIS 420957	29	33	87
ISIS 420959	22	77	74

Tabla 84

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre MIP-1 (pg/ml) en monos Cynomolgus			
	Día -5	Día 3	Día 86
PBS	6	7	7
ISIS 304299	6	7	9
ISIS 420915	5	5	10
ISIS 420921	8	11	9
ISIS 420922	9	8	5
ISIS 420950	7	9	5
ISIS 420957	6	6	6
ISIS 420959	9	6	5

Tabla 85

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre MIP-1 (pg/ml) en monos Cynomolgus			
	Día -5	Día 3	Día 86
PBS	13	19	42
ISIS 304299	17	23	54
ISIS 420915	15	27	72
ISIS 420921	23	43	112
ISIS 420922	9	41	70
ISIS 420950	8	25	126
ISIS 420957	16	27	182
ISIS 420959	36	46	117

Ensayos de coagulación

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre los factores implicados en la cascada de la coagulación, se emplearon las pruebas de coagulación convencionales. Se midieron el PT y aPTT utilizando plasma pobre en plaquetas (PPP) de los monos durante un periodo de 48 horas. Los valores de PT y aPTT se proporcionan en las Tablas 86 y 87, y se expresan en segundos. También se cuantificaron los niveles de fibrinógeno en el plasma durante un período de 48 horas, y los datos se presentan en la Tabla 88. Tal como se muestra en las Tablas 86-88, PT, aPTT y fibrinógeno no se modificaron significativamente en los monos tratados con oligonucleótidos ISIS en comparación con el testigo con PBS.

Tabla 86

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el PT (seg.)						
	0 hr	1 hr	4 hr	8 hr	24 hr	48 hr
PBS	10,08	10,38	10,10	10,33	9,83	9,40
ISIS 304299	10,38	10,30	10,48	10,20	9,95	9,53
ISIS 420915	10,15	10,13	10,38	9,93	9,75	9,48
ISIS 420921	10,28	10,13	10,43	10,18	9,80	9,55
ISIS 420922	9,95	10,00	10,05	9,70	9,48	9,28
ISIS 420950	10,30	10,47	10,57	10,27	9,63	9,50
ISIS 420957	10,63	10,47	10,60	10,77	10,33	10,27
ISIS 420959	10,08	10,10	10,20	10,15	9,80	9,55

Tabla 87

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el aPTT (seg.)						
	0 hr	1 hr	4 hr	8 hr	24 hr	48 hr
PBS	19,40	19,70	20,13	20,20	19,43	17,30
ISIS 304299	21,83	24,35	27,05	25,73	22,40	18,78
ISIS 420915	20,05	22,83	23,83	24,00	21,78	17,90
ISIS 420921	24,15	26,68	31,78	31,90	27,80	22,15
ISIS 420922	25,28	29,48	34,83	33,90	29,13	25,08
ISIS 420950	28,13	31,40	35,40	35,40	31,40	28,37
ISIS 420957	29,13	33,27	39,13	37,40	36,50	29,93
ISIS 420959	22,45	24,73	29,18	28,38	25,50	20,65

Tabla 88

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el fibrinógeno (mg/dl)						
	0 hr	1 hr	4 hr	8 hr	24 hr	48 hr
PBS	212	203	240	247	282	272
ISIS 304299	175	172	198	207	227	200
ISIS 420915	213	196	204	258	257	215
ISIS 420921	208	209	230	237	301	249
ISIS 420922	278	277	335	338	400	304
ISIS 420950	293	295	348	376	390	296
ISIS 420957	280	299	344	330	434	328
ISIS 420959	276	277	354	326	414	320

Análisis de las pruebas tiroideas

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre las hormonas tiroideas, se mantuvo a los monos en ayunas durante la noche y se extrajeron 3,5 ml de sangre de cada uno de los animales del estudio disponibles 5 días antes del inicio del tratamiento y los días 51 y 86. Las muestras de sangre recogidas se mantuvieron en tubos sin anticoagulante para la separación del suero. Los tubos se mantuvieron durante 90 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual se centrifugaron (3.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente) para obtener el suero. Las muestras de suero se enviaron al laboratorio Biomarkers Core Laboratory de la Universidad de Emory (Atlanta, GA) para el análisis de las pruebas tiroideas. Los resultados para la hormona estimuladora de la tiroides (TSH) se proporcionan en la Tabla 89 y se expresan en $\mu\text{l/ml}$. Los resultados para la hormona T3 total y libre se proporcionan en las Tablas 90 y 91. Los resultados para la hormona T4 total y libre se proporcionan en las Tablas 92 y 93. En general, el análisis de las pruebas tiroideas mostró que todos los animales se mantuvieron dentro de los niveles hormonales aceptables aunque los niveles de expresión de transtiretina se redujeron, lo que demuestra que los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la transtiretina no influían en los niveles hormonales.

Tabla 89

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre la TSH ($\mu\text{l/ml}$)			
	Día -5	Día 51	Día 86
PBS	0,8	0,7	1,0
ISIS 304299	1,4	1,0	2,2
ISIS 420915	1,4	1,5	2,5
ISIS 420921	0,7	0,6	1,0
ISIS 420922	1,0	1,2	1,9
ISIS 420950	0,6	2,2	5,4
ISIS 420957	0,6	2,6	4,9
ISIS 420959	0,9	1,6	4,7

Tabla 90

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre la T3 total (ng/dl)			
	Día -5	Día 51	Día 86
PBS	177	248	140
ISIS 304299	202	226	176
ISIS 420915	156	206	156
ISIS 420921	217	204	137
ISIS 420922	188	177	131
ISIS 420950	260	208	105
ISIS 420957	266	160	78
ISIS 420959	299	219	137

Tabla 91

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre la T3 libre (pg/ml)			
	Día -5	Día 51	Día 86
PBS	7,7	5,8	5,2
ISIS 304299	9,2	6,0	4,7
ISIS 420915	8,9	5,6	4,5
ISIS 420921	10,2	4,8	4,0

ISIS 420922	8,9	5,4	3,7
ISIS 420950	7,2	3,8	2,1
ISIS 420957	8,8	4,0	2,4
ISIS 420959	8,3	4,9	3,3

Tabla 92

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre la T4 total (ng/dl)			
	Día -5	Día 51	Día 86
PBS	5,8	4,9	4,4
ISIS 304299	8,1	5,5	6,1
ISIS 420915	8,3	5,7	5,5
ISIS 420921	7,6	6,1	5,6
ISIS 420922	7,3	6,1	5,8
ISIS 420950	6,1	6,3	5,7
ISIS 420957	6,3	4,4	5,0
ISIS 420959	7,9	5,9	8,1

Tabla 93

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre la T4 libre (pg/ml)			
	Día -5	Día 51	Día 86
PBS	3,4	2,4	1,7
ISIS 304299	3,2	2,5	1,7
ISIS 420915	5,0	1,8	1,7
ISIS 420921	2,6	1,5	1,5
ISIS 420922	3,5	1,6	1,5
ISIS 420950	2,5	1,2	1,1
ISIS 420957	2,4	1,2	1,2
ISIS 420959	3,8	1,4	1,5

Estudios farmacocinéticos

Medición de la concentración de oligonucleótido

Se midió la concentración del oligonucleótido de longitud completa, así como la concentración total de oligonucleótido (incluida la forma degradada). El método utilizado es una modificación de los métodos publicados anteriormente (Leeds *et al.*, 1996; Geary *et al.*, 1999) que consiste en una extracción con fenol-cloroformo (líquido-líquido) seguida de una extracción en fase sólida. Antes de la extracción se añadió un patrón interno (ISIS 355868, un oligonucleótido fosforotioato modificado 2'-O-metoxietilado 27-mero, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTT, indicado en el presente documento como SEQ ID NO: 166). Las concentraciones de la muestra de tejido se calcularon mediante curvas de calibración, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de aproximadamente 1,14 µg/g. Se calculó la relación entre las concentraciones en el riñón y en el hígado. Los resultados se presentan en las Tablas 94 y 95, expresados como µg/g de tejido.

Tabla 94

Concentración de oligonucleótido de longitud completa (µg/g) en el hígado de mono Cynomolgus			
ISIS No.	Riñón	Hígado	Relación riñón/hígado
304299	2179	739	2,9
420915	2439	1064	2,3
420921	4617	1521	3,0
420922	3957	1126	3,5
420950	3921	1082	3,6
420955	2444	1111	2,2
420957	3619	1230	2,9
420959	3918	1158	3,4

Tabla 95

Concentración total de oligonucleótido (µg/g) en el hígado de mono <i>Cynomolgus</i>			
ISIS No.	Riñón	Hígado	Relación riñón/hígado
304299	3098	992	3,1
420915	3024	1266	2,4
420921	6100	1974	3,1
420922	4861	1411	3,4
420950	6003	1553	3,9
420955	2763	1208	2,3
420957	5420	1582	3,4
420959	5498	1501	3,7

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc. Brett P. Monia Susan M. Freier Andrew M. Siwkowski

<120> MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TRANSTIRETINA

<130> BIOL0123WO

<150> 61/329.538
<151> 29-04-2010

<150> 61/405.163
<151> 20-10-2010

<160> 177

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1
<211> 650
<212> ADN
<213> *H. sapiens*

<400> 1

```

acagaagtcc actcattott ggcaggatgg attotcatcg tctgctcctc ctctgccttg 60
ctggactggg atttgtgtct gaggctggcc ctacggggcac cggatgaatcc aagtgtcctc 120
tgatgggtcaa agttctagat gctgtccgag gcagtcctgc catcaatgtg gccgtgcatg 180
tgttcagaaa ggctgctgat gacacctggg agccatttgc ctctgggaaa accagtgagt 240
ctggagagct gcatgggctc acaactgagg aggaatttgt agaagggata taaaagtgg 300
aaatagacac caaatcttac tggaaggcac ttggcatctc cccattccat gagcatgcag 360
aggtggtatt cacagccaac gactccggcc cccgccgcta caccattgcc gccctgctga 420
gcccctactc ctattccacc acggctgtcg tcaccaatcc caaggaatga gggacttctc 480
ctccagtgga cctgaaggac gagggatggg atttcatgta accaagagta ttccattttt 540
actaaagcag tgttttcacc tcatatgcta tgttagaagt ccaggcagag acaataaaac 600
attcctgtga aaggcacttt tcattccaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 650
    
```

<210> 2
<211> 8054
<212> ADN
<213> *H. sapiens*

<400> 2

ES 2 625 689 T3

5	ttgttgaccc	atggatccat	caagtgcaaa	cattttctaa	tgcactatat	ttaagcctgt	60
	gcagctagat	gtcattcaac	atgaaataca	ttattacaac	ttgcatctgt	ctaaaatcct	120
	gcatctaaaa	tgagagacaa	aaaatctata	aaaatggaaa	acatgcatag	aaatatgtga	180
	gggaggaaaa	aattaccccc	aagaatgta	gtgcacgcag	tcacacaggg	agaagactat	240
	ttttgttttg	ttttgattgt	tttgttttgt	tttggttgtt	ttgttttggt	gacctaactg	300
10	gtcaaatgac	ctattaagaa	tatttcatag	aacgaatggt	ccgatgctct	aatctctcta	360
	gacaaggttc	atatttgtat	gggttactta	ttctctcttt	gttgactaag	tcaataatca	420
	gaatcagcag	gtttgcagtc	agattggcag	ggataagcag	cctagctcag	gagaagtgag	480
	tataaaagcc	ccaggctggg	agcagccatc	acagaagtcc	actcattcct	ggcaggatgg	540
	cttctcatcg	tctgctcctc	ctctgccttg	ctggactggg	atgtgtgtct	gaggctggcc	600
15	ctacggtgag	tgtttctgtg	acatcccatt	cctacattta	agattcacgc	taaatgaagt	660
	agaagtgact	ccttccagct	ttgccaacca	gcttttatta	ctagggcaag	ggtacccagc	720
	atctattttt	aatataatta	attcaaactt	caaaaagaat	gaagttccac	tgagcttact	780
	gagctgggac	ttgaactctg	agcattctac	ctcattgctt	tggtgcatta	ggtttgaat	840
	atctgggtacc	tctgtttcct	cagatagatg	atagaaataa	agatatgata	ttaaggaagc	900
20	tgtaataact	gaattttcag	aaaagtatcc	ctccataaaa	tgtatttggg	ggacaaaactg	960
	caggagatta	tattctggcc	ctatagttat	tcaaaacgta	tttattgatt	aatctttaa	1020
	aggcttagtg	aacaatattc	tagtcagata	tctaattcct	aatcctcta	gaagaattaa	1080

25

30

35

40

45

50

55

60

65

5	ctaatactat	aaaatgggtc	tggatgtagt	tctgacatta	ttttataaca	actggtaaga	1140
	gggagtgact	atagcaacaa	ctaaaatgat	ctcaggaaaa	cctgtttggc	cctatgtatg	1200
	gtacattaca	tcttttcagt	aattccactc	aaatggagac	ttttaacaaa	gcaactgttc	1260
	tcaggggacc	tattttctcc	cttaaaattc	attatacaca	tccttggttg	atagcagtg	1320
	gtctggaggc	agaaaccatt	cttgctttgg	aaacaattac	gtctgtgta	tactgagtag	1380
	ggaagctcat	taattgtcga	cacttacgtt	cctgataatg	ggatcagtg	gtaattcttg	1440
10	tttcgctcca	gatttcta	accacaaaga	ataaatcctt	tcaactctgat	caattttg	1500
	aacttctcac	gtgtcttctc	tacaccagg	gcaccgggtga	atccaagtgt	cctctgatgg	1560
	tcaaagtctc	agatgctgtc	cgaggcagtc	ctgccatcaa	tgtggcctg	catgtgttca	1620
	gaaaggctgc	tgatgacacc	tgggagccat	ttgcctctgg	gtaagttgcc	aaagaaccct	1680
	cccacaggac	ttggttttat	cttcccgttt	gcccctcact	tggtagagag	aggctcacat	1740
	catctgctaa	agaatttaca	agttagattga	aaaacgtagg	cagagggtcaa	gtatgccctc	1800
15	tgaatgcctg	cctctttttg	tttgcttag	ctgggaagtg	accaggaacc	tgagtttca	1860
	ttaggggcag	acagtagaga	aaagaaggaa	tcagaactcc	tctcctctag	ctgtggtttg	1920
	caaccctttt	gggtcacaga	acactttatg	taggtgatga	aaagtaacaa	ttctatgccc	1980
	agaaaaatg	cacagataca	cacacataca	aaatcatata	tgtgatttta	ggagtttca	2040
	agattccctg	gtgtccctgg	gtaaacacaa	agttaagtgt	cctgtctta	gaattttagg	2100
20	aaaaggtata	atgtgtatta	accattaac	aaaaggaaag	gaattcagaa	atattattaa	2160
	ccaggcatct	gtctgtagtt	aatatggatc	acccaaaacc	caaggctttt	gcctaataaa	2220
	cactttgggg	cacctactgt	gtgcaaggct	gggggctgtc	aagctcagtt	aaaaaaaaaa	2280
	agatagaaga	gatggatcca	tgaggcaaaag	tcagcccca	ggctaataccc	acgatcacc	2340
	gacttcatgt	ccaagagtgg	cttctcacct	tcattagcca	gttcacaatt	ttcatggagt	2400
	ttttctacct	gcactagcaa	aaacttcaag	gaaaatacat	attaataaat	ctaagcaaaag	2460
25	tgaccagaag	acagagcaat	caggagacc	tttgcatcca	gcagaagagg	aactgtcaag	2520
	tatttacatc	tccacagaga	agaatttctg	ttgggtttta	attgaacccc	aagaaccaca	2580
	tgattcttca	accattatg	ggaagatcat	tttcttaggt	ctggttttaa	ctggcttttt	2640
	atttgggaat	tcatttatgt	ttatataaaa	tgccaagcat	aacatgaaaa	gtggttacag	2700
	gactattcta	agggagagac	agaatggaca	ccaaaatata	tccaatgttc	ttgtgaatct	2760
	tttcttgc	ccaggacaaa	aaaaaaaaaga	agtgaaaaga	agaaaggagg	aggggcataa	2820
30	tcagagtcag	taaagacaac	tgctattttt	atctatcgta	gctgttgca	tcaaatggga	2880
	agcaatttcc	aacattcaac	tatggagctg	gtacttcat	ggaaatagaa	gttgccatgt	2940
	gtttgttct	ggcaaagagt	tatcagagag	gttaaatata	taaaagggaa	aagctcaga	3000
	tacaggttct	tcttctact	ttaggttttc	cactgtgtgt	gcaaatgata	atcctggtg	3060
	gtgtgcaat	gcctcaaaag	tatcctcaca	ccacaagggg	gaggagcgag	atcctgctgt	3120
	cctggagaag	tgcaaggtta	gaacagctgt	ggccacttgc	atccaatcat	caatctgaa	3180
35	tcacagggc	tctttctaa	gtaaacatta	tacctggcct	ggcacgggtg	ctcacgctc	3240
	taatcccagc	actttgggat	gccaaagtgg	gcatatcatc	tgaggtcagg	agttcaagac	3300
	cagcctggcc	aacatggcaa	aactccgtct	ttatgaaaaa	tacaaaaatt	agccaggcat	3360
	gggtggcagg	gcctgtaatc	ccagctaatt	gggaggctga	ggctggagaa	tccttgaat	3420
	ctaggaggca	gaggttgca	tgagctgaga	tcgtgccatt	gcactccagc	ctgggtgaca	3480
40	agagtaaaac	tctgtctcaa	aaaaaaaaaa	ttatacctac	attctcttct	tatcagagaa	3540
	aaaaatctac	agtgagcttt	tcaaaaagtt	ttacaaaact	ttttgccatt	taatttcagt	3600
	taggagttt	ccctacttct	gacttagttg	aggggaaatg	ttcataacat	gtttataaca	3660
	tgttatgtg	gttagttgg	tgggggtgta	ttactttgcc	atgccatttg	ttcctccat	3720
	gcgtaactta	atccagactt	tcacacctta	taggaaaacc	agtgagctg	gagagctgca	3780
	tgggctcaca	actgaggagg	aattttgtaga	agggatatac	aaagtggaaa	tagacaccaa	3840
45	atcttactgg	aaggcacttg	gcatctcccc	attccatgag	catgcagagg	tgagtataca	3900
	gaccttcgag	ggttgttttg	gttttggtt	ttgcttttgg	cattccagga	aatgcacagt	3960
	tttactcagt	gtaccacaga	aatgtcctaa	ggaaggtgat	gaatgaccaa	aggttcctt	4020
	tcctattata	caagaaaaaa	ttcacaacac	tctgagaagc	aaatttcttt	ttgactttga	4080
	tgaaaaatcca	cttagtaaca	tgacttgaac	ttacatgaaa	ctactcatag	tctattcatt	4140
	ccactttata	tgaatattga	tgatctgct	gttgaataaa	tagtttatga	ggcagccctc	4200
50	cagacccccac	gtagagtgt	tgtaacaaga	gatgcacat	tttatttctc	gaaaaccogt	4260
	aacattcttc	attccaaaac	acatctggct	tctcggaggt	ctggacaagt	gattcttggc	4320
	taccaagcat	acaccatgtg	gcagacacaa	ttataagtgt	gcaacacaat	agataacatt	4380
	aatcctcagg	aataagccac	tgaggctcagt	cctattatta	ttccatatt	taacctact	4440
	aaaatgaggc	accaggaagt	caaataactt	gtcaaaggtc	acaagactag	gaaatacaca	4500
55	agtagaaatg	tttacaatta	aggcccaggc	tgggtttgcc	ctcagttctg	ctatgcctcg	4560
	cattatgccc	caggaaaactt	ttcccttgt	gaaagccaag	cttaaaaaaa	gaaagccac	4620
	atltgtaacg	tgctctgttc	ccctgcctat	ggtgaggatc	ttcaaacagt	tatacatgga	4680
	cccagctccc	ctgcctctc	cttaatttct	taagtcattt	gaaacagatg	gctgtcatgg	4740
	aaatagaatc	cagacatgtt	ggtcagagtt	aaagatcaac	taattccatc	aaaaatagct	4800
	cggcatgaaa	gggaactatt	ctctggctta	gtcatggatg	agactttcaa	ttgctataaa	4860
60	gtggttctct	tattagacaa	tgttaccagg	gaaacaacag	gggtttgttt	gacttctggg	4920

5 gcccacaagt caacaagaga gcccacatcta ccaaggagca tgtccctgac taccctcag 5040
ccagcagcaa gacatggacc ccagtcaggg caggagcagg gtttcggcgg cgcccagcac 5100
aagacattgc ccctagagtc tcagccocta ccctcgagta atagatctgc ctacctgaga 5160
ctgttgtttg cccaagagct gggctcagc ctgatgggaa ccatataaaa aggttcaactg 5220
acatactgcc cacatgttgt tctctttcat tagatcttag cttocttgtc tgctcttcat 5280
10 tcttgcaagta ttcatccaac aaacattaaa aaaaaaaaaa agcatttctat gtgtggaaca 5340
ctctgctaga tgctgtggat ttagaaatga aaatacatcc cgacccttgg aatggaaggg 5400
aaaggactga agtaagacag attaagcagc accgtcagcc cagcttgaag cccagataaa 5460
tacggagaac aagagagagc gagtagtgag agatgagtc caatgcctca ctttgggtgac 5520
gggtgcgtgg tgggcttcat gcagcttctt ctgataaatg cctccttcag aactgggtcaa 5580
15 ctctaccttg gccagtgacc caggtgtgca tagtagattt accaagggaa aatgggaaact 5640
tttattagga gctcttaggc ctcttcactt catggatttt tttttccttt ttttttgaga 5700
tggagttttg ccctgtcacc caggctggaa tgcagtggtg caatctcagc tcaactgcaac 5760
ctccgcctcc caggttcaag caattctcct gcctcagcct cccgagtagc tgggactaca 5820
gggtgcgccc accacaccag gctaattttt gtattttttg taaagacagg ttttcaccac 5880
20 gttggccagg ctggtctgaa ctccagacct caggtgatcc acctgtctca gcctcccaaa 5940
gtgctgggat tacaggtgtg agccaccgtg cccggctact tcatggattt ttgattacag 6000
attatgcctc ttacaatttt taagaagaat caagtgggct gaaggtcaat gtaccataa 6060
gacaaaagac atttttatta gttgattcta gggaaattggc ctttaagggga gccctttctt 6120
cctaagagat tcttaggtga ttctcacttc ctcttgcccc agtattatth ttgtttttgg 6180
25 tatggctcac tcagatcctt ttttcctcct atccctaagt aatccgggtt tctttttccc 6240
atatttagaa caaaatgtat ttatgcagag tgtgtccaaa cctcaaccctc aggctgtat 6300
acaaaataaa tcaaatataa cacatcttta ctgtcttcta cctctttcct cctcagaata 6360
tatcccaact tgcctcactc tgagaaccaa ggctgtccca gcacctgagt cgagatatt 6420
ctactgattt gacagaactg tgtgactatc tggaaacagca ttttgatcca caatttgccc 6480
30 agttacaaaag cttaaatgag ctctagtgca tgcataatata tttcaaaatt ccaccatgat 6540
cttccacact ctgtattgta aatagagccc tgtaatgctt ttacttcgta tttcattgct 6600
tgttatacat aaaaatatac ttttcttctt catggttagaa aatgcaaaga ataggagggt 6660
gggggaatct ctgggcttgg agacaggaga ctgtcttcc tactatgggt ccatcagaat 6720
gtagactggg acaatacaat aattcaagt tggtttgctc atctgtaaat tgggaagaat 6780
35 gtttccagct ccagaatgct aaatctctaa gtctgtggtt ggcagccact attgcagcag 6840
ctcttcaatg actcaatgca gttttgcatt ctccctacct tttttttcta aaaccaataa 6900
aatagataca gcctttaggc tttctgggat ttcccttagt caagctaggg tcatcctgac 6960
tttcggcgtg aatttgcaa acaagacctg actctgtact cctgctctaa ggactgtgca 7020
tggttccaaa ggcttagctt gccagcatat ttgagctttt tcttctgtt caaactgttc 7080
40 caaaatataa aagaataaaa ttaattaagt tggcactgga ctccgggtg tcaagtcatgt 7140
gtgtcatctg tcacgttttt cgggctctgg tggaaatgga tctgtctgtc ttctctcata 7200
gggtgtattc acagccaacg actccggccc ccgcccgtac accattgccg ccctgctgag 7260
ccctactccc tattccacca cggctgtcgt caccaatccc aaggaatgag ggacttctcc 7320
tccagtgagc ctgaaggacg agggatggga tttcatgtaa ccaagagtat tccattttta 7380
45 ctaaagcagt gttttcacct catatgctat gttagaagtc caggcagaga caataaaaca 7440
ttctgtgaa aggcactttt cattccactt taacttgatt ttttaaatc ccttattgtc 7500
ccttccaaaa aaaagagaat caaaatttta caaagaatca aaggaattct agaaagtatc 7560
tgggcagaac gctaggagag atccaaattt ccattgtctt gcaagcaaag cacgtattaa 7620
atagatctg cagccattaa aaagacacat tctgtaaatg agagagcctt attttcctgt 7680
50 aaccttcagc aatagcaaaa agacacattc caagggccca ctcttttact gtgggcattt 7740
cttttttttt ctttttttct tttttccttt tttgagacaa agtctcactc tgttgcaccg 7800
gctagaatgc agtgggtgaa tctcagctca ctgcaacctc tgcttctgtg gttcaagcga 7860
ttctctgcc tcagcctccc aagtaactgg gattacaggc gcatgccacc acgcctagct 7920
catttttgta tttttagtag agatgggatt ttgccatgtt ggctaggctg gtctacgaac 7980
55 tctgacctc aggtgatcca cctgcctcag cctcccaaag tgctgggatt acagggcatga 8040
gccactacac ccgg 8054

60 <210> 3

<400> 3
000

65 <210> 4
<211> 10001
<212> ADN

ES 2 625 689 T3

<213> *Macaca mulatta*

<400> 4

5

gactctattc ctagttatgg tctcaactac attgctcat tgctgtgagg ggtgagccca 60

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

	cctcccggag	tccctcctg	cacattccta	tgttcctgaa	aggactttcc	atcccttcca	120
	ctactccctg	aaaactcctg	tgcttcatga	tttcttggtg	aattttttct	aatctgactc	180
5	tatcagttat	gggaatgttc	cctcaactct	tagtgctcca	gactggactc	gctcttggca	240
	tgtatttgtc	caaaaatattt	gtctgctcta	tgtcttctac	atatttgtct	tataaggaac	300
	aaacacctga	tttgtttatac	catgaacaaa	gccacacatg	ctagtgcaca	cgcacataca	360
	cacacacaca	tacacacaga	ggattctgta	cgtgattaat	gaatcatcaa	atcatcataa	420
	tttctggact	tgtattaata	cgctcgccag	gaggaaaaga	atccgttgtc	aatcatggct	480
10	tctggttctc	acggatcatct	ctactttctt	ccagcaagtt	tgattctgtc	aaacaccagc	540
	tggcagcttt	gttcoggcatt	gcccagtgca	ggagagtcag	taaagaagat	ttcattctct	600
	gtatttcagc	gtcgtcaatg	ccaggttgaa	atacgctatt	ctggcccagc	tcagtggctc	660
	acacgtgtaa	tcccagcact	ttggaaggcc	aaggcaggca	gatcgcttga	gcccaggaat	720
	tcgagaccag	cctgggcaag	aggctgaggt	gggaggatga	cctgagcccg	ggaggtcaag	780
15	gctgcagcca	gctgtgatca	tgtcactgca	ctcaagccag	ggcgtcggag	tgagaccgtg	840
	tcaaaaaaaaa	aggaaggaaa	gaaggaagga	aggaaggaag	gaaggaagga	aggaaggaag	900
	gaaggaagga	aggaaggag	ggagggaggg	agggagggag	gaaggaagga	aggaagtatg	960
	taaggaagga	aggaaggag	gaagggaggg	ggagggaggg	ggagggaggg	aagatgccat	1020
	tcttagattg	aagtggacct	tatgtgggca	gaacacacac	acacacacac	acattgtgga	1080
20	gaaattgctg	actaagcaaa	gcttccaaat	gactgagttt	ggctaaaacg	taggctttta	1140
	aaaaatgtgag	cactgccaaag	ggtttttccct	tgttgaccca	tggatccatc	aagtgcaaac	1200
	atthtcta	gcaatata	taagcctgtg	cagccaaatg	tcattcaaca	tgaatgcat	1260
	tattacaact	tgcatctgtc	taaaatcttg	catcaaaaa	gaaagacaaa	aatgtataaa	1320
	aatggaaaaac	atgcatagaa	atatgtgagg	gaggaaaaaa	atatcccag	gaatgttagt	1380
25	gcacggagtc	acacagggag	aagactatth	ttgttttgtt	ttgattgttt	tgttctgggtg	1440
	acctcactgg	tcaaatgacc	tattaagaat	atthtgtaga	gctaagtgtc	cgatgctcta	1500
	atctctctag	acaaggttca	tatthgtatg	ggttacttat	tctctctttg	ttgactaagt	1560
	caataatcag	aatcagcagg	tttggagtca	gattggcagg	gataagcagc	ctagctcagg	1620
	agaagtgggt	ataaaaagccc	caggctggga	gcagccatca	cagaagtcca	ctcgttcttg	1680
30	gcaggtgggt	ttctcatcgt	ctgctcctcc	tctgcctcgc	ttgactggta	ttgtgtctg	1740
	aggctgggtcc	tacgggtgag	gtttctgtga	catctcgctc	ctacatttaa	aatgcacgct	1800
	aaatgaggtg	ggagtgactc	cttccagctt	tgccaagcag	cttttgttac	tagggcaagg	1860
	gtaccagca	tctatthtta	atatcattta	ttcaaacttc	aaaagaatg	aagtccact	1920
	gagcttactg	agctgggact	tgaactctgg	ggattctgcc	tcattgcttt	ggtgcattgg	1980
35	gtttgtaatg	tctggtatct	ccacttctc	agatcgatga	tagagataaa	gatatgat	2040
	taaggaactg	gttaatcctg	aatthtcaga	aaagtatccc	ttataaaaat	gtatthggg	2100
	ggcaaatcgc	atgagattat	atthctggccc	tatagcta	caaatgtat	ttaccgatta	2160
	atctthtaaa	ggcttagtga	acaatthtth	agtcagatat	ctaattctta	aatactctag	2220
	aaggattaac	taatctataa	aatgggtctg	gatatagtct	gacataatth	tataacaacc	2280
40	ggtaaagagg	agtgactaga	gcaacaacta	aatcatctc	aggaaaaact	gtthtgggtcc	2340
	tatgtatgg	acgttacatc	thttcagtaa	ttccattcaa	atggagaagt	ttacaaggc	2400
	aactgttctc	agggggccta	ttctctccct	taaaattcat	tatacacatc	cctggttgat	2460
	agcagtgtgt	ctggaggcag	aaaccattct	tgctthtgaa	acaattatgt	ctgtgttata	2520
	ctgagtggg	aagctcatta	actgtcaaca	cttatgttct	tcataatgga	atcagtgtgt	2580
45	aattcttgtt	ttgttccaga	thttctaacac	cataaagaat	aaatcctttc	actctgatca	2640
	atgttgtaa	cttctcactt	gtcttctcta	taccagggc	gttgatgaat	ccaagtgtcc	2700
	tctgatggc	aaagttctag	atgccgtccg	aggcagtcct	gccgtcaatg	tggctgtgaa	2760
	cggttcaaa	aaggctgctg	atgagacctg	ggcgccattt	gcctctgggt	agaaccctc	2820
	ccacgggact	tgtthtatac	ttcccagtt	ccctcagtt	ggtagacaga	ggctcacatc	2880
	atctgctaaa	gaatttacia	gtagattgaa	aaacgtgagc	agaggtcaag	tatgccctct	2940
50	gaagatgcc	tctthtgtt	ttgcttagct	aggaagggac	caggaacctg	agcatcattt	3000
	agggcagac	agttagagaaa	agaaggaatc	agaactcttc	ccctctagct	gtggtgtgca	3060
	accctthtgg	gtcacagacc	actthtatgta	ggtgataaaa	actaaagatt	ctatgccag	3120
	aaaaaatgta	cagatacaca	cacacaaaac	catatatgtg	atthttaggag	thttcacagat	3180
	tcctggaatg	ccctgggtaa	caccaaaagt	gagagtcctc	gtcttagaat	thtaggaaag	3240
55	aggtgcaatg	tgtatthaac	cactaacgaa	aggaaggga	ttcagaaata	thattgacta	3300
	ggcatctgtc	tgtagttcat	ttggatcacc	ccaaaccag	ggctthtggc	taatgaacac	3360
	thtggggcac	ctactgtgtg	cagggctgga	ggctgtcaag	ctcagthtaa	acaaatgtaa	3420
	aaaaagacag	aagaaatgga	tccatgaggc	aaagtacagc	cccagactaa	tcccatgatc	3480
	accacaactc	atgtgcaaga	gtgacttcta	accttcatga	gccagthtac	aatthtcatg	3540
60	gagthtthtct	acctacacta	caaaaactcc	aaggaaaaata	tatattaata	accctaagcg	3600
	aattgaccga	aagacagagc	aaaaaggaga	cccttcgcac	ccagcagaag	aggaactgtt	3660
	aagtacttac	ttctcctcag	agaagaatth	ctgttgtatt	thaatgaaac	cccaagaacc	3720
	acacgattct	tcaaccatta	ttggtaagat	cattthtctta	ggtctggtht	thactgactt	3780
	thtatttgg	aattcattta	tgtthtatata	aaatgccaa	cataacatga	aaagtggtht	3840
65	caggactatt	ctaagggaga	gagaaaatgg	ataccaaaa	tattccaatg	thcttatgaa	3900
	tctthtccct	tgctcagga	caaaaaaaaa	aaaaatgtaa	agaagaaagg	aggagatgca	3960

	caatcagagt	cagtaaagac	aactgctatt	tttatctgtc	atagctggtg	cagtctaata	4020
	ggaagcaatt	tccaacattc	aactatggag	ctggctacta	catggaata	gaagttgctt	4080
5	agtgtttggt	gctggcaaa	agttatcaga	gaggttaaat	atataaaagg	gaagagtcag	4140
	atacaggttc	ttcttctctac	tttaggtttt	ccaactgtgtg	tgcaaatgac	cctcctggt	4200
	ggtgtgcaga	tgctctgaaa	ggtatcctca	caccacaagg	cagaggagcg	agaccctgct	4260
	gtcctggaga	agtgcagagt	tagaacagct	gtggccactt	ccagggatgg	tcacaacatc	4320
	ccatctaata	atcaatcttg	aaacaacaagg	actctttctt	aagaaaacat	tatacccagc	4380
10	cgggcgoggt	ggctcacacc	tgtaaatectc	agcgctttgg	gaggctgaaa	tgggcatatc	4440
	atctgaggtc	gagagctcaa	gaccaacctg	gccaacatgg	caaaactccg	tctctatgaa	4500
	aaatacaaaa	attagccag	catgggtggca	ggcacctgta	atcccggcta	ctcgggaggc	4560
	tgagactgga	gaatcccttg	aacctggagg	cagaggttgc	agtgagctga	gatcacgcca	4620
	ctgcaactcca	gcctgggtga	ctagagtaaa	actctgtctc	aaaaataaaa	aaaaatttaa	4680
15	aaaattatac	ctacattctc	ttcttatcag	agaaaaatat	ctacagtgag	cttttcaaaa	4740
	gtttttacaa	actttttgcc	atthaatttc	agacagttat	gagttttccc	tacttctgac	4800
	ttagttgagg	ggaaatgtat	ataacacatt	tatgtgtgtt	gtgtatataa	cacatataac	4860
	acgtttatgt	gtgttggtgg	gggtattact	ttgccatgcc	atttgtttcc	tcocatgcta	4920
	acttaaccca	gactttcaca	cotttatagga	aaaccagtga	gtctggagag	ctgcatgggc	4980
20	tcacaactga	ggaggaattt	gtagaagga	tatacaaagt	ggaaatagac	accaaatctt	5040
	actggaagtc	acttggcatc	tccccattcc	atgagcatgc	agaggtgagt	atataaacct	5100
	tcgagggttg	ttttggtttt	ggtttttgc	tttggcatcc	caggaaatgc	acagttttac	5160
	ttagcatacc	acagaatgt	cctaagaag	gtgatgaatg	accaagggtt	cctctctctc	5220
	ttatacaaga	acaaattcac	aacactctga	gaagcacatt	tctttttgac	tttgaggaaa	5280
	accatttag	taacatgact	tgaacttaca	tgacactatt	catagtctac	tcattccatt	5340
25	ttatatgaat	attgatgtat	ttgccgttga	aataacatgt	ttatgaggca	gacotccaga	5400
	ccccacgtag	agtgtatgaa	acaagagatg	caccatttta	tttctctaaa	acctgtaaca	5460
	ttcttcattc	caaaacacat	ctggctcctc	ggaggtttgg	acaagtgatt	cttggcaaca	5520
	catacataga	gagacaataa	aatcaaatga	ataatggcaa	cacaacagat	aacatttact	5580
	aagcatacac	catgtggcag	acacaattat	aagtgttttc	tatatttaac	ctacttcata	5640
30	ctcagggaca	agccactgag	gtcagtccta	ttattatccc	catctcatag	atgaagcaag	5700
	tgaggcacca	ggaagtcaaa	taactttgtca	aaggtcacaa	ggctaggaaa	cacacaagta	5760
	gagatgttta	caaaacaaggc	ccaggctggg	tttgcctca	attctgctct	gcctcgcatt	5820
	gcgaccagag	aaattttgtc	ccctgtgaaa	agccaagctt	aaaaaaagaa	aagccacatt	5880
35	tgtaacctgc	tctgttcccc	tgctatggt	gaggtatctc	gaacagttat	acagctcctt	5940
	gtcttcccc	tgtcttaatt	tcttcagtca	tttgaacag	atggctgtca	tggaaataga	6000
	atccagacat	gttggtcaga	gttaaagatc	aactaattcc	atcaaaaata	gctcagcatg	6060
	aaagggaaact	attctctggc	ttagtcatgg	atgagacttt	caattgctat	aaagtggttc	6120
	ctttattagg	caatgttacc	agggaaacaa	taggggcttg	tttgacttct	ggggcccaca	6180
	agtccaacag	ggagccccat	ctaccaagaa	gcatgtccct	gactaccocg	cagccaggca	6240
40	gcaagacaag	gacgcggctc	agggcttcca	cagggttcca	gtggtgccca	gcacaagaca	6300
	ttgctcctag	agtctcagcc	cctacccttg	agtagtagaa	ctgcctacct	gagaccgttg	6360
	tttgctcaag	acctgggtct	cagcctgatg	ggaaccatct	aaaaagttca	togccatact	6420
	gcccacgtgt	tgttctcttt	cattagatct	cagcttccct	gactgctctt	cactcttgtt	6480
	tattcattca	acaaacattt	aaaaaataaa	agcattctat	gtgtggaaca	ctctgataga	6540
45	ggctggagat	tcagaaatga	aaatacatcc	ctacccttgg	aatggagggg	aaaggactga	6600
	agtaagacag	actaggcagg	ccogtcagcc	cagcttgaag	cccagataaa	tatggagaac	6660
	aagatgaggt	gagtagtgag	agatgagctc	cagtgccctca	ctttgggtgac	tggtgcatgg	6720
	tgggcttcat	gcagcttctt	ctgataaatg	cctccttcag	aaccggctcac	ctctaccttg	6780
	gccagtgacc	caagtgttca	tattagattt	accaagggaa	atggaaact	tttattagga	6840
50	gctcttaggc	ctcttcactt	catggaattt	tttctttttt	cttttttttt	tgagatggag	6900
	ttttgctctg	tcacccaggc	tggaaatgcag	tggtgcaatc	ttggctcact	gcaaccttta	6960
	cttcccaggt	tcaagcaatt	cttctgcctc	agcctcccga	gtagctggga	ctacaggtgc	7020
	accgccacct	accagctaaa	gttttgattt	tttcatagag	acagggtttc	gcatgttgg	7080
	ccaggctggt	ctogaactcc	agacctcagg	tgattcaacc	acctcagcct	cccaaagtgc	7140
55	tggcattaca	ggtgtgagcc	agtacacca	gctacttcat	ggatttttga	tcacagatta	7200
	tgctcttat	aatttttaag	aagaatcaag	tgggctgaag	gtcaatgtca	ccataagata	7260
	aaagatattt	ttattagttg	attctagggg	gttggcctta	aggggagccc	tttcttctta	7320
	agagattctt	ggcggggcgc	ggtggctcaa	gctgtaatc	ccagcacttt	gggagccoga	7380
	gacgggtgga	tcatgaggtc	aggagatcga	gaccatcctc	gtaacacggt	gaaccocgt	7440
	ctctactaaa	aaatacaaaa	aaactagcgc	ggtgagttgg	cgggcgcctg	tagtcccagc	7500
60	tactcgggag	gctgaggcag	gagaatggcg	taaaccgggg	agggcgagct	tgagtgagc	7560
	tgagatctgg	ccactgcact	ccagcccggg	tgacagagcg	agactccgtc	tcaaaaaaaaa	7620
	aaaaaaaaaaa	aaagagattc	ttaggtgatt	ctcacttcc	cttgccccaa	tattattttt	7680
	gtttttggta	tggctcactc	agctcctttt	tcctcctat	ccctaagtaa	tcogggtttc	7740
	ttttcccat	atttgaaca	aaatgtattt	atgcagagtg	tgtocaaaac	tcaaccocag	7800
65	gccogtatac	aaaataaatc	aaattaaaca	catctttact	gtcttctacc	tcttctctga	7860

5 cctcaattta tcccaacttg cctcactctg agaatcaagc ctgtcccagc acatgagttg 7920
 cagatactct actgaatttg acagaactgt gtgactatct ggaacagcat tttgatccac 7980
 aatttgccca gttacaaagc ttaaatgaag tctagtgcac gcatgtatat ttcaaaattc 8040
 caccatgctc ttccacactc tgtattgtaa atagagccct gaaatgcttt tggttcatat 8100
 ttcaattgctt gctatacata aaaatatact ttttctctt catgttagaa aatgcaaaga 8160
 atagtggggt gggggaatct ctgggcttgg agacaggaga cttaccttcc tactgtggtt 8220
 ccatcagtat gtagactggg gcaatacaat aattcaagtc tggtttgctc atctgtaaaa 8280
 10 tgggaagaat gtttccagct ccagaatgct aagtctctaa gtctgtggtt ggcagccact 8340
 attgcagcag cttttcaatg actcagtgc a ttttccatt ctccccacct ttttttttc 8400
 taaaaccaac aaaatagata cagccttag gctctctggg atttccotta gtcaagctag 8460
 ggccatcctg acttttgatg tgaatttgca aaacaagacc tggttctgta ctctgctct 8520
 aagggtctg catggttcca aaggcttggc ttgccagtgt atttgagctt tttccttctg 8580
 ttcaaaacttc aaaataaaa agaataaat taattaaagt ggcactggac ttccgggtgt 8640
 15 cagtcatgtg tgtcatctgt acggttttcg ggctctggtg gaaatggata ctgtctgtct 8700
 tctctcatag gtggtattca cagccaacga ttccggcccc cgccactaca ccatcgccgc 8760
 cctgctgagc ccctactcct attccaccac ggctgtctc accaatcca aggaatgagg 8820
 gacttctcca gaggatctga aggacgaggg atgggatttc atgtaaccaa gagtattcca 8880
 tttttactaa agcagtgtt tcacctcata agctatgta ggagtccagg cagagacaat 8940
 20 aaaacattcc tgtgaaaggc acttttcatt ccattttaac ttgattttt aaattccctt 9000
 attgtccctt ccaaaaaaac aagaatcaaa attctacaaa gaagcaaagg aattctagaa 9060
 cgtatctggg cagaacgcta ggagagatcc aaatttcaa tttattgcaa gcaaagcaca 9120
 tattaatat gatctgcagt catcaaaaag acacattctg taaatgagaa agccttattt 9180
 tctgttaacc ttcaagtgaat agcaaaagac acattctaag ggcccacttc tttactgtgg 9240
 25 gcatttcttt tcttttcttt ttttttttt cttttcttt ctttttttga gacaaagtct 9300
 cactctgtcg ccaggctag aatgcagtgg tgtgatctca gctcactgca acctctgctt 9360
 ccgggttcaa gcgattctcc tgcctcagcc tcccaagcag ctgggattac aggcgcccgc 9420
 caccacacct ggctaatttt tctacttcta gtagagatgg ggtttcgcca tgttggctag 9480
 gctggcctcg aactcctgac ctcaggtgat ccacctgct cagcctcca aagtgtggg 9540
 30 attacaggca tgagccacta caccggccc ctactctggg catttctttg atttaagaga 9600
 agggcagctc caacaagaca cacctgcaga gactcaggcc atccgatcag ttcaggctag 9660
 atccacgctg caatcagcca ggtcagggac aaaccaaga accccacaca cccaatttac 9720
 ttaggctgat ccaaaatcca tgtatggaga actcacatgc agcaggcact attttaggtg 9780
 atctgaacat aaagaatagg acccagtagc tgcatttatt taaagaactc acaatctttt 9840
 35 gaaaagataa ctgtttcatc atggtttggc aggaggctat ggtacaaggc acagcaaagg 9900
 taagaaggag aaaaaacaa caccctagag aaatcagaaa atgactctga ataggtgtca 9960
 cttaactctga gtgttggtaa tttgtcagat agacaaggga a 10001

40 <210> 5
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador

<400> 5
 ccctgctgag ccctactc 19

50 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador

60 <400> 6
 tcctcattc ctgggattg 20

65 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sonda

5 <400> 7
 attccaccac ggctgctgctc a 21

10 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 8
 actggttttc ccagaggcaa 20

25 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 9
 gactcactgg ttttccaga 20

40 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 10
 tgaataccac ctctgcatgc 20

55 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <400> 11
 ccgtggtgga ataggagtag 20

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

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 12
 agccgtggtg gaataggagt 20

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

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 13	cgacagccgt ggtggaatag	20
	<210> 14		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 14	ttggtgacga cagccgtgt	20
	<210> 15		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 15	gattggtgac gacagccgtg	20
	<210> 16		
	<211> 20		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
35	<400> 16	gggattggtg acgacagccg	20
	<210> 17		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 17	tgggattggt gacgacagcc	20
50	<210> 18		
	<211> 20		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 18	attcctggg attggtgacg	20
60	<210> 19		
	<211> 20		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 19 cattccttg gattggtgac	20	
	<210> 20		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 20 tcattccttg ggattggtga	20	
	<210> 21		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 21 agaagtcct cattccttg	20	
	<210> 22		
	<211> 20		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
35	<400> 22 gtccttcagg tccactggag	20	
	<210> 23		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
45	<400> 23 catccctcgt ccttcagtc	20	
	<210> 24		
	<211> 20		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
55	<400> 24 tacatgaaat cccatccctc	20	
	<210> 25		
	<211> 20		
60	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
65			

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 25	cttggtaca tgaatccca	20
	<210> 26		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 26	aataactcttg gttacatgaa	20
	<210> 27		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 27	ttagtaaaaa tggaatactc	20
	<210> 28		
	<211> 20		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
35	<400> 28	actgctttag taaaaatgga	20
	<210> 29		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 29	tgaaaacact gctttagtaa	20
50	<210> 30		
	<211> 20		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 30	tatgaggtga aaacactgct	20
60	<210> 31		
	<211> 20		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 31	tggtactcta acatagcata	20
	<210> 32		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 32	tctctgcctg gacttctaac	20
	<210> 33		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 33	ttattgtctc tgcctggact	20
	<210> 34		
	<211> 20		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
35	<400> 34	tgccctttcac aggaatggtt	20
	<210> 35		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
45	<400> 35	gtgcctttca caggaatggt	20
	<210> 36		
	<211> 20		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
55	<400> 36	cagaggagga gcagacgatg	20
	<210> 37		
	<211> 20		
60	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
65			

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 37	tctagaactt tgaccatcag	20
	<210> 38		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 38	ttttccaga ggcaaatggc	20
	<210> 39		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 39	tccagactca ctggtttcc	20
	<210> 40		
	<211> 20		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
35	<400> 40	tatcccttct acaaattcct	20
	<210> 41		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 41	attccactt tgtatatccc	20
50	<210> 42		
	<211> 20		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 42	tggtgtctat ttccacttg	20
60	<210> 43		
	<211> 20		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 43	cagtaagatt tgggtctat	20
	<210> 44		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 44	cttcagtaa gattgggtg	20
	<210> 45		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 45	ccacctctgc atgctcatgg	20
	<210> 46		
	<211> 20		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
35	<400> 46	tgtgaatacc acctctgcat	20
	<210> 47		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 47	gctgtgaata ccacctctgc	20
50	<210> 48		
	<211> 20		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 48	cgttggctgt gaataccacc	20
60	<210> 49		
	<211> 20		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 49		
	cagccgtggt ggaataggag	20	
	<210> 50		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 50		
	gacagccgtg gtggaatagg	20	
	<210> 51		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 51		
	acgacagccg tgggtgaata	20	
	<210> 52		
	<211> 20		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
35	<400> 52		
	gacgacagcc gtggtggaat	20	
	<210> 53		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 53		
50	tgacgacagc cgtggtgga	20	
	<210> 54		
	<211> 20		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 54		
60	gtgacgacag ccgtggtgga	20	
	<210> 55		
	<211> 20		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 55	ggtgacgaca gccgtggtgg	20
	<210> 56		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 56	tggtgacgac agccgtggtg	20
	<210> 57		
20	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 57	attggtgacg acagccgtgg	20
	<210> 58		
30	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 58	ggattggtga cgacagccgt	20
40	<210> 59		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 59	ttgggattgg tgacgacagc	20
50	<210> 60		
	<211> 20		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 60	cttgggattg gtgacgacag	20
60	<210> 61		
	<211> 20		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 61 ccttgggatt ggtgacgaca	20
10	<210> 62 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 62 tccttgggat tggtagacac	20
25	<210> 63 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 63 ttccttggga tggtagacga	20
40	<210> 64 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 64 ctcattcctt gggattggtg	20
55	<210> 65 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
65	<400> 65 cctcattcct tgggattggt	20
65	<210> 66 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
65	<400> 66 ccctcattcc tgggattgg	20
65	<210> 67 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 67 tccctcattc ctgggattg	20
10	<210> 68 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 68 gtccctcatt cctgggatt	20
25	<210> 69 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 69 agtcctcat tcctgggat	20
40	<210> 70 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 70 aagtcctca tcctggga	20
55	<210> 71 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
65	<400> 71 gaagtcctc attcctggg	20
	<210> 72 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 72 gagaagtccc tcattccttg	20
65	<210> 73 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 73	ggagaagtcc ctcatcctt	20
	<210> 74		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 74	acatgaaatc ccatccctcg	20
	<210> 75		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 75	ttacatgaaa tcccatcct	20
	<210> 76		
	<211> 20		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
35	<400> 76	gttacatgaa atcccatccc	20
	<210> 77		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 77	ggttacatga aatcccatcc	20
50	<210> 78		
	<211> 20		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 78	tggttacatg aatcccatc	20
60	<210> 79		
	<211> 20		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 79	ttggttacat gaaatcccat	20
	<210> 80		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 80	tcttggttac atgaaatccc	20
	<210> 81		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 81	ctcttggtta catgaaatcc	20
	<210> 82		
	<211> 20		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
35	<400> 82	actcttggtt acatgaaatc	20
	<210> 83		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 83	tactcttggt tacatgaaat	20
50	<210> 84		
	<211> 20		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 84	atactcttggt ttacatgaaa	20
60	<210> 85		
	<211> 20		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 85	gaataactct gggtacatga	20
	<210> 86		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 86	ggaataactct tgggtacatg	20
	<210> 87		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 87	tggaataactc ttggtacat	20
	<210> 88		
	<211> 20		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
35	<400> 88	atggaataact cttggttaca	20
	<210> 89		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 89	aatggaatac tcttggttac	20
50	<210> 90		
	<211> 20		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 90	aaatggaata ctcttggtta	20
60	<210> 91		
	<211> 20		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 91	aaaatggaat actcttggt	20
	<210> 92		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 92	aaaaatggaa tactcttggt	20
	<210> 93		
20	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 93	taaaaatgga atactctgg	20
	<210> 94		
30	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 94	gtaaaaatgg aatactctg	20
40	<210> 95		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 95	agtaaaaatg gaatactct	20
50	<210> 96		
	<211> 20		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 96	tagtaaaaat ggaatactct	20
60	<210> 97		
	<211> 20		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 97	ttagtaaaa atggaatact	20
	<210> 98		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 98	cttagtaaa aatggaatac	20
	<210> 99		
20	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 99	gcttagtaa aaatggaata	20
	<210> 100		
30	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 100	tgcttagta aaaatggaat	20
40	<210> 101		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 101	ctgcttagt aaaaatggaa	20
50	<210> 102		
	<211> 20		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 102	cactgcttta gtaaaaatgg	20
60	<210> 103		
	<211> 20		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 103		
	acactgctt agtaaaaatg	20	
	<210> 104		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 104		
	aacactgctt tagtaaaaat	20	
	<210> 105		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 105		
	aaacactgct ttagtaaaaa	20	
	<210> 106		
	<211> 20		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
35	<400> 106		
	aaaacactgc ttagtaaaa	20	
	<210> 107		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 107		
50	gaaaacactg cttagtaaa	20	
	<210> 108		
	<211> 20		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 108		
60	gtgaaaacac tgcttagta	20	
	<210> 109		
	<211> 20		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 109
 ggtgaaaaca ctgcttagt 20

10 <210> 110
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 110
 aggtgaaaac actgcttag 20

25 <210> 111
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 111
 gaggtgaaaa cactgcttta 20

40 <210> 112
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 112
 tgaggtgaaa aactgcttt 20

55 <210> 113
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <400> 113
 atgaggtgaa aactgctt 20

<210> 114
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 114
 ttattgtct ctgctggac 20

<210> 115
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 115
 ttttattgct tctgcctgga 20

10 <210> 116
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 116
 gttttattgt cctgcctgg 20

25 <210> 117
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 117
 tgtttattg tctctgcctg 20

40 <210> 118
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 118
 atgtttatt gtctctgcct 20

55 <210> 119
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <400> 119
 aatgtttat tgcctctgcc 20

<210> 120
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 120
 gaatgttta ttgcctctgc 20

<210> 121
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 121	ggaatgtttt attgtctctg	20
	<210> 122		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 122	aggaatgttt tattgtctct	20
	<210> 123		
20	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 123	caggaatggt ttattgtctc	20
	<210> 124		
30	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 124	acaggaatgt ttattgtct	20
40	<210> 125		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 125	gatgtcacag aaacactcac	20
50	<210> 126		
	<211> 20		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
60	<400> 126	gcaaagctgg aaggagtcac	20
	<210> 127		
	<211> 20		
65	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 127	gaacttcatt cttttgaag	20
	<210> 128		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 128	agcttcctta atatcatatc	20
	<210> 129		
20	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 129	tatagggcca gaataatac	20
	<210> 130		
30	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 130	actaagcctt ttaaagatta	20
40	<210> 131		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 131	tggaattact gaaaagatgt	20
50	<210> 132		
	<211> 20		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
60	<400> 132	accagggatg tgtataatga	20
	<210> 133		
	<211> 20		
65	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 133	tccctactca gtataacaca	20
	<210> 134		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 134	gatcagagtg aaaggatta	20
	<210> 135		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 135	gggaagataa aaccaagtcc	20
	<210> 136		
	<211> 20		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
35	<400> 136	taaattcttt agcagatgat	20
	<210> 137		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 137	aatgatgctc aggtcctgg	20
50	<210> 138		
	<211> 20		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 138	ttggtgttac ccaggacac	20
60	<210> 139		
	<211> 20		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 139 aaagtgttca ttaggcaaaa	20
10	<210> 140 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 140 ggcattttat ataaacataa	20
25	<210> 141 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 141 aagaacattg gaatatttt	20
40	<210> 142 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 142 gttggaaatt gcttccatt	20
55	<210> 143 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
65	<400> 143 agtggaaaac ctaaagtagg	20
	<210> 144 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 144 ttcccctcaa ctaagtcaga	20
	<210> 145 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 145	cctataaggt gtgaaagtct	20
	<210> 146		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 146	tgtaagttca agtcatgtta	20
	<210> 147		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 147	gtgttgccaa gaatcacttg	20
	<210> 148		
	<211> 20		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
35	<400> 148	aaaacactta taattgtgtc	20
	<210> 149		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
45	<400> 149	ctttgacaag ttatttgact	20
	<210> 150		
	<211> 20		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
55	<400> 150	atccatgact aagccagaga	20
	<210> 151		
	<211> 20		
60	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
65			

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 151	atggttccca tcaggctgag	20
	<210> 152		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 152	gcatttatca gaagaagctg	20
	<210> 153		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 153	ttgacctca gccactga	20
	<210> 154		
	<211> 20		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
35	<400> 154	aggaagtgag aatcacctaa	20
	<210> 155		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
45	<400> 155	agaagacagt aaagatgtgt	20
	<210> 156		
	<211> 20		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
55	<400> 156	aaattgtgga tcaaaatgct	20
	<210> 157		
	<211> 20		
60	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
65			

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 157	aaccagactt gaattattgt	20
	<210> 158		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 158	agtggtgcc aaccacagac	20
	<210> 159		
20	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 159	ggaagtccag tgccaactta	20
	<210> 160		
30	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 160	atccatttcc accagagccc	20
40	<210> 161		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 161	cttgctggac tggatttgt gtct	24
50	<210> 162		
	<211> 25		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
60	<400> 162	agaacttga ccatcagagg acact	25
	<210> 163		
	<211> 22		
65	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

<220>
<223> Sonda

5 <400> 163
ccctacgggc accggtgaat cc 22

10 <210> 164
<211> 612
<212> ADN
<213> *Macaca fascicularis*

<400> 164

15 acagaagtcc actcgttctt ggcaggatgg cttctcatcg tctgctcctt ctctgcctcg 60
ctggactggg atttgtgtct gaagctggtc ctacgggctg tgatgaatcc aagtgtcctc 120
tgatgggcaa agttctagat gccgtccgag gcagtcctgc cgtcaatgtg gctgtgaacg 180
tgttcaaaaa ggctgctgat gagacctggg cgccatttgc ctctgggaaa accagtgagt 240
ctggagagct gcatgggctc acaactgagg aggaatttgt agaagggata taaaaagtgg 300
20 aaatagacac caaatcttac tggaaagtac ttggcatctc cccattccat gagcatgcag 360
aggtggtatt cacagccaac gattccggcc cccgccacta caccatcgcc cgcctgctga 420
gcccctactc ctattccacc acggctgtcg tcaccaatcc caaggaatga gggacttctc 480
cagaggatct gaaggacgag ggatgggatt tcatgtaacc aagagtattc catttttact 540
aaagcagtgt tttcacctca taagctatgt taggagtcca ggcagagaca ataaaacatt 600
25 cctgtgaaag gc 612

30 <210> 165
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 165
ccttccctga aggttctctc 20

40 <210> 166
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 166
gcgttgctc ttctctgc gttttt 27

50 <210> 167
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 167
ttttattgct tctgcctg 18

60 <210> 168
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 168
 5 tacaatggg atgctactgc 20
 <210> 169
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 169
 15 ggaatcccaa gcctcaaagc 20
 <210> 170
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 170
 25 cgtccttcag gtccactgga 20
 <210> 171
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 171
 35 atatgagtg aaaacactgc 20
 <210> 172
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 172
 45 tattgtctct gcctggactt 20
 <210> 173
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 173
 55 cacaggaatg ttttattgct 20
 <210> 174
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 65

	<223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 174 cctttcacag gaatgttta	20
	<210> 175 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
15	<400> 175 gcctttcaca ggaatgttt	20
	<210> 176 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
25	<400> 176 agtgccttc acaggaatg	20
	<210> 177 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 177 aagtccttt cacaggaatg	20
40		
45		
50		
55		
60		
65		

Reivindicaciones

- 5 1. Compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de bases nitrogenadas que consiste en los 20 nucleósidos unidos que aparecen en la SEQ ID NO: 80.
- 10 2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto consiste en un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de bases nitrogenadas que consiste en los 20 nucleósidos unidos que aparecen en la SEQ ID NO: 80.
- 15 3. Compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el oligonucleótido modificado es un oligonucleótido monocatenario.
- 20 4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que al menos un enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico modificado.
- 25 5. Compuesto según la reivindicación 4, en el que cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico fosforotioato.
- 30 6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que al menos un nucleósido del oligonucleótido modificado comprende un azúcar modificado.
- 35 7. Compuesto según la reivindicación 6, en el que el al menos un azúcar modificado es un azúcar bicíclico.
- 40 8. Compuesto según la reivindicación 7, en el que cada uno del al menos un azúcar bicíclico comprende un puente 4'-(CH₂)-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2' o 4'-CH(CH₃)-O-2'.
- 45 9. Compuesto según la reivindicación 6, en el que al menos un azúcar modificado comprende un grupo 2'-O-metoxietilo.
- 50 10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que al menos un nucleósido comprende una base nitrogenada modificada.
- 55 11. Compuesto según la reivindicación 10, en el que la base nitrogenada modificada es una 5-metilcitosina.
- 60 12. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el oligonucleótido modificado comprende:
un segmento de separación que consiste en desoxinucleósidos unidos;
un segmento de ala 5' que consiste en nucleósidos unidos; y
un segmento de ala 3' que consiste en nucleósidos unidos;
en el que el segmento de separación se encuentra entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3' y en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado.
- 65 13. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el oligonucleótido modificado comprende:
un segmento de separación que consiste en diez desoxinucleósidos unidos;
un segmento de ala 5' que consiste en cinco nucleósidos unidos; y
un segmento de ala 3' que consiste en cinco nucleósidos unidos;
en el que el segmento de separación se encuentra entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo; en el que cada citosina del oligonucleótido modificado es una 5-metilcitosina, y en el que cada enlace internucleosídico del oligonucleótido modificado es un enlace fosforotioato.
14. Composición que comprende el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o una sal del mismo y al menos uno de un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptable.
15. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o composición según la reivindicación 14 para utilizarse en el tratamiento de la amiloidosis por transtiretina en un ser humano.
16. Compuesto o composición para utilizarse según la reivindicación 15, en el que el uso del compuesto o composición reduce al menos uno de entre la inquietud, la falta de coordinación, el nistagmo, la paraparesia espástica, la falta de coordinación muscular, las alteraciones de la visión, el insomnio, las sensaciones extrañas, la mioclonía, la ceguera, la afasia, el síndrome del túnel carpiano, las convulsiones, las hemorragias subaracnoideas, el ictus y la hemorragia cerebral, la hidrocefalia, la ataxia y la parálisis espástica, el coma, la neuropatía sensorial, la parestesia, la hipoestesia, la neuropatía motora, la neuropatía autonómica, la hipotensión ortostática, el estreñimiento cíclico, la diarrea cíclica, las náuseas, el vómito, la disminución de la sudoración, la impotencia, el

5 vaciamiento gástrico retardado, la retención urinaria, la incontinencia urinaria, la cardiopatía progresiva, la fatiga, la dificultad respiratoria, la pérdida de peso, la falta de apetito, el entumecimiento, el hormigueo, la debilidad, la macroglosia, el síndrome nefrótico, la insuficiencia cardiaca congestiva, la disnea de esfuerzo, el edema periférico, las arritmias, las palpitaciones, los mareos, el síncope, la hipotensión postural, los problemas de los nervios periféricos, el deterioro sensoriomotor, la neuropatía de las extremidades inferiores, la neuropatía de las extremidades superiores, la hiperalgesia, la sensibilidad térmica alterada, la debilidad de las extremidades inferiores, la caquexia, el edema periférico, la hepatomegalia, la púrpura, la disfunción diastólica, las contracciones ventriculares prematuras, la neuropatía craneal, la disminución de los reflejos tendinosos profundos, los depósitos de amiloide en el humor vítreo, la opacidad vítrea, la xeroftalmia, el glaucoma, el aspecto festoneado en las pupilas o la hinchazón de los pies debida a la retención de agua, en el ser humano.

10 17. Compuesto o composición para utilizarse según la reivindicación 15, en el que la amiloidosis por transtiretina es la polineuropatía amiloide familiar (PAF).

15 18. Compuesto o composición para utilizarse según la reivindicación 15, en el que la amiloidosis por transtiretina es la miocardiopatía amiloide familiar (MAF).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65