

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 635**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2012 PCT/US2012/035694**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12149495**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2012 E 12776385 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2018 EP 2701713**

54 Título: **Modulación de la expresión de apolipoproteína CIII (APOCIII)**

30 Prioridad:

27.04.2011 US 201161479817 P
03.02.2012 US 201261595009 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MULLICK, ADAM;
CROOKE, ROSANNE, M.;
GRAHAM, MARK, J.;
DOBIE, KENNETH, W.;
BELL, THOMAS, A. y
LEE, RICHARD

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 663 635 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 apolipoproteína CIII (APOCIII)**Descripción****5 Campo de la Invención**

En la presente se divulgan métodos, compuestos y composiciones para reducir la expresión del ARNm y la proteína de la Apolipoproteína CIII (ApoCIII) y aumentar la actividad de HDL o la HDL en un animal. Además, en la presente se divulgan métodos, compuestos y composiciones para un inhibidor de ApoCIII para reducir las enfermedades o afecciones relacionadas con ApoCIII en un animal.

Antecedentes

Las lipoproteínas son partículas globulares parecidas a micelas que consisten de un núcleo no polar de acilgliceroles y ésteres de colesterol rodeadas por un recubrimiento anfifílico de proteínas, fosfolípidos y colesterol. Las lipoproteínas se han clasificado en cinco categorías amplias en base a sus propiedades funcionales y físicas: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Los quilomicrones transportan los lípidos de la dieta del intestino a los tejidos. Las VLDL, IDL y LDL transportan triacilgliceroles y colesterol del hígado a los tejidos.

Las HDL transportan el colesterol endógeno de los tejidos al hígado

Las partículas de lipoproteínas experimentan un proceso metabólico continuo y tienen propiedades y composiciones variables. Las densidades de lipoproteínas aumentan sin aumentar el diámetro de partícula ya que la densidad de sus recubrimientos externos es menor que la del núcleo interno. Los componentes proteicos de las lipoproteínas se conocen como apolipoproteínas. Se distribuyen por lo menos nueve apolipoproteínas en cantidades significativas entre las varias lipoproteínas humanas.

La apolipoproteína C-III (ApoCIII) es un componente de las HDL y de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG). La ApoCIII elevada se asocia con hipertrigliceridemia. En consecuencia, la ApoCIII juega un papel en la hipertrigliceridemia, un factor de riesgo para enfermedad arterial coronaria (Davidsson et al., J. Lipid Res. 2005. 46: 1999-2006). La ApoCIII ralentiza la depuración de las lipoproteínas ricas en triglicéridos inhibiendo la lipólisis, tanto mediante la inhibición de la lipoproteína lipasa como interfiriendo con el enlace de lipoproteínas con la matriz de glicosaminoglicanos de la superficie celular (Shachter, Curr. Opin Lipidol., 2001, 12, 297-304).

El gen que codifica la apolipoproteína C-III humana (también denominado APOC3, APOC-III, ApoCIII y APO C-III) se clonó en 1984 por tres grupos de investigación (Levy-Wilson et al., ADN, 1984, 3, 359-364). Protter et al., ADN, 1984, 3, 449 - 456; Sharpe et al., Nucleic Acids Res., 1984, 12, 3917 - 3932). La secuencia de codificación está interrumpida por tres intrones (Protter et al., ADN, 1984, 3, 449-456). El gen de ApoCIII humano está localizado aproximadamente a 2,6 kb en la dirección 3' del gen de la apolipoproteína A-1 y estos dos genes se transcriben convergentemente (Karathanasis, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1985, 82, 6374-6378) También se clonó una variante de la apolipoproteína C-III humana con una mutación Thr74 a Ala74 de un paciente con nivel inusualmente alto de apolipoproteína C-III en suero. Como el Thr74 está O-glicosilado, la mutación Ala74 dio como resultado por lo tanto niveles incrementados de ApoCIII en suero que carecía de la fracción de carbohidrato (Maeda et al., J. Lipid Res., 1987, 28, 1405-1409). Posteriormente se identificaron otras variantes o polimorfismos que modulaban la expresión de Apo CIII. Algunos de los polimorfismos elevaron la ApoCIII. Los niveles elevados de ApoCIII se asociaron con niveles elevados de triglicéridos (TG) y enfermedades como enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico, obesidad y diabetes (Chan et al., Int J Clin Pract, 2008, 62: 799-809; Onat et al., Atherosclerosis, 2003, 168: 81 - 89; Mendivil et al., Circulation, 2011, 124: 2065 - 2072).

Se han identificado cinco polimorfismos en la región promotora del gen: C (en la posición -641 del gen) a A, G (en la posición -630 del gen) a A, T (en la posición -625 del gen) a delección, C (en la posición -482 del gen) a T y T (en la posición -455 del gen) a C. Todos estos polimorfismos están en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo *Sst I* en la región no traducida 3'. El sitio polimórfico *Sst I* distingue los alelos S1 y S2 y el alelo S2 se ha asociado con niveles de triglicéridos en plasma elevados (Dammerman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 4562-4566). El promotor de ApoCIII está regulado por disminución por la insulina y este sitio polimórfico anula la regulación de insulina. Por tanto, la sobreexpresión potencial de ApoCIII resultante de la pérdida de regulación de insulina puede ser un factor contribuyente al desarrollo de hipertrigliceridemia asociada con el alelo S2 (Li et al., J. Clin. Invert., 1995, 96, 2601-2605). El polimorfismo T (en la posición -455 del gen) a C se ha asociado con un riesgo mayor de enfermedad arterial coronaria (Olivieri et al., J. Lipid Res., 2002, 43, 1450-1457). Otros polimorfismos en el gen de ApoCIII humano que se han asociado con expresión de ApoCIII y/o triglicéridos elevada incluyen: C (en la posición 1100) a T, C (en la posición 3175) a G, T (en la posición 3206) a G, C (en las posiciones 3238) a G, etc. (Tilly et al., J. Lipid Res., 2003, 44: 430-436; Waterworth et al., Arterioscler Thromb Yasc Biol, 2000, 20: 2663-2669; Petersen et al., N Engl JMed, 2010, 362: 1082-1089).

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

Los ratones transgénicos y knockout han definido más el papel de ApoCIII en la lipólisis. La sobreexpresión de ApoCIII en ratones transgénicos lleva a hipertrigliceridemia y depuración deteriorada de los triglicéridos de VLDL (de Silva et al., *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 2324-2335; Ito et al., *Science*, 1990, 249, 790-793). Los ratones knockout con una ausencia total de la proteína ApoCIII mostraron niveles de colesterol y triglicéridos en plasma significativamente reducidos en comparación con los ratones de tipo salvaje y estaban protegidos de la hipertrigliceridemia posprandial (Maeda et al., *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 23610-23616)

Los niveles de ApoCIII en plasma totales se han identificado como un determinante principal de los triglicéridos en suero, y los estudios epidemiológicos han demostrado que las lipoproteínas ApoCIII y ApoB que tienen ApoCIII como un componente predicen independientemente enfermedad del corazón coronaria (Sacks et al., *Circulation*, 2000, 102: 1886- 1892; Lee et al., *Arterioscler Thromb Vase Biol.* 2003, 23: 853 - 858). Los estudios también demuestran que la ApoCIII es un determinante clave en la depuración de lipoproteínas ricas en triglicéridos y sus restos en estados hipertrigliceridémicos, incluyendo obesidad visceral, resistencia a la insulina y el síndrome metabólico (Mauger et al., *J. Lipid Res.* 2006, 47: 1212-1218; Chan et al., *Clin. Chem.* 2002, 278-283; Ooi et al., *Clin. Sci.* 2008, 114: 611-624).

La hipertrigliceridemia es un rasgo clínico común asociado con un riesgo aumentado de enfermedad cardiometabólica (Hegele et al., 2009; *Hum Mol Genet*, 18: 4189-4194; Hegele y Pollex 2009, *Mol Cell Biochem*, 326: 35-43), así como de aparición de pancreatitis aguda en las formas más graves (Toskes 1990, *Gastroenterol Clin North Am*, 19: 783-791; Gaudet et al., 2010, *Atherosclerosis Supplements*, 11: 55-60; Catapano et al., 2011, *Atherosclerosis*, 217S: S1 -S44; Tremblay et al. 2011, *J Clin Lipidol*, 5: 37-44). Los ejemplos de enfermedad cardiometabólica incluyen, pero no están limitados a, diabetes, síndrome metabólico/resistencia a la insulina y trastornos genéticos como quilomicronemia familiar, hiperlipidemia familiar combinada e hipertrigliceridemia familiar.

La hipertrigliceridemia es la consecuencia del aumento de la producción y/o del catabolismo reducido o retardado de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG): VLDL y, en menor medida, quilomicrones (CM). Los límites altos de TG (150-199 mg/dl) se encuentran comúnmente en la población general y son un componente común de estados de síndrome metabólico/resistencia a la insulina. Lo mismo es cierto para TG altos (200-499 mg/dl) excepto que a medida que aumentan los niveles de TG en plasma, los factores genéticos subyacentes juegan un papel etiológico cada vez más importante. Los TG muy altos (≥ 500 mg/dl) también se asocian con mayor frecuencia con niveles elevados de CM, y van acompañados de un aumento del riesgo de pancreatitis aguda. El riesgo de pancreatitis se considera clínicamente significativo si los TG exceden de 880 mg/dl (>10 mmol) y las directrices de European Atherosclerosis Society/European Society of Cardiology (EAS/ESC) 2011 afirman que las acciones para prevenir la pancreatitis aguda son obligatorias (Catapano et al. 2011, *Atherosclerosis*, 217S: S1-S44). De acuerdo con las directrices de de la EAS/ESC 2011, la hipertrigliceridemia es la causa de aproximadamente el 10% de todos los casos de pancreatitis y el desarrollo de pancreatitis puede tener lugar a niveles de TG entre 440-880 mg/dl. En base en la evidencia de estudios clínicos que demuestran que los niveles elevados de TG son un factor de riesgo independiente para la CVD aterosclerótica, las directrices de tanto el National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP 2002, *Circulation*, 106: 3143-421) como la American Diabetes Association (ADA 2008, *Diabetes Care*, 31: S12-S54.) recomiendan un nivel objetivo de TG de menos de 150 mg/dl para reducir el riesgo cardiovascular.

Los ratones knockout con apoCIII tenían una absorción de lípidos intestinal y secreción de triacilglicerol VLDL hepática normales, pero una rápida depuración de triacilglicerol VLDL y ésteres de colesterol VLDL del plasma que pueden explicar la hipolipidemia observada (Gerritsen et al., *J. Lipid Res.* 2005, 46: 1466 -1473; Jong et al., *J. Lipid Res.* 2001, 42: 1578-1585). Se ha citado que las partículas de VLDL con ApoCIII juegan un papel principal en la identificación del alto riesgo de enfermedad del corazón coronaria en la hipertrigliceridemia (Campos et al., *J. Lipid Res.* 2001, 42: 1239-1249). Un estudio de asociación del genoma completo descubrió que una mutación nula de ApoCIII de origen natural en personas Lancaster Amish demostró un perfil lipídico favorable y una cardioprotección aparente, sin efectos perjudiciales obvios (Pollin et al., *Science*. 2008, 322: 1702-1705). Se observa que los portadores de la mutación tienen niveles de triglicéridos séricos en ayunas y posprandiales y colesterol LDL más bajos, y niveles más altos de colesterol HDL.

La clase HDL de lipoproteínas comprende una población heterogénea y polidispersa de partículas que son las más densas y las más pequeñas en tamaño (Havel y Kane., *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. 8ª Edición. McGraw-Hill, New York, 2001:2705-16). El HDL es un complejo macromolecular de lípidos (colesterol, triglicéridos y fosfolípidos) y proteínas (apolipoproteínas (apo) y enzimas). La superficie de HDL contiene principalmente apolipoproteínas A, C y E. La función de algunas de estas apoproteínas es dirigir el HDL desde los tejidos periféricos al hígado. Los niveles de HDL en suero pueden verse afectados por causas genéticas subyacentes (Weissglas-Volkov y Pajukanta, *J Lipid Res*, 2010, 51: 2032-2057)

Los estudios epidemiológicos han indicado que los niveles elevados de HDL protegen contra enfermedad cardiovascular o enfermedad coronaria (Gordon et al., *Am. J. Med.* 1977. 62: 707-714). Estos efectos del colesterol HDL son independientes de las concentraciones de triglicéridos y colesterol LDL. En la práctica clínica, un colesterol HDL bajo en plasma es asociado más comúnmente con otros trastornos que aumentan los triglicéridos en plasma, por ejemplo, obesidad central, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad renal (insuficiencia renal crónica o proteinuria nefrótica) (Kashyap. *J. Cardiol.* 1998. 82: 42U-48U).

Actualmente, no se conocen agentes terapéuticos directos que afecten la función de la ApoCIII. Se ha postulado que el efecto hipolipidémico de la clase de fármacos fibratos tiene lugar a través de un mecanismo donde el receptor activado por proliferador de peroxisoma (PPAR) media el desplazamiento de HNF-4 desde el promotor de apolipoproteína C-III, lo que da como resultado la supresión transcripcional de la apolipoproteína C-III (Hertz et al., *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 13470-13475). La clase de estatinas de fármacos hipolipidémicos también reduce los niveles de triglicéridos a través de un mecanismo desconocido, lo que da como resultado aumentos en el ARNm de lipoproteína lipasa y una disminución en los niveles en plasma de la apolipoproteína C-III (Schoonjans et al., *FEBS Lett.*, 1999, 452, 160-164). Consecuentemente, sigue habiendo una necesidad largamente sentida para agentes adicionales capaces de inhibir eficazmente la función de la apolipoproteína C-III.

La tecnología antisentido está emergiendo como un medio eficaz para reducir la expresión de ciertos productos génicos y puede, por lo tanto, demostrarse que es especialmente útil en una variedad de aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de investigación para la modulación de la ApoCIII.

Hemos divulgado anteriormente composiciones y método para inhibir la ApoCIII mediante compuestos antisentido en la US 20040208856 (Patente US 7.598.227), la US 20060264395 (Patente US 7.750.141), y la WO 2004/093783. En la presente solicitud, divulgamos el resultado inesperado de que la inhibición antisentido de la ApoCIII dio como resultado la elevación de los niveles de HDL y la disminución de los niveles de triglicéridos posprandiales. Este resultado será útil, por ejemplo, para tratar, prevenir, retrasar, disminuir o mejorar una o más enfermedades, como enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, enfermedad del corazón coronaria o enfermedades aterogénicas). Por ejemplo, se han identificado niveles de triglicéridos postprandiales (no ayunantes) elevados como un factor de riesgo significativo para enfermedades cardiovasculares (Bansal et al., *JAMA*, 2007, 298: 309-16; Nordestgaard et al., *JAMA*, 2007, 298: 299-308). También, en la presente solicitud, la inhibición de la expresión de ApoCIII da como resultado inesperadamente una depuración de quilomicron aumentada y es, por lo tanto, importante en la prevención de la quilomicronemia (Chait et al., 1992, *Adv Intern Med.* 1992, 37: 249-73), un estado dislipidémico provocado por la eliminación inadecuada de triglicérido de quilomicron. Las formas graves de quilomicronemia pueden llevar a pancreatitis, una afección potencialmente mortal. Inhibiendo la ApoCIII intestinal, se reduce la inhibición de la lipoproteína lipasa y se aumentaría la depuración de triglicérido de quilomicrones, previniendo de este modo la pancreatitis.

Sumario de la invención

En la presente se divulgan métodos para aumentar los niveles de HDL administrando a un animal un compuesto dirigido a ApoCIII.

La invención proporciona un compuesto antisentido dirigido a ApoCIII que comprende un oligonucleótido modificado para su uso en la prevención, tratamiento, retraso o mejora de la pancreatitis en un sujeto, en donde el compuesto antisentido inhibe la expresión de ApoCIII en el sujeto, y en donde el oligonucleótido modificado comprende por lo menos una fracción de azúcar modificado, ligamiento inter-nucleósidos modificado y/o nucleobase modificada.

Sumario de la Divulgación

En la presente se divulga un método para prevenir, tratar, mejorar, retrasar la aparición de o reducir el riesgo de una enfermedad, trastorno o afección cardiovascular en un animal que comprende administrar un compuesto dirigido a ApoCIII al animal. El compuesto administrado al animal previene, trata, mejora, retrasa la aparición o reduce el riesgo de, enfermedad, trastorno o afección cardiovascular al aumentar los niveles de HDL en el animal.

En la presente se divulga un método para reducir el riesgo de una enfermedad cardiovascular en un animal

que comprende administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados, en donde el oligonucleótido modificado es complementario a un ácido nucleico de ApoCIII. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico de ApoCIII es como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados, y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8 nucleobases contiguas de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3). En realizaciones adicionales, el compuesto administrado al animal reduce el riesgo de una enfermedad cardiovascular, aumentando los niveles de HDL.

En la presente se divulga un método para prevenir, tratar, mejorar o reducir por lo menos un síntoma de una enfermedad cardiovascular en un animal, que comprende administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos ligados, en donde el oligonucleótido modificado es complementario a un ácido nucleico de ApoCIII. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico de ApoCIII es como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados, y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8 nucleobases contiguas de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3). En realizaciones adicionales, el compuesto administrado al animal previene, trata, mejora, o reduce por lo menos un síntoma de enfermedad cardiovascular en el animal, aumentando los niveles de HDL en el animal.

En la presente se divulga un método para elevar los niveles de HDL en un animal administrando al animal un compuesto que consiste de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3) para elevar los niveles de HDL en el animal.

En la presente se divulga un método para prevenir, tratar, mejorar o reducir por lo menos un síntoma de una enfermedad cardiovascular en un animal mediante la administración al animal de un compuesto que consiste en ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3) para prevenir, tratar, mejorar o reducir por lo menos un síntoma de la enfermedad cardiovascular en el animal, aumentando los niveles de HDL en el animal.

En la presente se divulga un método para elevar los niveles de HDL en un animal administrando al animal un oligonucleótido modificado, que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 3 (ISIS 304801) en donde el oligonucleótido modificado comprende: un segmento gap que consiste en 10 desoxinucleósidos ligados; un segmento de ala 5' que consiste en 5 nucleósidos ligados; un segmento de ala 3' que consiste en 5 nucleósidos ligados; en donde el segmento gap está posicionado inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3' y en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metioxietilo, en donde cada citosina es una 5'-metilcitosina, y en donde cada ligamiento inter-nucleósidos es un enlace fosforotioato, en donde el oligonucleótido modificado eleva los niveles de HDL en el animal.

En la presente se divulga un método para prevenir, tratar, mejorar o reducir por lo menos un síntoma de una enfermedad cardiovascular en un animal administrando al animal un oligonucleótido modificado, que tiene la secuencia de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3) en donde el oligonucleótido modificado comprende: un segmento gap que consiste en 10 desoxinucleósidos ligados; un segmento de ala 5' que consiste de 5 nucleósidos ligados; un segmento de ala 3' que consiste en 5 nucleósidos ligados; en donde el segmento gap está posicionado inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3' y donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metioxietilo, en donde cada citosina es una 5'-metilcitosina, y en donde cada ligamiento inter-nucleósidos es un enlace fosforotioato, en donde el oligonucleótido modificado previene, trata, mejora o reduce por lo menos un síntoma en el animal con la enfermedad cardiovascular elevando los niveles de HDL en el animal.

En la presente se divulga un método para elevar los niveles de HDL en un animal administrando al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados, donde el oligonucleótido modificado es complementario a un ácido nucleico de ApoCIII, como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, para elevar los niveles de HDL en el animal.

En la presente se divulga un método para prevenir, tratar, mejorar o reducir por lo menos un síntoma de una enfermedad cardiovascular en un animal administrando al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos ligados, donde el oligonucleótido modificado es complementario a un ácido nucleico de ApoCIII, como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, para prevenir, tratar, mejorar o reducir por lo menos un síntoma de la enfermedad cardiovascular en el animal, elevando los niveles de HDL del animal.

En la presente se divulga un método para disminuir los niveles de CETP administrando un compuesto dirigido a ApoCIII a un animal. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos ligados, y que tiene una secuencia de nucleobases complementaria a un ácido nucleico de ApoCIII. En ciertas realizaciones, la secuencia de la nucleobases comprende por lo menos 8 nucleobases contiguas de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3). En ciertas realizaciones, el compuesto consiste de las nucleobases de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3).

En la presente se divulga un método para aumentar ApoA1, PON1, depuración de grasa, depuración de triglicéridos de quilomicrones, depuración de triglicéridos posprandiales o HDL administrando un compuesto dirigido a ApoCIII a un animal. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados, y que tiene una secuencia de nucleobases complementaria a un ácido nucleico de ApoCIII. En ciertas realizaciones, la secuencia de la nucleobase comprende por lo menos 8 nucleobases contiguas de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3). En ciertas realizaciones, el compuesto consiste de las nucleobases de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3).

En la presente se divulga un método para prevenir, retrasar o mejorar la pancreatitis que comprende: (a) seleccionar un animal con, o en riesgo de, pancreatitis, y (b) administrar un compuesto dirigido a ApoCIII al animal, en donde la pancreatitis se previene, retrasa o mejora.

En la presente se divulga un método para prevenir, retrasar o mejorar la pancreatitis que comprende: (a) seleccionar un animal con, o en riesgo de pancreatitis, y (b) administrar un compuesto dirigido a ApoCIII al animal, aumentando así la depuración de quilomicrones, en donde la pancreatitis se previene, retrasa o mejora.

En ciertas realizaciones, el animal tiene, o está en riesgo de, hipertrigliceridemia. En ciertas realizaciones, la hipertrigliceridemia es Fredrickson Tipo II, IV o V. En ciertas realizaciones, el animal tiene un defecto genético que lleva a hipertrigliceridemia. En ciertas realizaciones, el defecto genético es una deficiencia de LPL heterocigota o un polimorfismo de ApoCIII. En ciertas realizaciones, el animal tiene un nivel de triglicéridos ≥ 500 mg/dl y una deficiencia de LPL heterocigótica.

En ciertas realizaciones, el animal tiene un nivel de triglicéridos entre 100-200 mg/dl, 100-300 mg/dl, 100-400 mg/dl, 100-500 mg/dl, 200-500 mg/dl, 300-500 mg/dl, 400-500 mg/dl, 500-1000 mg/dl, 600-1000 mg/dl, 700-1000 mg/dl, 800-1000 mg/dl, 900-1000 mg/dl, 500-1500 mg/dl, 1000-1500 mg/dl, 100-2000 mg/dl, 150-2000 mg/dl, 200-2000 mg/dl, 300-2000 mg/dl, 400-2000 mg/dl, 500-2000 mg/dl, 600-2000 mg/dl, 700-2000 mg/dl, 800-2000 mg/dl, 900-2000 mg/dl, 1000-2000 mg/dl, 1100-2000 mg/dl, 1200-2000 mg/dl, 1300-2000 mg/dl, 1400-2000 mg/dl, o 1500-2000 mg/dl. [0035]

En ciertas realizaciones, la depuración de quilomicrón aumentada mejora la depuración de los triglicéridos posprandiales y/o disminuye los triglicéridos posprandiales.

En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII para prevenir, tratar, mejorar o reducir por lo menos un síntoma de una enfermedad cardiovascular, aumentando los niveles de HDL.

En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII para aumentar los niveles de HDL en un animal.

En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII para la preparación de un medicamento para aumentar los niveles de HDL en un animal.

En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII para la preparación de un medicamento para mejorar la proporción de TG a HDL.

Descripción Detallada

Debe entenderse que tanto la descripción general precedente como la siguiente descripción detallada son solamente ejemplares y explicativas y no son restrictivas de la invención, como se reivindica. En la presente, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. Como se usa en la presente, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluyendo", así como otras formas, como "incluye" e "incluido", no es limitativo. Además, los términos como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Los encabezamientos de las secciones utilizados en la presente son solo con propósitos de organización y no deben interpretarse como limitativos de la materia descrita.

Definiciones

A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritos en la presente memoria son los bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Pueden usarse técnicas estándar para la síntesis química y el análisis químico.

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

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

5 "Nucleótido de 2'-O-metoxietilo" significa un nucleótido que comprende una fracción de azúcar modificado de 2'-O-metoxietilo.

10 "Sitio objetivo 3'" se refiere al nucleótido de un ácido nucleico objetivo que es complementario al nucleótido más 3' de un compuesto antisentido particular.

"Sitio objetivo 5'" se refiere al nucleótido de un ácido nucleico objetivo que es complementario al nucleótido más 5' de un compuesto antisentido particular.

15 "5-metilcitosina" significa una citosina modificada con un grupo metilo unido a la posición 5'. Una 5-metilcitosina es una nucleobase modificada.

"Aproximadamente" significa dentro del ±10% de un valor. Por ejemplo, si se indica, "un marcador puede aumentarse en aproximadamente un 50%", se da a entender que el marcador puede aumentarse entre un 45%-55%.

20 "Agente farmacéutico activo" significa la sustancia o sustancias en una composición farmacéutica que proporcionan un beneficio terapéutico cuando se administran a un individuo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones un oligonucleótido antisentido dirigido a ApoCIII es un agente farmacéutico activo.

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

30 "Administrado concomitantemente" se refiere a la co-administración 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 única composición farmacéutica, en la misma forma de dosificación, o por la misma vía de administración. Los efectos de ambos agentes no necesitan manifestarse al mismo tiempo. Los efectos solo necesitan superponerse por un período de tiempo y no necesitan ser co-extensivos.

35 "Administrar" significa proporcionar un agente farmacéutico a un individuo, e incluye, pero no está limitado a, administrar por un profesional médico y auto-administración.

40 "Agente" significa una sustancia activa que puede proporcionar un beneficio terapéutico cuando se administra a un animal. "Primer agente" significa un compuesto terapéutico de la invención. Por ejemplo, un primer agente puede ser un oligonucleótido antisentido dirigido a ApoCIII. "Segundo agente" significa un segundo compuesto terapéutico de la invención (por ejemplo, un segundo oligonucleótido antisentido que se dirige a ApoCIII) y/o un compuesto terapéutico no de ApoCIII.

45 "Mejoría" se refiere a una disminución de por lo menos un indicador, signo o síntoma de una enfermedad, trastorno o afección asociados. La gravedad de los indicadores puede determinarse mediante medidas subjetivas u objetivas, que son conocidas por los expertos en la técnica.

50 "Animal" se refiere a un animal humano o no humano, que incluye, pero no limitado a, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y primates no humanos, incluyendo, pero no limitado a, monos y chimpancés.

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

"Compuesto antisentido" significa un compuesto oligomérico que es capaz de experimentar hibridación con un ácido nucleico objetivo a través de enlaces de hidrógeno. Como se usa en la presente, el término "compuesto antisentido" abarca derivados farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la presente.

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

65 "Oligonucleótido antisentido" significa un oligonucleótido de cadena sencilla que tiene una secuencia de nucleobases que permite la hibridación con una región o segmento correspondiente de un ácido nucleico

objetivo. Como se usa en la presente, el término "oligonucleótido antisentido" abarca derivados farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la presente.

5 "ApoCIII" significa cualquier secuencia de ácidos nucleicos o proteínas que codifica ApoCIII. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una ApoCIII incluye una secuencia de ADN que codifica ApoCIII, una secuencia de ARN transcrita de ADN que codifica ApoCIII (incluyendo ADN genómico que comprende intrones y exones), una secuencia de ARNm que codifica ApoCIII o una secuencia de péptidos que codifica ApoCIII.

10 "ARNm de ApoCIII" significa un ARNm que codifica una proteína de ApoCIII.

"Proteína de ApoCIII" significa cualquier secuencia de proteína que codifica ApoCIII.

15 "Aterosclerosis" significa un endurecimiento de las arterias que afectan las arterias grandes y medianas y se caracteriza por la presencia de depósitos de grasa. Los depósitos de grasa se denominan "ateromas" o "placas", que consisten principalmente de colesterol y otras grasas, calcio y tejido cicatricial, y dañan el revestimiento de las arterias.

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

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

25 "Estructura de tapón" o "fracción de tapón terminal" significa modificaciones químicas, que se han incorporado en cualquiera de los terminales de un compuesto antisentido.

30 "Enfermedad cardiovascular" o "trastorno cardiovascular" se refiere a un grupo de afecciones relacionadas con el corazón, los vasos sanguíneos o la circulación. Los ejemplos de enfermedades cardiovasculares incluyen, pero no están limitadas a, aneurisma, angina de pecho, arritmia, aterosclerosis, enfermedad cerebrovascular (apoplejía), enfermedad coronaria, hipertensión, dislipidemia, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia.

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

40 "Compuesto antisentido quimérico" significa un compuesto antisentido que tiene por lo menos dos regiones químicamente distintas.

45 El "colesterol" es una molécula de esteroles que se encuentra en las membranas celulares de todos los tejidos animales. El colesterol debe ser transportado en el plasma sanguíneo de un animal por lipoproteínas que incluyen lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de densidad intermedia (IDL), lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL). "Colesterol en plasma" se refiere a la suma del colesterol esterificado y/o no esterificado de todas las lipoproteínas (VLDL, IDL, LDL, HDL) presente en el plasma o suero.

50 "Inhibidor de la absorción del colesterol" significa un agente que inhibe la absorción del colesterol exógeno obtenido de la dieta.

55 "Co-administración" significa la administración de dos o más agentes a un individuo. Los dos o más agentes pueden estar en una única composición farmacéutica, o pueden estar en composiciones farmacéuticas separadas. Cada uno de los dos o más agentes puede administrarse a través de las mismas vías de administración o diferentes. La co-administración abarca la administración paralela o secuencial.

60 "Complementariedad" significa la capacidad para el emparejamiento entre nucleobases de un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico. En ciertas realizaciones, la complementariedad entre el primer y el segundo ácido nucleico puede estar entre dos cadenas de ADN, entre dos cadenas de ARN, o entre una cadena de ADN y una de ARN. En ciertas realizaciones, algunas de las nucleobases en una cadena coinciden con una base de enlace de hidrógeno complementaria en la otra cadena. En ciertas realizaciones, todas las nucleobases en una cadena coinciden con una base de enlace de hidrógeno complementaria en la otra cadena. En ciertas realizaciones, un primer ácido nucleico es un compuesto antisentido y un segundo ácido nucleico es un ácido nucleico objetivo. En ciertas de tales realizaciones, un oligonucleótido antisentido es un primer ácido nucleico y un ácido nucleico objetivo es un segundo ácido nucleico.

65

"Nucleobases contiguas" significa nucleobases inmediatamente adyacentes entre sí.

"Etilo restringida" o "cEt" se refiere a un nucleósido bicíclico que tiene un azúcar de furanosilo que comprende un puente de metilo(metilenoxi)(4'-CH(CH₃)-O-2') de puente entre los átomos de carbono 4' y 2' .

"Reactivo cruzado" significa que un compuesto oligomérico dirigido a una secuencia de ácidos nucleicos que puede hibridar a una secuencia de ácidos nucleicos diferente. Por ejemplo, en algunos casos, un oligonucleótido antisentido dirigido a ApoCIII humana puede reaccionar de manera cruzada con una ApoCIII murina. Si un compuesto oligomérico reacciona de manera cruzada con una secuencia de ácidos nucleicos diferente de su objetivo designado depende del grado de complementariedad que el compuesto tiene con la secuencia de ácidos nucleicos no objetivo. Cuanto mayor sea la complementariedad entre el compuesto oligomérico y el ácido nucleico no objetivo, más probable será que el compuesto oligomérico reaccione de forma cruzada con el ácido nucleico.

"Curar" significa un método que restaura la salud o un tratamiento prescrito para una enfermedad.

"Enfermedad del corazón coronaria (CHD)" significa un estrechamiento de los vasos sanguíneos pequeños que suministran sangre y oxígeno al corazón, que a menudo es un resultado de la aterosclerosis.

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

"Diabetes mellitus" o "diabetes" es un síndrome caracterizado por un metabolismo desordenado y azúcar en sangre anormalmente alta (hiperglucemia) como resultado de niveles insuficientes de insulina o sensibilidad a la insulina reducida. Los síntomas característicos son producción de orina excesiva (poliuria) debida a niveles de glucosa en sangre altos, sed excesiva e ingesta de fluidos aumentada (polidipsia) que intentan compensar la micción aumentada, visión borrosa debido a los efectos de glucosa en sangre alta en la óptica del ojo, pérdida de peso inexplicable, y letargo.

"Dislipidemia diabética" o "diabetes tipo 2 con dislipidemia" significa una afección caracterizada por diabetes Tipo 2, HDL-C reducido, triglicéridos elevados y partículas de LDL densas, pequeñas elevadas.

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

"Dislipidemia" se refiere a un trastorno del metabolismo de lípidos y/o lipoproteínas, que incluye la sobreproducción o deficiencia de lípidos y/o lipoproteínas. Las dislipidemias pueden manifestarse por elevación de lípidos como quilomicrón, colesterol y triglicéridos así como por lipoproteínas como el colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Un ejemplo de una dislipidemia es la quilomicronemia.

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

"Dosis" significa una cantidad especificada de un agente farmacéutico proporcionada en una única administración, o en un período de tiempo especificado. En ciertas realizaciones, una dosis puede administrarse en uno, dos o más bolos, comprimidos o inyecciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones donde se desea la administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen no acomodado fácilmente por una única inyección, por lo tanto, pueden usarse dos o más inyecciones para alcanzar la dosis deseada. En ciertas realizaciones, el agente farmacéutico se administra por infusión durante un período de tiempo extendido o continuamente. Las dosis pueden establecerse como la cantidad de agente farmacéutico por hora, día, semana o mes. Las dosis también se pueden expresar como mg/kg o g/kg.

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

El sistema "Fredrickson" se usa para clasificar las causas primarias (genéticas) de la dislipidemia en varios subgrupos o tipos. Los tipos de dislipidemia que pueden ser susceptibles de terapia con los compuestos divulgados en la presente incluyen, pero no están limitados a, Fredrickson Tipo II, IV y V.

El "Fredrickson Tipo I" existe en varias formas: el Tipo 1a es una deficiencia de lipoproteína lipasa debida a una deficiencia de LPL o apoC-II alterada; El Tipo 1b es una deficiencia de apoproteína CII familiar, una afección provocada por una carencia del activador de la lipoproteína lipasa; y el Tipo 1c es una quilomicronemia debida al inhibidor circulante de la lipoproteína lipasa. El Tipo I es un trastorno raro que habitualmente se presenta en la infancia. Está caracterizado por elevaciones severas de los quilomicrones y niveles de TG extremadamente elevados (superando siempre con creces los 1000 mg/dl y aumentando no pocas veces tanto como a 10.000 mg/dl o más) con episodios de dolor abdominal, pancreatitis aguda recurrente, xantomas cutáneos eruptivos, y hepatoesplenomegalia. Los pacientes rara vez desarrollan aterosclerosis, quizás debido a que sus partículas de lipoproteína en plasma son demasiado grandes para entrar en la íntima arterial (Nordestgaard et al., J Lipid Res, 1988, 29: 1491 - 1500; Nordestgaard et al., Arteriosclerosis, 1988, 8: 421 - 428). El Tipo I está provocado habitualmente por mutaciones o del gen *LPL* o del cofactor del gen apoC-II, dando como resultado la incapacidad de los individuos afectados para producir LPL funcionalmente activa. Los pacientes son u homocigotos para tales mutaciones o compuestos heterocigotos. La prevalencia es de aproximadamente 1 en 1.000.000 en la población general y mucho más alta en Sudáfrica y el este de Quebec como resultado de un efecto fundador. Los pacientes responden mínimamente, o no lo hacen, a los fármacos que disminuyen los TG (Tremblay et al., J Clin Lipidol, 2011, 5: 37-44; Brisson y cols., Pharmacogenet Genom, 2010, 20: 742-747) y, por tanto, se usa la restricción de la grasa en la dieta a 20 gramos/día o menos para controlar los síntomas de este trastorno raro.

El "Fredrickson Tipo II" es la forma más común de hiperlipidemia primaria. Se clasifica adicionalmente en Tipo IIa y Tipo IIb, dependiendo principalmente de si hay elevación de VLDL además del colesterol LDL (LDL-C). El Tipo IIa (hipercolesterolemia familiar) puede ser esporádico (debido a factores dietéticos), poligénico o verdaderamente familiar como resultado de una mutación en el gen del receptor de LDL en el cromosoma 19 (0,2% de la población) o la apolipoproteína B (apoB) gen (0.2%). La forma familiar se caracteriza por xantoma de tendón, xantelasma y enfermedad cardiovascular prematura. La incidencia de esta enfermedad es de aproximadamente 1 en 500 para heterocigotos y 1 en 1.000.000 para homocigotos. El Tipo IIb (también conocido como hiperlipoproteinemia familiar combinada) es una hiperlipidemia mixta (colesterol y niveles de TG altos), provocado por elevaciones en LDL-C y en VLDL. Los altos niveles de VLDL se deben a la sobreproducción de sustratos, incluyendo TG, acetil CoA y un aumento en la síntesis de B-100. También pueden ser provocados por la disminución de la depuración de LDL. La prevalencia en la población es de aproximadamente 10%.

El "Fredrickson Tipo III" (también conocido como disbetalipoproteinemia) es una enfermedad de eliminación remanente, o enfermedad de beta amplia (Fern et al., J Clin Pathol, 2008, 61: 1174-118). Se debe a VLDL rica en colesterol (β -VLDL). Típicamente, los pacientes con esta afección tienen niveles elevados de colesterol y TG en plasma debido a la depuración deteriorada de los remanentes de quilomicrones y VLDL (por ejemplo, IDL). La depuración deteriorada es debida a un defecto en la apolipoproteína E (apoE). La apoE que funciona normalmente contenida en los remanentes permitiría el enlace al receptor de LDL y la eliminación de la circulación. La acumulación de los remanentes en individuos afectados puede dar como resultado xantomatosis y enfermedad coronaria y/o vascular periférica prematura. La causa más común para el Tipo III es la presencia del genotipo apoE E2/E2. Su prevalencia se ha estimado en aproximadamente 1 en 10.000.

El "Fredrickson Tipo IV" (también conocido como hipertrigliceridemia familiar) es una afección autosómica dominante que tiene lugar en aproximadamente el 1% de la población. Los niveles de TG son elevados como resultado del exceso de producción hepática de VLDL o deficiencia de LPL heterocigótica, pero son casi siempre menores de 1000 mg/dl. Los niveles de colesterol en suero están habitualmente dentro de los límites normales. El trastorno es heterogéneo y el fenotipo está fuertemente influenciado por factores ambientales, particularmente el consumo de carbohidratos y etanol.

El "Fredrickson Tipo V" tiene VLDL y quilomicrones altos. Se caracteriza por portadores de variantes del gen de la LPL con pérdida de función asociados con la actividad de la LPL de por lo menos el 20% (es decir, deficiencia de LPL parcial en comparación con Fredrickson tipo I). Estos pacientes presentan plasma lactescente e hipertrigliceridemia severa debido a quilomicrones y VLDL. Los niveles de TG son invariablemente mayores de 1000 mg/dl y los niveles de colesterol total siempre son elevados. El nivel de LDL-C es habitualmente bajo. También se asocia con un riesgo aumentado de pancreatitis aguda, intolerancia a la glucosa e hiperuricemia. Los síntomas generalmente se presentan en la edad adulta (>35 años) y, aunque la prevalencia es relativamente rara, es mucho más común que los pacientes con deficiencia de LPL homocigoto o heterocigoto compuesta.

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

"Gapmer" significa un compuesto antisentido quimérico en el que una región interna que tiene una pluralidad de nucleósidos que soportan la escisión de RNasa H está posicionada entre regiones externas que tienen uno o más nucleósidos, en donde los nucleósidos que comprenden la región interna son químicamente distintos del nucleósido o nucleósidos que comprenden las regiones externas. La región interna se puede denominar "gap" o

"segmento gap" y las regiones externas se pueden denominar "alas" o "segmentos de ala".

5 "Gap-ampliado" significa un compuesto antisentido quimérico que tiene un segmento gap de 12 o más 2'-desoxirribonucleósidos contiguos situados entre e inmediatamente adyacentes a los segmentos de ala 5' y 3' que tiene de uno a seis nucleósidos.

"Glucosa" es un monosacárido utilizado por las células como fuente de energía e intermediario inflamatorio. "Glucosa en plasma" se refiere a la glucosa presente en el plasma.

10 "Lipoproteína C de alta densidad (HDL-C)" significa colesterol asociado con partículas de lipoproteínas de alta densidad. La concentración de HDL-C en suero (o plasma) se cuantifica típicamente en mg/dl o nmol/l. "HDL-C" y "HDL-C en plasma" significan HDL-C en suero y plasma, respectivamente.

15 "Inhibidor de HMG-CoA reductasa" significa un agente que actúa a través de la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa, como atorvastatina, rosuvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina y simvastatina.

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

25 "Hipercolesterolemia" significa una afección caracterizada por colesterol o colesterol circulante (plasma), colesterol LDL y colesterol VLDL elevados, según las pautas del Expert Panel Report of the National Cholesterol Educational Program (NCEP) of Detection, Evaluation of Treatment of high cholesterol in adults (ver, Arch. Int. Med. (1988) 148, 36-39).

30 "Hiperlipidemia" o "hiperlipemia" es una afección caracterizada por niveles elevados de lípidos en suero o lípidos circulantes (en plasma). Esta afección manifiesta una concentración anormalmente alta de grasas. Las fracciones de lípidos en la sangre circulante son colesterol, lipoproteínas de baja densidad, lipoproteínas de muy baja densidad, quilomicrones y triglicéridos. La clasificación de hiperlipidemias de Fredrickson se basa en el patrón de TG y partículas de lipoproteínas ricas en colesterol, como se mide por electroforesis o ultracentrifugación, y se usa comúnmente para caracterizar las causas principales de hiperlipidemias como la hipertrigliceridemia (Fredrickson y Lee, Circulation, 1965, 31: 321 -327 ; Fredrickson et al., New Eng J Med, 1967, 276 (1): 34-42).

35 "Hipertrigliceridemia" significa una condición caracterizada por niveles elevados de triglicéridos. Su etiología incluye factores primarios (es decir, causas genéticas) y secundarios (otras causas subyacentes, como diabetes, síndrome metabólico/resistencia a la insulina, obesidad, inactividad física, tabaquismo, exceso de alcohol y una dieta muy alta en hidratos de carbono) o, más a menudo, una combinación de ambos (Yuan et al. CMAJ, 2007, 176: 1113-1120).

40 "Identificar" o "seleccionar un animal con enfermedad metabólica o cardiovascular" significa identificar o seleccionar un sujeto propenso a o al que se le ha diagnosticado una enfermedad metabólica, una enfermedad cardiovascular o un síndrome metabólico; o, identificar o seleccionar un sujeto que tenga cualquier síntoma de una enfermedad metabólica, enfermedad cardiovascular o síndrome metabólico, incluyendo, pero no limitado a, hipercolesterolemia, hiperglucemia, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, hipertensión, resistencia a la insulina
45 aumentada, sensibilidad a la insulina disminuida, peso corporal superior al normal y/o contenido de grasas corporal por encima del normal o cualquier combinación de los mismos. Dicha identificación puede lograrse mediante cualquier método, incluyendo, pero no limitado a, pruebas o evaluaciones clínicas estándar, como medición del colesterol en suero o circulante (plasma), medición de triglicéridos en suero o circulantes (plasma), medición de presión sanguínea, medición de contenido de grasas corporal, medición del peso corporal, y similares.

50 "Resultado cardiovascular mejorado" significa una reducción en la ocurrencia de eventos cardiovasculares adversos, o el riesgo de los mismos. Los ejemplos de eventos cardiovasculares adversos incluyen, sin limitación, muerte, reinfarto, apoplejía, choque cardiogénico, edema pulmonar, paro cardíaco y arritmia auricular.

55 "Inmediatamente adyacente" significa que no hay elementos intermedios entre los elementos inmediatamente adyacentes, por ejemplo, entre regiones, segmentos, nucleótidos y/o nucleósidos.

60 "Aumentar HDL" o "elevar HDL" significa aumentar el nivel de HDL en un animal después de la administración de por lo menos un compuesto de la invención, en comparación con el nivel de HDL en un animal al que no se le ha administrado ningún compuesto.

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

65 "Inducir", "inhibir", "potenciar", "elevar", "aumentar", "disminuir", "reducir" o similares denotan diferencias

cuantitativas entre dos estados. Por ejemplo, "una cantidad eficaz para inhibir la actividad o expresión de ApoCIII" significa que el nivel de actividad o expresión de ApoCIII en una muestra tratada diferirá del nivel de actividad o expresión de ApoCIII en una muestra no tratada. Tales términos se aplican a, por ejemplo, niveles de expresión, y niveles de actividad.

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

10 "Resistencia a la insulina" se define como la condición en la que las cantidades normales de insulina son inadecuadas para producir una respuesta a la insulina normal de las células grasas, musculares y hepáticas. La resistencia a la insulina en las células grasas da como resultado la hidrólisis de triglicéridos almacenados, que eleva los ácidos grasos libres en el plasma sanguíneo. La resistencia a la insulina en el músculo reduce la captación de glucosa, mientras que la resistencia a la insulina en el hígado reduce el almacenamiento de glucosa, sirviendo ambos efectos para elevar la glucosa en sangre. Los niveles en plasma altos de insulina y glucosa debidos a la resistencia a la insulina llevan a menudo al síndrome metabólico y diabetes tipo 2.

15 "Sensibilidad a la insulina" es una medida de la eficacia con la que un individuo procesa la glucosa. Un individuo que tiene alta sensibilidad a la insulina procesa la glucosa de manera eficaz, mientras que un individuo con baja sensibilidad a la insulina no procesa la glucosa eficazmente.

20 "Ligamiento inter-nucleósidos" se refiere al enlace químico entre nucleósidos.

"Administración intravenosa" significa la administración en una vena.

25 "Nucleósidos ligados" significa nucleósidos adyacentes que están enlazados entre sí.

"Disminución de lípidos" significa una reducción en uno o más lípidos en un sujeto. "Elevación de lípidos" significa un aumento en un lípido (por ejemplo, HDL) en un sujeto. La disminución de lípidos o la elevación de lípidos puede tener lugar con una o más dosis a lo largo del tiempo.

30 "Terapia de disminución de lípidos" o "agente reductor de lípidos" significa un régimen terapéutico proporcionado a un sujeto para reducir uno o más lípidos en un sujeto. En ciertas realizaciones, se proporciona una terapia hipolipemiente para reducir uno o más de CETP, ApoB, colesterol total, LDL-C, VLDL-C, IDL-C, no-HDL-C, triglicéridos, partículas de LDL densas pequeñas, y Lp(a) en un sujeto. Los ejemplos de terapia hipolipemiente incluyen estatinas, fibratos, inhibidores de MTP.

35 "Lipoproteína", como VLDL, LDL y HDL, se refiere a un grupo de proteínas que se encuentran en el suero, el plasma y la linfa y son importantes para el transporte de lípidos. La composición química de cada lipoproteína difiere en que el HDL tiene una mayor proporción de proteína frente a los lípidos, mientras que el VLDL tiene una menor proporción de proteína frente a los lípidos.

40 "Lipoproteína-colesterol de baja densidad (LDL-C)" significa colesterol transportado en partículas de lipoproteínas de baja densidad. La concentración de LDL-C en suero (o plasma) típicamente se cuantifica en mg/dl o nmol/l. "LDL-C en suero" y "LDL-C en plasma" significan LDL-C en el suero y plasma, respectivamente.

45 "Factores de riesgo principales" se refiere a factores que contribuyen a un riesgo alto de una enfermedad o afección en particular. En ciertas realizaciones, los principales factores de riesgo para enfermedad cardíaca coronaria incluyen, sin limitación, tabaquismo, hipertensión, HDL-C bajo, antecedentes familiares de enfermedad cardíaca coronaria, edad y otros factores divulgados en la presente.

50 "Trastorno metabólico" o "enfermedad metabólica" se refiere a una afección caracterizada por una alteración o perturbación en la función metabólica. "Metabólico" y "metabolismo" son términos bien conocidos en la técnica e incluyen generalmente el rango completo de procesos bioquímicos que se producen dentro de un organismo vivo. Los trastornos metabólicos incluyen, pero no están limitados a, hiperglucemia, prediabetes, diabetes (tipo 1 y tipo 2), obesidad, resistencia a la insulina, síndrome metabólico y dislipidemia debido a diabetes tipo 2.

55 "Síndrome metabólico" significa una afección caracterizada por un agrupamiento de factores de riesgo cardiovascular de lípidos y no de lípidos de origen metabólico. En ciertas realizaciones, el síndrome metabólico se identifica por la presencia de cualquiera de 3 de los siguientes factores: circunferencia de cintura mayor de 102 cm en hombres o mayor de 88 cm en mujeres; triglicéridos en suero de por lo menos 150 mg/dl; HDL-C menor de 40 mg/dl en hombres o menos de 50 mg/dl en mujeres; presión sanguínea de por lo menos 130/85 mmHg; y glucosa en ayunas de por lo menos 110 mg/dl. Estos determinantes pueden medirse fácilmente en la práctica clínica (JAMA, 2001, 285: 2486-2497).

65 "Desemparejamiento" o "nucleobase no complementaria" se refiere al caso en el que una nucleobase de un

primer ácido nucleico no es capaz de emparejarse con la nucleobase correspondiente de un segundo ácido nucleico objetivo.

5 "Dislipidemia mixta" significa una afección caracterizada por colesterol elevado y triglicéridos elevados.

"Ligamiento inter-nucleósidos modificado" se refiere a una sustitución o cualquier cambio de un enlace inter-nucleósidos natural. Por ejemplo, un ligamiento fosforotioato es un ligamiento inter-nucleósidos modificado.

10 "Nucleobase modificada" se refiere a cualquier nucleobase que no sea adenina, citosina, guanina, timidina o uracilo. Por ejemplo, 5-metilcitosina es una nucleobase modificada. Una "nucleobase no modificada" significa bases de purina adenina (A) y guanina (G), y bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U).

15 "Nucleósido modificado" significa un nucleósido que tiene por lo menos una fracción de azúcar modificada y/o nucleobase modificada.

"Nucleótido modificado" significa un nucleótido que tiene por lo menos un resto de azúcar modificado, un ligamiento inter-nucleósidos modificado y/o nucleobase modificada.

20 "Oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido que comprende por lo menos un nucleótido modificado.

"Azúcar modificado" se refiere a una sustitución o cambio de un azúcar natural. Por ejemplo, un azúcar modificado 2'-O-metoxietilo es un azúcar modificado.

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

"Ligamiento inter-nucleósidos de origen natural" significa un ligamiento fosfodiéster de 3' a 5'.

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

35 "Ácido nucleico" se refiere a moléculas compuestas de nucleótidos monoméricos. Un ácido nucleico incluye ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos nucleicos de cadena sencilla (ADNss), ácidos nucleicos de cadena doble (ADNds), ácidos ribonucleicos interferentes pequeños (ARNip) y microARN (ARNmi). Un ácido nucleico también puede comprender una combinación de estos elementos en una única molécula.

"Nucleobase" significa una fracción heterocíclica capaz de emparejarse con una base de otro ácido nucleico.

40 "Complementariedad de nucleobase" se refiere a una nucleobase que es capaz de formar pares de bases con otra nucleobase. Por ejemplo, en el ADN, la adenina (A) es complementaria a la timina (T). Por ejemplo, en el ARN, la adenina (A) es complementaria al uracilo (U). En ciertas realizaciones, la nucleobase complementaria se refiere a una nucleobase de un compuesto antisentido que es capaz de emparejar bases con una nucleobase de su ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, si una nucleobase en una cierta posición de un compuesto antisentido es capaz de enlazar por hidrógeno con una nucleobase en una cierta posición de un ácido nucleico objetivo, entonces el oligonucleótido y el ácido nucleico objetivo se consideran complementarios en ese par de nucleobases.

"Secuencia de nucleobases" significa el orden de las nucleobases contiguas independientes de cualquier modificación de azúcares, ligamientos o nucleobases.

50 "Nucleósido" significa una nucleobase ligada a un azúcar.

55 "Nucleósido mimético" incluye aquellas estructuras usadas para reemplazar el azúcar o el azúcar y la base, y no necesariamente el ligamiento en una o más posiciones de un compuesto oligomérico; por ejemplo, miméticos de nucleósidos que tienen miméticos de azúcar morfolino, ciclohexenilo, ciclohexilo, tetrahidropiraniolo, biciclo o triciclo, como unidades de azúcar no de furanosa.

"Nucleótido" significa un nucleósido que tiene un grupo fosfato ligado covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido.

60 "Nucleótido mimético" incluye aquellas estructuras usadas para reemplazar el nucleósido y el ligamiento en una o más posiciones de un compuesto oligomérico como, por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos o morfolinos (morfolinos ligados por -N(H)-C(=O)-O- u otro enlace no fosfodiéster).

65 "Compuesto oligomérico" u "oligómero" significa un polímero de subunidades monoméricas ligadas que es capaz de hibridar con una región de una molécula de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, los compuestos

oligoméricos son oligonucleósidos. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos quiméricos.

5 "Oligonucleótido" significa un polímero de nucleósidos ligados cada uno de los cuales puede modificarse o no modificarse, independientemente uno de los otros.

10 "Administración parenteral" significa la administración a través de inyección o infusión. La administración parenteral incluye administración subcutánea, administración intravenosa, administración intramuscular, administración intraarterial, administración intraperitoneal o administración intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intracerebroventricular. La administración puede ser continua, crónica, corta o intermitente.

15 "Péptido" significa una molécula formada ligando por lo menos dos aminoácidos por enlaces amida. Péptido se refiere a polipéptidos y proteínas.

20 "Agente farmacéutico" significa una sustancia que proporciona un beneficio terapéutico cuando se administra a un individuo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un oligonucleótido antisentido dirigido a ApoCIII es un agente farmacéutico.

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

25 "Portador farmacéuticamente aceptable" significa un medio o diluyente que no interfiere con la estructura del compuesto. Algunos de tales portadores permiten que se formulen composiciones farmacéuticas como, por ejemplo, comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y pastillas para la ingestión oral por un sujeto. Algunos de tales portadores permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen para inyección, infusión o administración tópica. Por ejemplo, un portador farmacéuticamente aceptable puede ser una solución acuosa estéril.

30 "Derivado farmacéuticamente aceptable" o "sales" abarca derivados de los compuestos descritos en la presente como solvatos, hidratos, ésteres, profármacos, polimorfos, isómeros, variantes isotópicamente marcadas, sales farmacéuticamente aceptables y otros derivados conocidos en la técnica.

35 "Sales farmacéuticamente aceptables" significa sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de compuestos antisentido, es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto inicial y no imparten efectos toxicológicos indeseados al mismo. El término "sal farmacéuticamente aceptable" o "sal" incluye una sal preparada a partir de ácidos o bases no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos y bases inorgánicos u orgánicos. Las "sales farmacéuticamente aceptables" de los compuestos descritos en la presente pueden prepararse por métodos bien conocidos en la técnica. Para una revisión de sales farmacéuticamente aceptables, ver Stahl y Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002). Las sales de sodio de oligonucleótidos antisentido son útiles y están bien aceptadas para administración terapéutica a humanos. Por consiguiente, en una realización, los compuestos descritos en la presente están en forma de una sal de sodio.

40 "Ligamiento fosforotioato" significa un ligamiento entre los nucleósidos donde el enlace fosfodiéster se modifica reemplazando uno de los átomos de oxígeno no puente por un átomo de azufre. Un ligamiento fosforotioato es un ligamiento inter-nucleósidos modificado.

50 "Porción" significa un número definido de nucleobases contiguas (es decir, ligadas) de un ácido nucleico. En ciertas realizaciones, una porción es un número definido de nucleobases contiguas de un ácido nucleico objetivo. En ciertas realizaciones, una porción es un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido.

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

60 "Profármaco" significa un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte en una forma activa (es decir, un fármaco) dentro del cuerpo o las células del mismo mediante la acción de enzimas endógenas u otros productos químicos o afecciones.

65 "Eleva" significa aumentar en cantidad. Por ejemplo, elevar los niveles de HDL en plasma significa aumentar la cantidad de HDL en el plasma.

"Proporción de TG a HDL" significa los niveles de TG en relación con los niveles de HDL. La aparición de TG altos y/o niveles bajos de HDL se ha relacionado con la incidencia, los resultados y la mortalidad de enfermedad cardiovascular. "Mejorar la proporción de TG a HDL" significa disminuir TG y/o aumentar los niveles de HDL.

5 "Reducir" significa disminuir a medida, tamaño, cantidad o número menores. Por ejemplo, reducir los niveles en plasma de triglicéridos significa disminuir la cantidad de triglicéridos en el plasma.

10 "Región" o "región objetivo" se define como una parte del ácido nucleico objetivo que tiene por lo menos una estructura, función o característica identificable. Por ejemplo, una región objetivo puede abarcar un UTR 3', un UTR 5', un exón, un intrón, una unión exón/intrón, una región codificante, una región de inicio de la traducción, una región de terminación de la traducción, u otra región de ácido nucleico definida. Las regiones estructuralmente definidas para ApoCIII pueden obtenerse por número de acceso de bases de datos de secuencias como la NCBI. En ciertas realizaciones, una región objetivo puede abarcar la secuencia desde un sitio objetivo 5' de un segmento objetivo dentro de la región objetivo hasta un sitio objetivo 3' de otro segmento objetivo dentro de la región objetivo.

15 "Ribonucleótido" significa un nucleótido que tiene un hidroxilo en la posición 2' de la porción de azúcar del nucleótido. Los ribonucleótidos pueden modificarse con cualquiera de una variedad de sustituyentes.

20 "Segundo agente" o "segundo agente terapéutico" significa un agente que puede usarse en combinación con un "primer agente". Un segundo agente terapéutico puede incluir, pero no está limitado a, un ARNip o oligonucleótido antisentido que incluya oligonucleótidos antisentido dirigidos a ApoCIII. Un segundo agente también puede incluir anticuerpos anti-ApoCIII, inhibidores de péptidos de ApoCIII, agentes reductores de colesterol, agentes reductores de lípidos, agentes reductores de glucosa y agentes antiinflamatorios.

25 "Segmentos" se definen como sub-porciones más pequeñas de regiones dentro de un ácido nucleico. Por ejemplo, un "segmento objetivo" significa la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico objetivo a la que están dirigidos uno o más compuestos antisentido. "sitio objetivo 5'" se refiere al nucleótido más 5' de un segmento objetivo. " sitio objetivo ""se refiere al nucleótido más 3' de un segmento objetivo.

30 Las versiones "acortadas" o "truncadas" de oligonucleótidos antisentido o ácidos nucleicos objetivo enseñadas en la presente tienen uno, dos o más nucleósidos delecionados.

35 "Efectos secundarios" significa respuestas fisiológicas atribuibles a un tratamiento distintas a los efectos deseados. En ciertas realizaciones, los efectos secundarios incluyen reacciones en el sitio de inyección, anomalías en la prueba de función hepática, anomalías de la función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anomalías del sistema nervioso central, miopatías y malestar. Por ejemplo, los niveles de aminotransferasas elevados en suero pueden indicar toxicidad hepática o anormalidad de la función hepática. Por ejemplo, la bilirrubina aumentada puede indicar toxicidad hepática o anormalidad de la función hepática.

40 "Oligonucleótido de cadena sencilla" significa un oligonucleótido que no está hibridado con una cadena complementaria.

45 "Específicamente hibridable" se refiere a un compuesto antisentido que tiene un grado suficiente de complementariedad con un ácido nucleico objetivo para inducir un efecto deseado, a la vez que muestra efectos mínimos o nulos sobre ácidos nucleicos no objetivo en condiciones en las que se desea el enlace específico, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* y tratamientos terapéuticos.

"Estatina" significa un agente que inhibe la actividad de la HMG-CoA reductasa.

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

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

55 "Síntoma de enfermedad o trastorno cardiovascular" significa un fenómeno que surge de y acompaña a la enfermedad o trastorno cardiovascular y sirve como una indicación de ello. Por ejemplo, angina de pecho; dolor de pecho; dificultad para respirar; palpitaciones; debilidad; mareo; náusea; transpiración; taquicardia; bradicardia; arritmia; fibrilación auricular; hinchazón en las extremidades inferiores; cianosis; fatiga; desmayo; entumecimiento de la cara; entumecimiento de las extremidades; claudicación o calambres de los músculos; hinchazón del abdomen; o fiebre son síntomas de enfermedad o trastorno cardiovascular.

60 "Dirigiendo" o "dirigido" significa el proceso de diseño y selección de un compuesto antisentido que hibridará específicamente con un ácido nucleico objetivo e inducirá un efecto deseado.

65 "Ácido nucleico objetivo", "ARN objetivo" y "transcrito de ARN objetivo" se refieren todos a un ácido nucleico capaz de ser objetivo de los compuestos antisentido.

5 "Cambio de estilo de vida terapéutico" significa cambios en la dieta y el estilo de vida destinados a disminuir la masa de grasa/tejido adiposo y/o el colesterol. Dicho cambio puede reducir el riesgo de desarrollar enfermedades cardíacas, y puede incluir recomendaciones para la ingesta dietética de calorías diarias totales, grasa total, grasas saturadas, grasas poliinsaturadas, grasas monoinsaturadas, carbohidratos, proteínas, colesterol, fibra insoluble, así como recomendaciones para la actividad física.

"Tratar" se refiere a administrar un compuesto de la invención para efectuar una alteración o mejora de una enfermedad, trastorno o afección.

10 "Triglicérido" o "TG" significa un lípido o grasa neutra que consiste de glicerol combinado con tres moléculas de ácido graso.

15 "Diabetes tipo 2" (también conocida como "diabetes mellitus tipo 2", "diabetes mellitus, tipo 2", "diabetes no dependiente de insulina (NIDDM)", "diabetes relacionada con la obesidad" o "diabetes de aparición en adultos") es un trastorno metabólico que se caracteriza principalmente por resistencia a la insulina, deficiencia relativa de insulina e hiperglucemia.

20 "Nucleótido no modificado" significa un nucleótido compuesto por nucleobases de origen natural, fracciones de azúcar y ligamientos inter-nucleósidos. En ciertas realizaciones, un nucleótido no modificado es un nucleótido de ARN (es decir, β -D-ribonucleósidos) o un nucleótido de ADN (es decir, β -D-desoxirribonucleósido).

25 "Segmento de ala" significa uno o una pluralidad de nucleósidos modificados para impartir a un oligonucleótido propiedades como actividad inhibidora aumentada, afinidad de enlace incrementada por un ácido nucleico objetivo, o resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*.

Cierta Realización de la Divulgación

30 En la presente se divulga un método para reducir los niveles de ApoCIII en un animal administrando un compuesto al animal dirigido a ApoCIII, disminuyendo de este modo los niveles de ApoCIII. En ciertas realizaciones, los niveles de ApoCIII se reducen en el hígado o el intestino delgado.

35 En la presente se divulga un método para aumentar los niveles de HDL y/o mejorar la proporción de TG a HDL en un animal administrando un compuesto al animal en donde el compuesto se dirige a ApoCIII y aumenta los niveles de HDL y/o mejora la proporción de TG a HDL.

40 En la presente se divulga un método para prevenir, retrasar o mejorar una enfermedad, trastorno, afección, o síntoma de los mismos, cardiovascular en un animal que comprende administrar un compuesto dirigido a ApoCIII al animal, en donde el compuesto administrado al animal previene, trata o mejora la enfermedad, trastorno, afección o síntoma cardiovascular en el animal aumentando los niveles de HDL en el animal y/o mejorando la proporción de TG a HDL.

45 En la presente se divulga un método para prevenir, retrasar o mejorar una pancreatitis en un animal que comprende administrar un compuesto dirigido a ApoCIII al animal, donde el compuesto administrado al animal previene, trata o mejora la pancreatitis en el animal aumentando los niveles de HDL en el animal y/o mejorando la proporción de TG a HDL. En ciertas realizaciones, la pancreatitis es pancreatitis aguda.

50 En la presente se divulga un método para prevenir, tratar, mejorar, retrasar la aparición o reducir el riesgo de una enfermedad, trastorno o afección cardiovascular en un animal, que comprende administrar al animal un compuesto que se dirige a ApoCIII, en el que el compuesto evita, trata, mejora, retrasa la aparición o reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular, trastorno o afección en el animal aumentando los niveles de HDL en el animal y/o mejorando la proporción de TG a HDL.

55 En la presente se divulga un método para disminuir los niveles de CETP administrando un compuesto dirigido a ApoCIII a un animal.

En la presente se divulga un método para aumentar ApoA1, PON1, depuración de grasa, depuración de triglicéridos de quilomicrones y/o HDL administrando un compuesto dirigido a ApoCIII a un animal. En la presente se divulga un método para mejorar la proporción de TG a HDL.

60 En ciertas realizaciones, el ácido nucleico de ApoCIII es cualquiera de las secuencias expuestas en el N° de Acceso de GENBANK NM_000040.1 (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 1), y el N° de Acceso GENBANK NT_033899.8 truncado de los nucleótidos 20262640 a 20266603 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 2).

65 En ciertas realizaciones, el compuesto dirigido a ApoCIII es un oligonucleótido modificado. En realizaciones

adicionales, el oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8 nucleobases contiguas de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3). En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado es por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 98% o por lo menos un 100% complementario a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 .

5 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste en un oligonucleótido modificado de cadena sencilla.

10 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste en 12-30 nucleósidos ligados.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste en 20 nucleósidos ligados.

15 En ciertas realizaciones, el compuesto comprende por lo menos un ligamiento inter-nucleósidos modificado. En ciertas realizaciones, el ligamiento inter-nucleósidos es un ligamiento inter-nucleósidos fosforotioato.

En ciertas realizaciones, el compuesto comprende por lo menos un nucleósido que comprende un azúcar modificado. En ciertas realizaciones, el por lo menos un azúcar modificado es un azúcar bicíclico. En ciertas realizaciones, el por lo menos un azúcar modificado comprende un 2'-O-metoxietilo.

20 En ciertas realizaciones, el compuesto comprende por lo menos un nucleósido que comprende una nucleobase modificada. En ciertas realizaciones, la nucleobase modificada es una 5-metilcitosina.

25 En ciertas realizaciones, el compuesto que comprende oligonucleótido modificado comprende: (i) un segmento gap que consiste de desoxinucleósidos ligados; (ii) un segmento de ala 5' que consiste en nucleósidos ligados; (iii) un segmento de ala 3' que consiste en nucleósidos ligados, en el que el segmento gap está situado inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3' y en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado.

30 En ciertas realizaciones, el compuesto que comprende oligonucleótido modificado comprende: (i) un segmento gap que consiste de 8-12 desoxinucleósidos unidos; (ii) un segmento de ala 5' que consiste en 1-5 nucleósidos ligados; (iii) un segmento de ala 3' que consiste en 1-5 nucleósidos ligados, en donde el segmento gap está situado inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un 2'-O-metoxietilo, en donde cada citosina es una 5'-metilcitosina, y en donde cada ligamiento inter-nucleósidos es un ligamiento fosforotioato.

35 En ciertas realizaciones, el compuesto que comprende oligonucleótido modificado comprende: (i) un segmento de intersticio que consiste en desoxinucleósidos a menudo ligados; (ii) un segmento de ala 5' que consiste de cinco nucleósidos ligados; (iii) un segmento de ala 3' que consiste en cinco nucleósidos ligados, en donde el segmento gap está situado inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, en donde cada citosina es una 5'-metilcitosina, y en donde cada ligamiento inter-nucleósidos es un ligamiento fosforotioato.

40 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobases de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3).

45 En la presente se divulga un método para reducir el riesgo de una enfermedad cardiovascular en un animal administrando al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados, en donde el oligonucleótido modificado es complementario a un ácido nucleico de ApoCIII y en donde el oligonucleótido modificado aumenta los niveles de HDL y/o mejora la proporción de TG a HDL. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico de ApoCIII es la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado es por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 98% o por lo menos un 100% complementario a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En realizaciones adicionales el nucleótido modificado comprende por lo menos 8 nucleobases contiguas de la secuencia de nucleobases de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3).

55 En la presente se divulga un método para prevenir, tratar, mejorar o reducir por lo menos un síntoma de una enfermedad cardiovascular en un animal, que comprende administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12 a 30 nucleósidos ligados y es complementario a un ácido nucleico de ApoCIII. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico de ApoCIII es la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado es por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 98% o por lo menos el 100% complementario a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En realizaciones adicionales, el compuesto administrado al animal previene, trata, mejora o reduce por lo menos un síntoma de la enfermedad cardiovascular aumentando los niveles de HDL y/o mejorando la proporción de TG a HDL. En realizaciones adicionales, el oligonucleótido modificado comprende por lo menos 8 nucleobases contiguas de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3).

En realizaciones adicionales, los síntomas de una enfermedad cardiovascular incluyen, pero no están limitados a, angina de pecho; dolor de pecho; dificultad para respirar; palpitaciones; debilidad; mareo; náusea; transpiración; taquicardia; bradicardia; arritmia; fibrilación auricular; hinchazón en las extremidades inferiores; cianosis; fatiga; desmayo; entumecimiento de la cara; entumecimiento de las extremidades; claudicación o calambres de los músculos; hinchazón del abdomen; o fiebre

En la presente se divulga un método para aumentar los niveles de HDL y/o mejorar la proporción de TG a HDL en un animal administrando al animal un compuesto que consiste en la secuencia de la nucleobase de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3). También se divulga en la presente un método para prevenir, tratar, mejorar o reducir por lo menos un síntoma de una enfermedad cardiovascular en un animal administrando al animal un compuesto que consiste de la secuencia de nucleobases de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3), aumentando de este modo los niveles de HDL y/o mejorando la proporción de TG a HDL en el animal.

En la presente se divulga un método para aumentar los niveles de HDL y/o mejorar la proporción de TG a HDL en un animal administrando al animal un oligonucleótido modificado que tiene la secuencia de ISIS 304801, en donde el oligonucleótido modificado comprende: (i) un segmento gap que consiste de diez desoxinucleósidos ligados; (ii) un segmento de ala 5' que consiste en cinco nucleósidos ligados; (iii) un segmento de ala 3' que consiste de cinco nucleósidos ligados, en donde el segmento gap está situado inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietil, en donde cada citosina es una 5'-metilcitosina, y en donde cada ligamiento inter-nucleósidos es un ligamiento fosforotioato.

En la presente se divulga un método para prevenir, tratar, mejorar o reducir por lo menos un síntoma de una enfermedad cardiovascular en un animal administrando al animal un oligonucleótido modificado que tiene la secuencia de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3), en donde el oligonucleótido modificado del compuesto comprende: (i) un segmento gap que consiste de diez desoxinucleósidos ligados; (ii) un segmento de ala 5' que consiste de cinco nucleósidos ligados; (iii) un segmento de ala 3' que consiste de cinco nucleósidos ligados, en donde el segmento gap está situado inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietil, en donde cada citosina es una 5'-metilcitosina, y en donde cada ligamiento inter-nucleósidos es un ligamiento fosforotioato.

En la presente se divulga un método para elevar los niveles de HDL y/o mejorar la proporción de TG a HDL en un animal administrando al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados, en donde el oligonucleótido modificado es complementario a un ácido nucleico de ApoCIII. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico de ApoCIII es la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado es por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 98% o por lo menos un 100% complementario a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

En la presente se divulga un método para prevenir, tratar, mejorar o reducir por lo menos un síntoma de una enfermedad cardiovascular en un animal mediante la administración al animal de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados, en donde el oligonucleótido modificado es complementario a un ácido nucleico de ApoCIII, y eleva los niveles de HDL en el animal. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico de ApoCIII es la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado es por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 98% o por lo menos un 100% complementario a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

En la presente se divulga un método para disminuir los niveles de CETP administrando un compuesto dirigido a ApoCIII a un animal. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados, en donde el oligonucleótido modificado es complementario a un ácido nucleico de ApoCIII. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico de ApoCIII es o la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado es por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 98% o por lo menos un 100% complementario a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados y tiene una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8 nucleobases contiguas de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3). En ciertas realizaciones, el compuesto consiste de las nucleobases de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3).

En la presente se divulga un método para aumentar ApoA1, PON1, depuración de grasa, depuración de triglicéridos de quilomicrones y/o HDL administrando un compuesto dirigido a ApoCIII a un animal. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados, en donde el oligonucleótido modificado es complementario a un ácido nucleico de ApoCIII. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico de ApoCIII es o la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado es por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 98% o por lo menos un 100% complementario a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En ciertas

realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados y tiene una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8 nucleobases contiguas de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3). En ciertas realizaciones, el compuesto consiste de las nucleobases de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3).

5 En ciertas realizaciones, el animal es humano.

10 En ciertas realizaciones, la enfermedad cardiovascular es aneurisma, angina de pecho, arritmia, aterosclerosis, enfermedad cerebrovascular, enfermedad cardíaca coronaria, hipertensión, dislipidemia, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia o hipercolesterolemia. En ciertas realizaciones, la dislipidemia es quilomicronemia.

15 En ciertas realizaciones, el animal está en riesgo de pancreatitis. En ciertas realizaciones, reducir los niveles de ApoCIII en el hígado y/o el intestino delgado previene la pancreatitis. En ciertas realizaciones, elevar los niveles de HDL y/o mejorar la proporción de TG a HDL previene la pancreatitis.

20 En ciertas realizaciones, reducir los niveles de ApoCIII en el hígado y/o el intestino delgado mejora la depuración de triglicérido posprandial. En ciertas realizaciones, elevar los niveles de HDL y/o mejorar la proporción de TG a HDL mejora la depuración de triglicérido posprandial. En ciertas realizaciones, reducir los niveles de ApoCIII en el hígado y/o el intestino delgado reduce el triglicérido posprandial. En ciertas realizaciones, elevar los niveles de HDL y/o mejorar la proporción de TG a HDL disminuye el triglicérido posprandial.

En ciertas realizaciones, reducir los niveles de ApoCIII en el hígado y/o el intestino delgado mejora la proporción de HDL a TG.

25 En ciertas realizaciones, el compuesto se administra parenteralmente. En realizaciones adicionales, la administración parenteral es subcutánea.

30 En ciertas realizaciones, el compuesto se co-administra con un segundo agente. En ciertas realizaciones, el segundo agente es un agente hipoglucemiante. En ciertas realizaciones, el segundo agente es un LDL, TG o agente reductor del colesterol.

En ciertas realizaciones, el compuesto y el segundo agente se administran concomitante o secuencialmente.

35 En ciertas realizaciones, el compuesto es una forma de sal. En realizaciones adicionales, el compuesto comprende además un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

40 En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII en la preparación de un medicamento para disminuir los niveles de ApoCIII en un animal. En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII para disminuir los niveles de ApoCIII en un animal. En ciertas realizaciones, los niveles de ApoCIII se disminuyen en el hígado o el intestino delgado. En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII en la preparación de un medicamento para prevenir, tratar, mejorar o reducir por lo menos un síntoma de una enfermedad cardiovascular aumentando los niveles de HDL y/o mejorando la proporción de TG a HDL. En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII para prevenir, tratar, mejorar o reducir por lo menos un síntoma de una enfermedad cardiovascular aumentando los niveles de HDL y/o mejorando la proporción de TG a HDL. En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII para aumentar los niveles de HDL y/o mejorar la proporción de TG a HDL en un animal. En la presente se divulga un uso de un compuesto dirigido a ApoCIII para la preparación de un medicamento para aumentar los niveles de HDL y/o mejorar la proporción de TG a HDL en un animal. En ciertas realizaciones, el compuesto es por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 98% o por lo menos un 100% complementario a una secuencia de ácido nucleico de ApoCIII. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico de ApoCIII es la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, el compuesto es un oligonucleótido modificado. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8 nucleobases de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3). En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado tiene la secuencia de nucleobases de ISIS 304801 (SEQ ID NO: 3). En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII en la preparación de un medicamento para tratar un animal con pancreatitis o con riesgo de pancreatitis. En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII para tratar a un animal con pancreatitis o con riesgo de pancreatitis. En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII en la preparación de un medicamento para reducir los niveles de ApoCIII en el hígado y/o el intestino delgado. En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII para reducir los niveles de ApoCIII en el hígado y/o el intestino delgado. En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII en la preparación de un medicamento para prevenir la pancreatitis. En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII para prevenir la pancreatitis.

65 En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII en la preparación de un medicamento para reducir los niveles de ApoCIII en el hígado y/o el intestino delgado en un animal con hipertrigliceridemia. En la

presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII para reducir los niveles de ApoCIII en el hígado y/o el intestino delgado en un animal con hipertrigliceridemia. En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII en la preparación de un medicamento para potenciar la depuración de triglicéridos posprandiales. En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII para potenciar la depuración de triglicéridos posprandiales. En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII en la preparación de un medicamento para reducir el triglicérido posprandial. En la presente se divulga el uso de un compuesto dirigido a ApoCIII para disminuir el triglicérido posprandial.

Compuestos antisentido

Los compuestos oligoméricos incluyen, pero no están limitados a, oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos, compuestos antisentido, oligonucleótidos antisentido y ARNip. Un compuesto oligomérico puede ser "antisentido" para un ácido nucleico objetivo, significando que es capaz de experimentar hibridación con un ácido nucleico objetivo a través de enlaces de hidrógeno.

En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobases que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso del segmento objetivo de un ácido nucleico objetivo al que se dirige. En ciertas de tales realizaciones, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso del segmento objetivo de un ácido nucleico objetivo al que se dirige.

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

En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado acortado o truncado. El oligonucleótido modificado acortado o truncado puede tener uno o más nucleósidos delecionados del extremo 5' (truncamiento 5'), uno o más nucleósidos delecionados del extremo 3' (truncamiento 3') o uno o más nucleósidos delecionados de la porción central. Alternativamente, los nucleósidos delecionados pueden estar dispersos a través del oligonucleótido modificado, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene un nucleósido delecionado del extremo 5' y un nucleósido delecionado del extremo 3'.

Cuando sólo hay un único nucleósido adicional en un oligonucleótido alargado, el nucleósido adicional puede estar localizado en la porción central, 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 que tiene dos nucleósidos añadidos a la porción central, al extremo 5' (adición 5') o alternativamente al extremo 3' (adición 3'), del oligonucleótido. Alternativamente, los nucleósidos añadidos pueden estar dispersos en todo el compuesto antisentido, por ejemplo, en un oligonucleótido que tiene un nucleósido añadido al extremo 5' y una subunidad añadida al extremo 3'.

Es posible aumentar o disminuir la longitud de un compuesto antisentido, como un oligonucleótido antisentido, y/o introducir bases desemparejadas sin eliminar la actividad. Por ejemplo, en Woolf et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7305-7309, 1992)), se ensayó una serie de oligonucleótidos antisentido de 13-25 nucleobases de longitud para determinar su capacidad para inducir la escisión de un ARN objetivo en un modelo de inyección de oocitos. Los oligonucleótidos antisentido de 25 nucleobases de longitud con 8 ó 11 bases desemparejadas cerca de los extremos de los oligonucleótidos antisentido fueron capaces de dirigir la escisión específica del ARNm objetivo, aunque en menor medida que los oligonucleótidos antisentido que no contenían desemparejamientos. De manera similar, la escisión específica del objetivo se logró usando oligonucleótidos antisentido de 13 nucleobases, incluyendo las de 1 ó 3 desemparejamientos.

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

Maher y Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16: 3341-3358, 1988) probaron una serie de oligonucleótidos antisentido de 14nucleobases en tándem, y oligonucleótidos antisentido de 28 y 42nucleobases compuestos por la secuencia de dos o tres de los oligonucleótidos antisentido en tándem, respectivamente, por su capacidad para detener la traducción de DHFR humana en un ensayo de reticulocitos de conejo. Cada uno de los tres oligonucleótidos

antisentido de 14 nucleobases solo fue capaz de inhibir la traducción, aunque a un nivel más modesto que los oligonucleótidos antisentido de 28 o 42 nucleobases.

"Motivos compuestos antisentido"

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de ApoCIII tienen subunidades químicamente modificadas dispuestas en patrones, o motivos, para conferir a los compuestos antisentido propiedades como actividad inhibitora aumentada, afinidad de enlace incrementada por un ácido nucleico objetivo, o resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*.

Los compuestos antisentido quiméricos típicamente contienen por lo menos una región modificada para conferir resistencia incrementada a la degradación de nucleasas, aumento de la captación celular, afinidad de enlace incrementada por el ácido nucleico objetivo y/o actividad inhibitora incrementada. Una segunda región de un compuesto antisentido quimérico puede servir opcionalmente como un sustrato para la endonucleasa RNasa H celular, que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN.

Los compuestos antisentido que tienen un motivo gapmer se consideran compuestos antisentido quiméricos. En un gapmer, una región interna que tiene una pluralidad de nucleótidos que soporta la escisión de RNasa H está situada entre regiones externas que tienen una pluralidad de nucleótidos que son químicamente distintos de los nucleósidos de la región interna. En el caso de un oligonucleótido antisentido que tiene un motivo gapmer, el segmento gap generalmente sirve como sustrato para la escisión de endonucleasas, mientras que los segmentos ala comprenden nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, las regiones de un gapmer se diferencian por los tipos de fracciones de azúcar que comprenden cada región distinta. Los tipos de fracciones de azúcar que se usan para diferenciar las regiones de un gapmer pueden en algunas realizaciones incluir β -D-ribonucleósidos, β -D-desoxirribonucleósidos, nucleósidos 2'-modificados (tales nucleósidos 2'-modificados pueden incluir 2'-MOE, y 2'-O-CH₃, entre otros), y nucleósidos modificados con azúcar bicíclico (tales nucleósidos modificados con azúcar bicíclico pueden incluir los que tienen un puente 4'-(CH₂)_n-O-2', donde n = 1 o n = 2). Preferiblemente, cada región distinta comprende fracciones de azúcar uniformes. El motivo del ala-gap-ala se describe frecuentemente como "X-Y-Z", donde "X" representa la longitud de la región del ala 5', "Y" representa la longitud de la región del gap, y "Z" representa la longitud de la región del ala 3'. Como se usa en la presente, un gapmer descrito como "X-Y-Z" tiene una configuración tal que el segmento gap se sitúa inmediatamente adyacente a cada uno del segmento de ala 5' y el segmento de ala 3'. Por tanto, no existen nucleótidos intermedios entre el segmento de ala 5' y el segmento gap, o el segmento gap y el segmento de ala 3'. Cualquiera de los compuestos antisentido descritos en la presente puede tener un motivo gapmer. En algunas realizaciones, X y Z son iguales; en otras realizaciones, son diferentes. En una realización preferida, Y está entre 8 y 15 nucleótidos. X, Y o Z pueden ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más nucleótidos. Por tanto, los gapmers incluyen, pero no están limitados 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, 5-8-5, 1-8-1, 2-6-2, 2-13-2, 1-8-2, 2-8-3, 3-10-2, 1-18-2 ó 2-18-2.

En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido como un motivo de "alamer", que tiene una configuración de ala-gap o gap-ala, es decir, una configuración X-Y o Y-Z como se ha descrito anteriormente para la configuración gapmer. Por tanto, las configuraciones de alamer incluyen, pero no están limitadas 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 ó 5-13.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de ApoCIII poseen un motivo gapmer 5-10-5.

En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de ApoCIII tiene un motivo gap ampliado.

Ácidos Nucleicos Objetivo, Regiones Objetivo y Secuencias de Nucleótidos

Las secuencias de nucleótidos que codifican ApoCIII incluyen, sin limitación, las siguientes: N° de Acceso GENBANK NM_000040.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 1), y N° de Acceso GENBANK NT_033899.8 truncado de los nucleótidos 20262640 a 20266603 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 2).

Se entiende que la secuencia expuesta en cada SEQ ID NO en los Ejemplos contenidos en la presente es independiente de cualquier modificación en una fracción de azúcar, un ligamiento inter-nucleósidos o una nucleobase. Como tales, los compuestos antisentido definidos por una SEQ ID NO pueden comprender, independientemente, una o más modificaciones a una fracción de azúcar, un ligamiento inter-nucleósidos o una nucleobase. Los compuestos antisentido descritos por Isis Number (Isis N°) indican una combinación de secuencia de nucleobases y motivo.

En ciertas realizaciones, una región objetivo es una región estructuralmente definida del ácido nucleico

objetivo. Por ejemplo, una región objetivo puede abarcar un UTR 3', un UTR 5', un exón, un intrón, una unión exón/intrón, una región codificante, una región de inicio de la traducción, una región de terminación de la traducción u otra región de ácido nucleico definida. Las regiones estructuralmente definidas para ApoCIII pueden obtenerse por número de acceso de bases de datos de secuencias como En ciertas realizaciones, una región objetivo puede abarcar la secuencia desde un sitio objetivo 5' de un segmento objetivo dentro de la región objetivo hasta un sitio objetivo 3' de otro segmento objetivo dentro de la región objetivo.

En ciertas realizaciones, un "segmento objetivo" es una sub-porción más pequeña de una región objetivo dentro de un ácido nucleico. Por ejemplo, un segmento objetivo puede ser la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico objetivo al que se dirigen uno o más compuestos antisentido. "Sitio objetivo 5'" se refiere al nucleótido más 5' de un segmento objetivo. "Sitio objetivo3'" se refiere al nucleótido más 3' de un segmento objetivo.

Una región objetivo puede contener uno o más segmentos objetivo. Se pueden superponer múltiples segmentos objetivo dentro de una región objetivo. Alternativamente, pueden no superponerse. En ciertas realizaciones, los segmentos objetivo dentro de una región objetivo están separados por no más de aproximadamente 300 nucleótidos. En ciertas realizaciones, los segmentos objetivo dentro de una región objetivo están separados por un número de nucleótidos que es, es aproximadamente, no es más que, no es más que aproximadamente, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 ó 10 nucleótidos en el ácido nucleico objetivo, o es un intervalo definido por dos cualquiera de los valores anteriores. En ciertas realizaciones, los segmentos objetivo dentro de una región objetivo están separados por no más de, o no más de aproximadamente, 5 nucleótidos en el ácido nucleico objetivo. En ciertas realizaciones, los segmentos objetivo son contiguos. Se contemplan regiones objetivo definidas por un intervalo que tiene un ácido nucleico de partida que es cualquiera de los sitios objetivo 5' o sitios objetivo 3' enumerados en la presente.

El direccionamiento incluye la determinación de por lo menos un segmento objetivo al que hibrida un compuesto antisentido, de manera que tiene lugar un efecto deseado. En ciertas realizaciones, el efecto deseado es una reducción en los niveles de ácido nucleico objetivo de ARNm. En ciertas realizaciones, el efecto deseado es la reducción de los niveles de proteína codificada por el ácido nucleico objetivo o un cambio fenotípico asociado con el ácido nucleico objetivo.

Se pueden encontrar segmentos objetivo adecuados dentro de un UTR 5', una región codificante, un UTR 3', un intrón, un exón o una unión exón/intrón. Los segmentos objetivo que contienen un codón de inicio o un codón de terminación también son segmentos objetivo adecuados. Un segmento objetivo adecuado puede excluir específicamente una cierta región estructuralmente definida tal como el codón de inicio o el codón de terminación.

La determinación de segmentos objetivo adecuados puede incluir una comparación de la secuencia de un ácido nucleico objetivo con otras secuencias en todo el genoma. Por ejemplo, el algoritmo BLAST puede usarse para identificar regiones de similitud entre diferentes ácidos nucleicos. Esta comparación puede evitar la selección de secuencias de compuestos antisentido que puedan hibridar de una manera no específica con secuencias distintas de las de un ácido nucleico objetivo seleccionado (es decir, secuencias no objetivo o fuera del objetivo).

Puede haber variación en la actividad (por ejemplo, como se define mediante por reducción porcentual de los niveles de ácido nucleico objetivo) de los compuestos antisentido dentro de una región objetivo activa. En ciertas realizaciones, las reducciones en los niveles de ARNm de ApoCIII son indicativos de la inhibición de la expresión de la ApoCIII. Las reducciones en los niveles de una proteína ApoCIII pueden ser indicativas de la inhibición de la expresión del ARNm objetivo. Además, los cambios fenotípicos pueden ser indicativos de inhibición de la expresión de ApoCIII. Por ejemplo, un aumento en los niveles de HDL, disminución en los niveles de LDL, o disminución en los niveles de triglicéridos, se encuentran entre los cambios fenotípicos que pueden ensayarse para la inhibición de la expresión de ApoCIII. También pueden evaluarse, otras indicaciones fenotípicas, por ejemplo, síntomas asociados con una enfermedad cardiovascular; por ejemplo, angina de pecho; dolor de pecho; dificultad para respirar; palpitaciones; debilidad; mareo; náusea; transpiración; taquicardia; bradicardia; arritmia; fibrilación auricular; hinchazón en las extremidades inferiores; cianosis; fatiga; desmayo; entumecimiento de la cara; entumecimiento de las extremidades; claudicación o calambres de los músculos; hinchazón del abdomen; o fiebre

Hibridación

En algunas realizaciones, la hibridación tiene lugar entre un compuesto antisentido divulgado en la presente y un ácido nucleico ApoCIII. El mecanismo más común de hibridación implica enlaces de hidrógeno (por ejemplo, Watson-Crick, Hoogsteen o enlaces de hidrógeno invertidos de Hoogsteen) entre nucleobases complementarias de las moléculas de ácido nucleico.

La hibridación puede tener lugar bajo diferentes condiciones. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y están determinadas por la naturaleza y la composición de las moléculas de ácido nucleico a hibridar.

Los métodos para determinar si una secuencia es específicamente hibridable con un ácido nucleico objetivo son bien conocidos en la técnica (Sambrooke y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, 2001). En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido divulgados en la presente son específicamente hibridables con un ácido nucleico de ApoCIII.

5

Complementariedad

Un compuesto antisentido y un ácido nucleico objetivo son complementarios entre sí cuando un número suficiente de nucleobases del compuesto antisentido puede enlazarse por hidrógenos con las nucleobases correspondientes del ácido nucleico objetivo, de manera que se producirá un efecto deseado (por ejemplo, inhibición antisentido de un ácido nucleico objetivo, como un ácido nucleico de ApoCIII).

10

Un compuesto antisentido puede hibridar sobre uno o más segmentos de un ácido nucleico de ApoCIII de tal manera que los segmentos intermedios o adyacentes no están implicados en el evento de hibridación (por ejemplo, una estructura de giro, desemparejamiento o estructura en horquilla).

15

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido divulgados en la presente, o una porción específica de los mismos, son, o son por lo menos, un 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% complementarios a un ácido nucleico de ApoCIII, una región objetivo, un segmento objetivo o una porción específica de los mismos. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con un ácido nucleico objetivo puede determinarse usando métodos rutinarios.

20

Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de 20 nucleobases del compuesto antisentido son complementarias a una región objetivo, y por lo tanto hibridarían específicamente, representarían un 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, las nucleobases no complementarias restantes pueden estar agrupadas o intercaladas con nucleobases complementarias y no necesitan ser contiguas entre sí o a nucleobases complementarias. Como tal, un compuesto antisentido que tiene una longitud de 18 nucleobases que tiene 4 (cuatro) nucleobases no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico objetivo tendría un 77,8% de complementariedad global con el ácido nucleico objetivo y por tanto caería dentro del alcance de la presente invención. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico objetivo puede determinarse rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineación local básica) 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, identidad de secuencia o complementariedad, puede determinarse mediante, por ejemplo, el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI), utilizando la configuración predeterminada, que utiliza la algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482 - 489).

25

30

35

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

40

45

50

55

La localización de una nucleobase(s) no complementaria puede estar en el extremo 5' o en el extremo 3' del compuesto antisentido. Alternativamente, la nucleobase(s) no complementaria puede estar en una posición interna del compuesto antisentido. Cuando hay dos o más nucleobases no complementarias, pueden ser contiguas (es decir, ligadas) o no contiguas. En una realización, una nucleobase no complementaria está localizada en el segmento de ala de un oligonucleótido antisentido gapped.

60

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido que son, o son de hasta 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 nucleobases de longitud comprenden no más de 4, no más de 3, no más de 2, o no más de 1 nucleobase(s) no

65

complementaria en relación a un ácido nucleico objetivo, como un ácido nucleico de ApoCIII, o una porción especificada del mismo.

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

10 Los compuestos antisentido divulgados en la presente también incluyen los que son complementarios a una porción de un ácido nucleico objetivo. Como se usa en la presente, "porción" se refiere a un número definido de nucleobases contiguas (es decir, ligadas) dentro de una región o segmento de un ácido nucleico objetivo. Una "porción" también se puede referir a un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios a por lo menos una porción de 8 nucleobases de un segmento objetivo. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios a por lo menos 15 una porción de 10 nucleobases de un segmento objetivo. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios a por lo menos una porción de 12 nucleobases de un segmento objetivo. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios a por lo menos una porción de 15 nucleobases de un segmento objetivo. También se contemplan compuestos antisentido que son complementarios a por lo menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más porciones de nucleobases de un segmento objetivo, o un intervalo definido por cualquiera de estos dos valores.

Identificar

25 Los compuestos antisentido divulgados en la presente memoria también pueden tener un porcentaje de identidad definido para una secuencia de nucleótidos particular, SEQ ID NO, o secuencia de un compuesto representado por un número Isis específico, o una porción del mismo. Como se usa en la presente, un compuesto antisentido es idéntico a la secuencia divulgada en la presente si tiene la misma capacidad de emparejamiento de nucleobases. 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 tanto el uracilo como la timidina se emparejan con la adenina. Se contemplan versiones acortadas y alargadas de los compuestos antisentido divulgados en la presente memoria como los compuestos que tienen bases no idénticas en relación con los compuestos antisentido divulgados en la presente. Las bases no idénticas pueden ser adyacentes entre sí o dispersarse por todo el compuesto antisentido. El porcentaje de identidad de un compuesto antisentido se calcula de acuerdo con el número de bases que tienen emparejamiento de bases idéntico en relación a la secuencia con la que se está comparando.

35 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido, o porciones de los mismos, son por lo menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticos a uno o más de los compuestos antisentido o SEQ ID NOs, o una porción de los mismos, divulgados en la presente.

Modificaciones

45 Un nucleósido es una combinación base-azúcar. La porción de nucleobase (también conocida como base) del nucleósido es normalmente una fracción de base heterocíclica. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato covalentemente ligado a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar de pentofuranosilo, el grupo fosfato se puede ligar a la fracción hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. Los oligonucleótidos se forman a través del ligamiento covalente de nucleósidos adyacentes entre sí, para formar un oligonucleótido polimérico lineal. Dentro de la estructura del oligonucleótido, se hace referencia comúnmente a los grupos fosfato como que forman ligamientos inter-nucleósidos del oligonucleótido.

50 Las modificaciones de los compuestos antisentido abarcan sustituciones o cambios en los ligamientos inter-nucleósidos, fracciones de azúcar o nucleobases. Los compuestos antisentido modificados se prefieren a menudo sobre las formas nativas debido a propiedades deseables como, por ejemplo, captación celular aumentada, afinidad aumentada para el objetivo de ácido nucleico, estabilidad incrementada en presencia de nucleasas o actividad inhibidora incrementada.

55 Los nucleósidos químicamente modificados también pueden emplearse para aumentar la afinidad de enlace de un oligonucleótido antisentido acortado o truncado por su ácido nucleico objetivo. En consecuencia, pueden obtenerse a menudo resultados comparables con compuestos antisentido más cortos que tienen tales nucleósidos químicamente modificados.

Ligamientos inter-nucleósidos modificados

60 El ligamiento inter-nucleósidos de origen natural de ARN y ADN es un ligamiento fosfodiéster 3' a 5'. Los compuestos antisentido que tienen uno o más ligamientos inter-nucleósidos modificados, es decir, no de origen natural se seleccionan a menudo sobre compuestos antisentido que tienen ligamientos inter-nucleósidos de origen

65

natural debido a las propiedades deseables como, por ejemplo, captación celular aumentada, afinidad aumentada por ácidos nucleicos objetivo y estabilidad incrementada en presencia de nucleasas.

5 Los oligonucleótidos que tienen ligamientos inter-nucleósidos modificados incluyen ligamientos inter-nucleósidos que retienen un átomo de fósforo así como ligamientos inter-nucleósidos que no tienen un átomo de fósforo. Los ligamientos inter-nucleósidos que contienen fósforo representativos incluyen, pero no están limitados a, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidoato y fosforotioato. Los métodos de preparación de ligamientos que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos.

10 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de ApoCIII comprenden uno o más ligamientos inter-nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, los ligamientos inter-nucleósidos modificados son ligamientos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada ligamientos inter-nucleósidos de un compuesto antisentido es un ligamiento inter-nucleósidos de fosforotioato.

15 *Fracciones de Azúcar Modificado*

Los compuestos antisentido divulgados en la presente pueden contener opcionalmente uno o más nucleósidos en donde el grupo azúcar ha sido modificado. Tales nucleósidos modificados con azúcar pueden impartir estabilidad de nucleasas aumentada, afinidad de enlace incrementada, o alguna otra propiedad biológica beneficiosa para los compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, los nucleósidos comprenden fracciones del anillo de ribofuranosa químicamente modificadas. Los ejemplos de anillos de ribofuranosa químicamente modificados incluyen sin limitación, la adición de grupos sustituyentes (incluyendo grupos sustituyentes 5' y 2', puente de átomos del anillo no geminal para formar ácidos nucleicos bicíclicos (ABNA, reemplazo del átomo de oxígeno del anillo de 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 el nucleósido sustituido con 2'-F-5'-metilo (ver Solicitud internacional PCT WO 2008/101157 Publicado el 21/08/08 para otros nucleósidos 5', 2'-bis sustituidos divulgados) o reemplazo del átomo de oxígeno del anillo de ribosilo con S con sustitución adicional en la posición 2' (ver Solicitud de Patente U.S. publicada US2005-0130923, publicada el 16 de junio de 2005) o alternativamente 5'-sustitución de un ABN (ver Solicitud internacional de PCT WO 2007/134181 Publicada el 22/11/07 en donde LNA está sustituido con, por ejemplo, un grupo 5'-metilo o un grupo 5'-vinilo).

Los ejemplos de nucleósidos que tienen fracciones de azúcar modificado 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 seleccionarse de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, alquilo OC₁-C₁₀, OCF₃, OCH₂F, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂ON(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), donde cada R₁, R_m y R_n es, independientemente, H o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido.

40 Como se usa en la presente, "nucleósidos bicíclicos" se refiere a nucleósidos modificados que comprenden una fracción de azúcar bicíclico. Los ejemplos de nucleósidos bicíclicos incluyen sin limitación nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo de ribosilo 4' y 2'. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido divulgados en la presente incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos que comprenden un puente 4' a 2'. Los ejemplos de dichos nucleósidos bicíclicos con puente de 4' a 2' incluyen, pero no están limitados 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 las mismas ver Patente U.S. 7.399.845, concedida el 15 de julio de 2008); 4'-C(CH₃)(CH₃) (y análogos de la misma ver Solicitud Internacional publicada WO/2009/006478, publicada el 8 de enero del 2009);

4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (y análogos de la misma ver Solicitud Internacional publicada WO/2008/150729, publicada el 11 de diciembre de 2008); 4'-CH₂-ON(CH₃)-2' (ver Solicitud de Patente U.S. publicada US2004-0171570, publicado el 2 de septiembre de 2004); 4'-CH₂-N(R)-O-2', en donde R es H, alquilo C₁-C₁₂, o un grupo protector (ver Patente U.S. 7.427.672, concedida el 23 de septiembre de 2008); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (ver Chattopadhyaya et al, J. Org Chem, 2009, 74, 118-134); y 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (y análogos de la misma ver Solicitud Internacional publicada WO 2008/154401, publicada el 8 de diciembre de 2008).

55 También se pueden encontrar informes adicionales relacionados con nucleósidos bicíclicos en la bibliografía publicada (ver por ejemplo: Singh et al., Chem. Common., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; 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 Invert. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; y Orum et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; Patentes U.S. N° 6.268.490; 6.525.191; 6.670.461; 6.770.748; 6.794.499; 7.034.133; 7.053.207; 7.399.845; 7.547.684; y 7.696.345; Publicación de Patente U.S. N° US2008-0039618; US2009-0012281; Patentes U.S. N° de serie 60/989,574; 61/026,995; 61/026,998; 61/056,564; 61/086,231; 61/097,787; y 61/099,844; Solicitudes Internacionales de 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 precedentes puede prepararse teniendo uno o más configuraciones de azúcar estereoquímica que incluyen por ejemplo α -L-ribofuranosa y β -D-ribofuranosa (ver solicitud internacional de PCT PCT/DK98/00393, publicada el 25 de marzo de 1999 como WO 99/14226).

5 En ciertas realizaciones, las fracciones de azúcares bicíclicos de nucleósidos de BNA incluyen, pero no están limitados a, compuestos que tienen por lo menos un puente entre la posición 4' y la posición 2' de la fracción de azúcar de pentofuranosilo en donde dichos puentes comprenden independientemente 1 o de 2 a 4 grupos ligados seleccionados independientemente de $-[C(R_a)(R_b)]_n-$, $-C(R_a)=C(R_b)-$, $-C(R_a)=N-$, $-C(=O)-$, $-C(=NR)-$, $-C(=S)-$, $-O-$, $-Si(R_a)_2-$, $-S(=O)_x-$, y $-N(R_a)-$;
 10 donde:

x es 0, 1 ó 2;

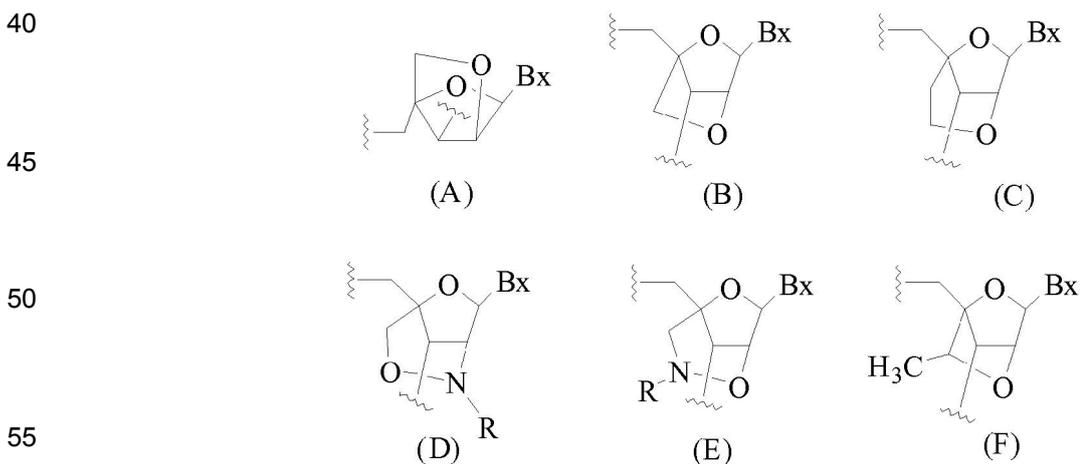
n es 1, 2, 3 ó 4;

15 cada R_a y R_b es, independientemente, H, un grupo protector, hidroxilo, alquilo C_1-C_{12} , alquilo C_{1-12} sustituido, alqueno C_2-C_{12} , alqueno C_2-C_{12} sustituido, alqueno C_2-C_{12} , alqueno C_2-C_{12} sustituido, arilo C_5-C_{20} , arilo C_5-C_{20} sustituido, radical heterociclo, radical heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical alicíclico C_5-C_7 , radical alicíclico C_5-C_7 sustituido, halógeno, OJ_1 , NJ_1J_2 , SJ_1 , N_3 , $COOJ_1$, acilo $(C(=O)-H)$, acilo sustituido, CN, sulfonilo $(S(=O)_2-J_1)$, o sulfoxilo $(S(=O)-J_1)$; y
 20 cada J_1 y J_2 es, independientemente, H, alquilo C_1-C_{12} , alquilo C_{1-12} sustituido, alqueno C_2-C_{12} , alqueno C_2-C_{12} sustituido, alqueno C_2-C_{12} , alqueno C_2-C_{12} sustituido, arilo C_5-C_{20} , arilo C_5-C_{20} sustituido, acilo $(C(=O)-H)$, acilo sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, aminoalquilo C_1-C_{12} , aminoalquilo C_1-C_{12} , o un grupo protector

25 En ciertas realizaciones, el puente de una fracción de azúcar bicíclico es $-[C(R_a)(R_b)]_n-$, $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$, $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$ o $-C(R_aR_b)-ON(R)-$. En ciertas realizaciones, el puente es $4'-CH_2-2'$, $4'-(CH_2)_2-2'$, $4'-(CH_2)_3-2'$, $4'-CH_2-O-2'$, $4'-(CH_2)_2-O-2'$, $4'-CH_2-O-N(R)-2'$ y $4'-CH_2-N(R)-O-2'$, en donde cada R es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C_1-C_{12} .

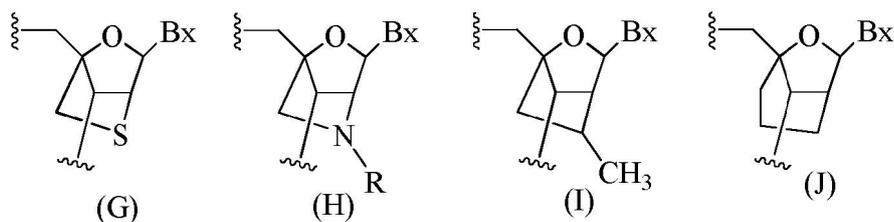
30 En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos se definen adicionalmente por configuración isomérica. Por ejemplo, un nucleósido que comprende un puente $4'-2'$ metileno-oxi, puede estar en la configuración α -L o en la configuración β -D. Previamente, se han incorporado los α -L-metileno-oxi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

35 En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos que incluyen, pero no están limitados a, (A) α -L-metileno-oxi ($4'-CH_2-O-2'$) BNA, (B) β -D-metileno-oxi ($4'-CH_2-O-2'$) BNA, (C) etileno-oxi ($4'-(CH_2)_2-O-2'$) BNA, (D) amino-oxi ($4'-CH_2-O-N(R)-2'$) BNA, (E) oxiamino ($4'-CH_2-N(R)-O-2'$) BNA, y (F) metil(metileno-oxi) ($4'-CH(CH_3)-O-2'$) BNA, (G) metileno-tio ($4'-CH_2-S-2'$) BNA, (H) metileno-amino ($4'-CH_2-N(R)-2'$) BNA, (I) carbocíclico de metilo ($4'-CH_2-CH(CH_3)-2'$) BNA, y (J) carbocíclico de propileno ($4'-(CH_2)_3-2'$) BNA como se representa a continuación.



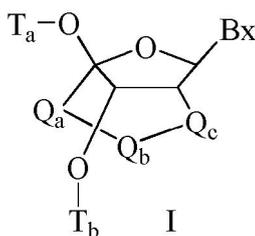
60

65



en donde Bx es la fracción de base y R es independientemente H, un grupo protector o alquilo C₁-C₁₂.

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula I:



en donde:

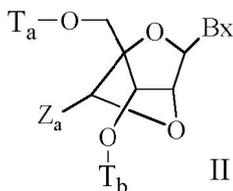
Bx es una fracción de base heterocíclica;

-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 amino; y

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

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula II:



en donde:

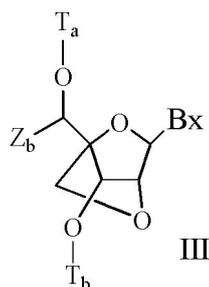
Bx es una fracción de base heterocíclica;

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

Z_a es alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, amida sustituida, tiol o tiol sustituido.

En una realización, cada uno de los grupos sustituidos está, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, oxo, hidroxilo, OJ_c, NJ_cJ_d, SJ_c, N₃, OC(=X)J_c, y NJ_eC(=X)NJ_cJ_d, en donde 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.

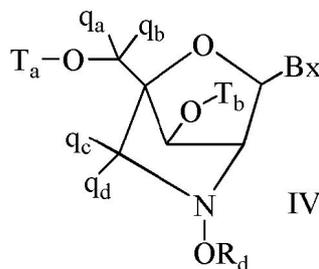
En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula III:



en donde:

15 Bx es una fracción de base heterocíclica;
 T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, una fracción de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;
 Z_b es alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆ sustituido o acilo (C(=O)-) sustituido.

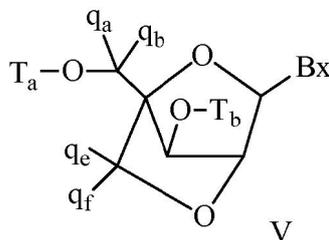
20 En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula IV:



en donde:

35 Bx es una fracción de base heterocíclica;
 T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, una fracción de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;
 R_d es alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alquenilo C₂-C₆, alquenilo C₂-C₆ sustituido, alquinilo C₂-C₆ o alquinilo C₂-C₆ sustituido;
 cada q_a, q_b, q_c y q_d es, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alquenilo C₂-C₆, alquenilo C₂-C₆ sustituido, alquinilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆ sustituido, alcoxi C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C₁-C₆ o aminoalquilo C₁-C₆ sustituido ;

45 En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula V:



en donde:

60 Bx es una fracción de base heterocíclica;
 T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, una fracción de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;
 q_a, q_b, q_c y q_f son cada uno, independientemente, hidrógeno, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alquenilo C₂-C₁₂, alquenilo C₂-C₁₂ sustituido, alquinilo C₂-C₁₂, alquinilo C₂-C₁₂ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO₂J_j, NJ_jJ_k, N₃, CN, C(=O)OJ_j, C(=O)NJ_jJ_k, C(=O)J_j, O-C(=O)NJ_jJ_k, N(H)C(=NH)NJ_jJ_k, N(H)C(=O)NJ_jJ_k o N(H)C(=S)NJ_jJ_k;

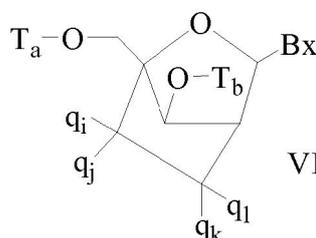
o q_e y q_f juntos son = C(q_g)(q_h);

q_g y q_h son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₁₂ sustituido.

Se han descrito la síntesis y preparación de monómeros de metilenoxi (4'-OCH₂-O-2') BNA adenina, citosina, guanina, 5-metil-citosina, timina y uracilo, junto con su oligomerización y propiedades de reconocimiento de ácidos nucleicos (Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607 - 3630). Los BNA y la preparación de los mismos también se describen en la WO 98/39352 y la WO 99/14226 .

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 polimerasas de ácidos nucleicos (Wengel et al., WO 99/14226) Además, también se ha descrito en la técnica la síntesis de 2'-amino-BNA, un nuevo análogo de oligonucleótido de alta afinidad restringido de manera conformacional (Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039). Adicionalmente, se han preparado 2'-amino- y 2'-metilamino-BNA y se ha informado previamente de la estabilidad térmica de sus dúplex con cadenas complementarias de ARN y ADN.

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos bicíclicos que tienen la Fórmula VI:



en donde:

Bx es una fracción de base heterocíclica;

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

cada q_i , q_j , q_k y q_l es, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ_i, SJ_i, SOJ_i, SO₂J_i, NJ_iJ_k, N₃, CN, C(=O)OJ_i, C(=O)NJ_iJ_k, C(=O)J_i, OC(=O)NJ_iJ_k, N(H)C(=NH)NJ_iJ_k, N(H)C(=O)NJ_iJ_k o N(H)C(=S)NJ_iJ_k; y

q_i y q_j o q_l y q_k juntos son =C(q_g)(q_h), en donde q_g y q_h son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂ o alquilo C₁-C₁₂ sustituido.

Se han descrito un nucleósido bicíclico carbocíclico que tiene un puente 4'-(CH₂)₃-2' y el puente análogo de alqueno 4'-CH=CH-CH₂-2' (Freier et al, Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4429 - 4443 y Albaek et al., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731 - 7740). También se han descrito la síntesis y preparación de nucleósidos bicíclicos carbocíclicos junto con sus estudios de oligomerización y bioquímicos (Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129 (26), 8362 - 8379).

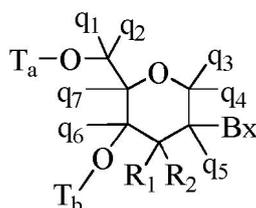
Como se usa en la presente, "nucleósido bicíclico 4'-2'" o "nucleósido bicíclico de 4' a 2'" se refiere a un nucleósido bicíclico que comprende un anillo de furanosa que comprende un puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de furanosa que conecta el átomo de carbono 2' y el átomo de carbono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

Como se usa en la presente, "nucleósidos monocíclicos" se refiere a nucleósidos que comprenden fracciones de azúcar modificadas que no son fracciones de azúcares bicíclicos. En ciertas realizaciones, la fracción de azúcar, o análogo de fracción de azúcar, de un nucleósido se puede modificar o sustituir en cualquier posición.

Como se usa en la presente, "azúcar 2'-modificado" significa un azúcar de furanosilo modificado en la posición 2'. En ciertas realizaciones, tales modificaciones incluyen sustituyentes seleccionados de: un haluro, incluyendo, pero no limitado a, alcoxi sustituido y no sustituido, tioalquilo sustituido y no sustituido, aminoalquilo sustituido y no sustituido, alquilo sustituido y no sustituido, alilo sustituido y no sustituido y alquino sustituido y no sustituido. En ciertas realizaciones, las modificaciones 2' se seleccionan de sustituyentes que incluyen, pero no están limitados a: O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nF, O(CH₂)_nONH₂, OCH₂C(=O)N(H)CH₃, y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros grupos sustituyentes 2' también pueden seleccionarse de: alquilo C₁-C₁₂, alquilo sustituido, alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, F, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo informador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas, o un grupo para mejorar las

propiedades farmacodinámicas de un compuesto antisentido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. En ciertas realizaciones, los nucleósidos modificados comprenden una cadena lateral 2'-MOE (Baker et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000). Se ha descrito que dicha sustitución 2'-MOE tiene una afinidad de enlace mejorada en comparación con nucleósidos no modificados y con otros nucleósidos modificados, como 2'-O-metilo, O-propilo y O-aminopropilo. También se ha demostrado que los oligonucleótidos que tienen el sustituyente 2'-MOE son inhibidores antisentido de la expresión génica con características prometedoras para uso *in vivo* (Martin, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504 ; Altmann et al., Chimia, 1996, 50, 168-176 ; Altmann et al., Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637 y Altmann et al., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926).

Como se usa en la presente, un "nucleósido de tetrahidropirano modificado" o "nucleósido de THP modificado" significa un nucleósido que tiene un "azúcar" de tetrahidropirano de seis miembros sustituido en el residuo de pentofuranosilo en nucleósidos normales (un sucedáneo del azúcar). Los nucleósidos de THP modificados incluyen, pero no están limitados a, lo que en la técnica se denomina ácido nucleico de hexitol (HNA), ácido nucleico de anitol (ANA), ácido nucleico de manitol (MNA) (ver Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841-854), fluoro HNA (F-HNA) o los compuestos que tienen Fórmula VII:



VII

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

Bx es una fracción de base heterocíclica;

Ta y Tb son cada uno, independientemente, un grupo de ligamiento inter-nucleósidos que liga el análogo de nucleósido de tetrahidropirano con el compuesto antisentido o uno de Ta y Tb es un grupo de ligamiento inter-nucleósidos que liga el análogo de nucleósido de tetrahidropirano con el compuesto antisentido y el otro de Ta y Tb es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo terminal 5' o 3';

q1, q2, q3, q4, q5, q6 y q7 son cada uno independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆ o alquino C₂-C₆ sustituido; y cada uno de R₁ y R₂ se selecciona de hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alcoxi sustituido o no sustituido, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ y CN, en donde X es O, S o NJ₁ y cada J₁, J₂ y J₃ es, independientemente, H o alquilo C₁-C₆.

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos de THP modificados de fórmula VII en donde q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ son cada uno H. En ciertas realizaciones, por lo menos uno de q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ es distinto de H. En ciertas realizaciones, por lo menos uno de q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ es metilo. En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos de THP de fórmula VII en donde uno de R₁ y R₂ es fluoro. En ciertas realizaciones, R₁ es fluoro y R₂ es H; R₁ es metoxi y R₂ es H, y R₁ es metoxietoxi y R₂ es H.

Como se usa en la presente, "2'-modificado" o "2'-sustituido" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un sustituyente en la posición 2' distinta de H o OH. Los nucleósidos 2'-modificados incluyen, pero no están limitados a, nucleósidos bicíclicos en donde el puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de azúcar conecta el carbono 2' y otro carbono del anillo de azúcar; y nucleósidos sin puente de 2'-sustituyentes, como alilo, amino, azido, tio, O-alilo, alquilo O-C₁₋₁₀, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), o O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), donde cada R_m y R_n es, independientemente, H o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido. Los nucleósidos 2'-modificados pueden comprender además otras modificaciones, por ejemplo en otras posiciones del azúcar y/o en la nucleobase.

Como se usa en la presente, "2'-F" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo fluoro en la posición 2'.

Como se usa en la presente, "2'-OMe" o "2'-OCH₃" o "2'-O-metil" se refiere cada uno a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo -OCH₂CH₂OCH₃ en la posición 2' del anillo de azúcar.

Como se usa en la presente, "MOE" o "2'-MOE" o "2'-OCH₂CH₂OCH₃" o "2'-O-metoxietilo" se refiere cada uno a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo -OCH₂CH₂OCH₃ en la posición 2' del anillo de azúcar.

Como se usa en la presente, "oligonucleótido" se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos ligados. En ciertas realizaciones, se modifican uno o más de la pluralidad de nucleósidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido comprende uno o más ribonucleósidos (ARN) y/o desoxirribonucleósidos (ADN).

5 También se conocen en la técnica muchos otros sistemas de anillo sucedáneos de azúcar biciclo y triciclo que pueden usarse para modificar nucleósidos para su incorporación en compuestos antisentido (ver, por ejemplo, artículo de revisión: Leumann, *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, 10, 841-854)

10 Dichos sistemas de anillos pueden someterse a varias sustituciones adicionales para aumentar la actividad.

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

15 En nucleótidos que tienen fracciones de azúcares modificados, las fracciones de nucleobases (naturales, modificadas o una combinación de las mismas) se mantienen para la hibridación con un objetivo de ácido nucleico apropiado.

20 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido comprenden uno o más nucleósidos que tienen fracciones de azúcares modificados. En ciertas realizaciones, la fracción de azúcar modificado es 2'-MOE. En ciertas realizaciones, los nucleósidos 2'-MOE modificados están dispuestos en un motivo gapmer. En ciertas realizaciones, la fracción de azúcar modificado es un nucleósido bicíclico que tiene un grupo puente (4'-CH(CH₃)-O-2'). En ciertas realizaciones, los nucleósidos (4'-CH(CH₃)-O-2') modificados están dispuestos a lo largo de las alas de un motivo gapmer. En ciertas realizaciones, la fracción de azúcar modificado es un cEt. En ciertas realizaciones, los nucleótidos cEt modificados están dispuestos a lo largo de las alas de un motivo gapmer.

25 *Nucleobases modificadas*

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

40 Las nucleobases modificadas adicionales incluyen 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinilo (-C≡C-CH₃) uracilo y citosina y otros derivados de alquilo de bases de pirimidina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-aminoadenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

50 Las fracciones de base heterocíclica pueden incluir aquellos en los que la base de purina o pirimidina está reemplazada por otros heterociclos, por ejemplo, 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Las nucleobases que son particularmente útiles para aumentar la afinidad de enlace de los compuestos antisentido incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina.

55 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de ApoCIII comprenden una o más nucleobases modificadas. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido gap-ampliados dirigidos a un ácido nucleico de ApoCIII comprenden una o más nucleobases modificadas. En ciertas realizaciones, la nucleobase modificada es 5-metilcitosina. En ciertas realizaciones, cada citosina es una 5-metilcitosina.

60 *Composiciones y Métodos para Formular Composiciones Farmacéuticas*

Los oligonucleótidos antisentido pueden mezclarse con sustancia activa o inerte farmacéuticamente aceptable para la preparación de composiciones farmacéuticas o formulaciones. Las composiciones y métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas son dependientes de una serie de criterios, que incluyen, pero no limitados a, vía de administración, extensión de la enfermedad o dosis a administrar.

65

El compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de ApoCIII puede utilizarse en composiciones farmacéuticas combinando el compuesto antisentido con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable adecuado.

5 En ciertas realizaciones, el "portador farmacéutico" o "excipiente" es un solvente farmacéuticamente aceptable, agente suspensor o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para administrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y puede seleccionarse, con la forma de administración planificada en mente, para proporcionar el volumen, la consistencia, etc. deseados, cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica dada. Los portadores farmacéuticos típicos incluyen, pero no están limitados a, agentes de enlace (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); rellenos (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o hidrogenofosfato de calcio, etc.); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.); disgregantes (por ejemplo, almidón, glicolato sódico de almidón, etc.); y agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, etc.).

20 Los excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables, que no reaccionan perjudicialmente con ácidos nucleicos, adecuados para la administración parenteral o no parenteral también pueden usarse para formular las composiciones divulgadas en la presente. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no están limitados a, agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

25 Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye solución salina tamponada con fosfato (PBS). La PBS es un diluyente adecuado para su uso en composiciones que se administran por vía parenteral. Por consiguiente, en una realización, se emplea en los métodos descritos en la presente una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de ApoCIII y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, el diluyente farmacéuticamente aceptable es PBS. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido.

30 Las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos antisentido abarcan cualquier sal, éster o sal de dicho éster farmacéuticamente aceptables, o un oligonucleótido que, tras la administración a un animal, incluyendo un humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo. Por consiguiente, por ejemplo, la divulgación también se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de compuestos antisentido, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de tales profármacos y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero sin limitación, sales de sodio y potasio.

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

Compuestos Antisentido Conjugados

45 Los compuestos antisentido se pueden ligar covalentemente a una o más fracciones o conjugados que aumentan la actividad, distribución celular o captación celular de los oligonucleótidos antisentido resultantes. Los grupos conjugados típicos incluyen fracciones de colesterol y fracciones lipídicas. Los grupos conjugados adicionales incluyen carbohidratos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes.

50 Los compuestos antisentido también pueden modificarse para tener uno o más grupos estabilizadores que están generalmente unidos a uno o a ambos términos de compuestos antisentido para aumentar propiedades como, por ejemplo, estabilidad de nucleasas. Incluidos en los grupos estabilizadores están las estructuras de tapa. Estas modificaciones terminales protegen el compuesto antisentido de la degradación de la exonucleasa y pueden ayudar en la administración y/o localización dentro de una célula. La tapa puede estar presente en el término 5' (tapa 5'), o en el término 3' (tapa 3'), o puede estar presente en ambos términos. Las estructuras de tapa son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, tapas desoxiastásicas invertidas. Grupos estabilizadores 3' y 5' adicionales que pueden usarse para cubrir uno o ambos extremos de un compuesto antisentido para impartir estabilidad a las nucleasas incluyen los descritos en la WO 03/004602 publicada el 16 de enero de 2003.

Cultivo celular y tratamiento de compuestos antisentido

65 Los efectos de los compuestos antisentido sobre el nivel, la actividad o la expresión de ácidos nucleicos o proteínas ApoCIII se pueden probar in vitro en una variedad de tipos de células. Los tipos de células utilizadas para tales análisis están disponibles de vendedores comerciales (por ejemplo, American Type Culture Collection,

Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walkersville, MD) y las células se cultivan de acuerdo con las instrucciones del vendedor que usan reactivos comercialmente disponibles (por ejemplo, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Los tipos de células ilustrativos incluyen, pero no están limitados a, células HepG2, células Hep3B, células Huh7 (carcinoma hepatocelular), hepatocitos primarios, células A549, fibroblastos GM04281 y células LLC-MK2.

Pruebas in vitro de oligonucleótidos antisentido

En la presente se describen métodos para el tratamiento de células con oligonucleótidos antisentido, que pueden modificarse de forma apropiada 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 usado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye el reactivo de transfección de lípidos catiónicos LIPOFECTIN® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los oligonucleótidos antisentido se mezclan con LIPOFECTIN® en OPTI-MEM® 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para lograr la concentración final deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración de LIPOFECTIN® que típicamente varía de 2 a 12 ug/ml por 100 nM de oligonucleótido antisentido.

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

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

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

Otro reactivo usado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye FuGENE 6 (Roche Diagnostics Corp., Inobjetivopolis, IN). El compuesto oligomérico antisentido se mezcló con FuGENE 6 en 1 ml de RPMI libre de suero para lograr la concentración deseada de oligonucleótido con una proporción de FuGENE 6 a compuesto oligomérico de 1 a 4 µL de FuGENE 6 por 100 nM.

Otra técnica usada para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye la electroporación (Sambrooke y Russell en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001).

Las células se tratan con oligonucleótidos antisentido por métodos rutinarios. Las células se recolectan típicamente 16-24 horas después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido, en cuyo momento se miden los niveles de ARN o proteína de los ácidos nucleicos objetivo por métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente (Sambrooke y Russell en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001). En general, cuando los tratamientos se realizan en múltiples repeticiones, los datos se presentan como la media de los tratamientos duplicados.

La concentración de oligonucleótido antisentido usado varía de línea celular a línea celular. Los métodos para determinar la concentración óptima de oligonucleótidos antisentido para una línea celular particular son bien conocidos en la técnica (Sambrooke y Russell en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001). Los oligonucleótidos antisentido se usan típicamente en concentraciones que varían de 1 nM a 300 nM cuando se transfectan con LIPOFECTAMINE2000® (Invitrogen, Carlsbad, CA), Lipofectin® (Invitrogen, Carlsbad, CA) o Cytofectin™ (Genlantis, San Diego, CA). Los oligonucleótidos antisentido se usan a concentraciones más altas que varían de 625 a 20.000 nM cuando se transfectan usando electroporación.

Aislamiento de ARN

El análisis de ARN puede realizarse en ARN celular total o ARNm poli(A)+. Los métodos de aislamiento de

ARN son bien conocidos en la técnica (Sambrooke y Russell en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001). El ARN se prepara usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, usando el Reactivo TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con los protocolos recomendados por el fabricante.

5

Análisis de la Inhibición de Niveles o Expresión objetivo

La inhibición de los niveles o la expresión de un ácido nucleico de ApoCIII se puede ensayar de varias maneras conocidas en la técnica (Sambrooke y Russell en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001) Por ejemplo, los niveles de ácido nucleico objetivo pueden cuantificarse mediante, por ejemplo, análisis de transferencia Northern, reacción en cadena de la polimerasa competitiva (PCR) o PCR cuantitativa en tiempo real. El análisis de ARN puede realizarse en ARN celular total o ARNm poli(A)+. Los métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. El análisis de transferencia Northern también es rutinario en la técnica. La PCR cuantitativa en tiempo real se puede llevar a cabo convenientemente usando el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM® 7600, 7700 o 7900 comercialmente disponible, disponible de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y usado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10

15

Análisis PCR en Tiempo Real Cuantitativa de los Niveles de ARN Objetivo

20

La cuantificación de los niveles de ARN objetivo se puede realizar mediante PCR en tiempo real cuantitativa usando el sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7600, 7700 o 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los métodos de PCR en tiempo real cuantitativa son bien conocidos en la técnica.

25

30

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

35

Las cantidades objetivo de genes (o ARN) obtenidas por PCR en tiempo real se pueden normalizar usando o el nivel de expresión de un gen cuya expresión es constante, como la ciclofilina A, o cuantificando el ARN total usando RIBOGREEN® (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA). La expresión de ciclofilina A se cuantifica por PCR en tiempo real, siendo ejecutada simultáneamente con el objetivo, por multiplexación o por separado. El ARN total se cuantifica usando el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA). Los métodos de cuantificación de ARN por RIBOGREEN® se enseñan en Jones, LJ, et al., (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374). Para medir la fluorescencia RIBOGREEN® se usa un instrumento CYTOFLUOR® 4000 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

40

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

45

Las cantidades objetivo de genes obtenidas por RT, PCR en tiempo real pueden usar el nivel de expresión de GAPDH o ciclofilina A, genes cuya expresión es constante, o cuantificando el ARN total utilizando RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). La expresión de GAPDH o ciclofilina A puede cuantificarse mediante RT, PCR en tiempo real, ejecutándose simultáneamente con el objetivo, por multiplexación o por separado. El ARN total se cuantificó usando el reactivo de cuantificación de ARN RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR).

50

Análisis de los Niveles de Proteínas

La inhibición antisentido de los ácidos nucleicos de ApoCIII puede evaluarse midiendo los niveles de proteína ApoCIII. Los niveles de proteína ApoCIII pueden evaluarse o cuantificarse en una variedad de maneras bien conocidas en la técnica, como inmunoprecipitación, análisis de transferencia Western (immunoblotting), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayos cuantitativos de proteínas, ensayos de actividad de proteínas (por ejemplo, ensayos de actividad de caspasa), inmunohistoquímica, inmunocitoquímica o clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) (Sambrooke y Russell en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001) Los anticuerpos dirigidos a un objetivo pueden identificarse y obtenerse a partir de una variedad de fuentes, como el catálogo de anticuerpos MSRS (Aerie Corporation, Birmingham, MI), o pueden prepararse por métodos de generación de anticuerpos monoclonales o policlonales convencionales bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos útiles para la detección de ApoCIII humano y de ratón están disponibles comercialmente.

60

Prueba in vivo de compuestos antisentido

65

Los compuestos antisentido, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, se prueban en animales para evaluar su capacidad para inhibir la expresión de ApoCIII y producir cambios fenotípicos. Las pruebas se pueden realizar en animales normales, o en modelos de enfermedades experimentales. Para la administración a animales, los oligonucleótidos antisentido se formulan en un diluyente farmacéuticamente aceptable, como solución salina tamponada con fosfato. La administración incluye vías de administración parenteral. El cálculo de la dosificación de oligonucleótidos antisentido y la frecuencia de dosificación depende de factores tales como la vía de administración y el peso corporal del animal. Después de un período de tratamiento con oligonucleótidos antisentido, el ARN se aísla del tejido y se miden los cambios en la expresión de ácidos nucleicos de ApoCIII. También se miden los cambios en los niveles de proteína ApoCIII.

Ciertas Indicaciones

En ciertas realizaciones, en la presente se divulgan métodos de tratamiento de un individuo que comprenden administrar una o más composiciones farmacéuticas como se describe en la presente. En ciertas realizaciones, el individuo tiene una enfermedad cardiovascular o un trastorno metabólico.

En ciertas realizaciones, la enfermedad cardiovascular es aneurisma, angina de pecho, arritmia, aterosclerosis, enfermedad cerebrovascular, enfermedad cardíaca coronaria, hipertensión, dislipidemia, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, apoplejía y similares. En ciertas realizaciones, la dislipidemia es quilomicronemia.

Como se muestra en los ejemplos a continuación, se ha demostrado que los compuestos dirigidos a ApoCIII como se describe en la presente modulan marcadores o fenotipos fisiológicos de una enfermedad cardiovascular. En algunos de los experimentos, los compuestos aumentaron los niveles de HDL y disminuyeron los niveles de LDL y triglicéridos en comparación con los animales no tratados. En ciertas realizaciones, el aumento en los niveles de HDL y la disminución en los niveles de LDL y triglicéridos se asoció con una inhibición de ApoCIII por los compuestos.

En ciertas realizaciones, los marcadores fisiológicos de una enfermedad cardiovascular pueden ser cuantificables. Por ejemplo, los niveles de HDL se pueden medir y cuantificar mediante, por ejemplo, análisis de lípidos estándar. Para dichos marcadores, en ciertas realizaciones, el marcador puede aumentarse en aproximadamente el 5, 10, 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 cualquiera de estos valores.

También, en la presente se divulgan métodos para prevenir, tratar o mejorar un síntoma asociado con una enfermedad cardiovascular en un sujeto con necesidad de ello. En ciertas realizaciones, se divulga un método para reducir la velocidad de aparición de un síntoma asociado con una enfermedad cardiovascular. En ciertas realizaciones, se divulga un método para reducir la gravedad de un síntoma asociado con una enfermedad cardiovascular. En dichas realizaciones, los métodos comprenden administrar a un individuo con necesidad de ello una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto dirigido a un ácido nucleico de ApoCIII.

Las enfermedades cardiovasculares se caracterizan por numerosos síntomas físicos. Cualquier síntoma conocido por el experto en la técnica que se asocie con una enfermedad cardiovascular puede prevenirse, tratarse, mejorarse o modularse de otra manera como se expone anteriormente en los métodos anteriormente descritos. En ciertas realizaciones, el síntoma puede ser cualquiera de, pero no limitado a, angina de pecho, dolor de pecho, dificultad para respirar, palpitaciones, debilidad, mareos, náuseas, sudoración, taquicardia, bradicardia, arritmia, fibrilación auricular, hinchazón en las extremidades inferiores, cianosis, fatiga, desmayos, entumecimiento de la cara, entumecimiento de las extremidades, claudicación o calambres de los músculos, hinchazón del abdomen o fiebre.

En ciertas realizaciones, el síntoma es angina de pecho. En ciertas realizaciones, el síntoma es dolor de pecho. En ciertas realizaciones, el síntoma es dificultad para respirar. En ciertas realizaciones, el síntoma es palpitaciones. En ciertas realizaciones, el síntoma es debilidad. En ciertas realizaciones, el síntoma es mareo. En ciertas realizaciones, el síntoma es náusea. En ciertas realizaciones, el síntoma es sudoración. En ciertas realizaciones, el síntoma es taquicardia. En ciertas realizaciones, el síntoma es bradicardia. En ciertas realizaciones, el síntoma es arritmia. En ciertas realizaciones, el síntoma es fibrilación auricular. En ciertas realizaciones, el síntoma es hinchazón en las extremidades inferiores. En ciertas realizaciones, el síntoma es cianosis. En ciertas realizaciones, el síntoma es fatiga. En ciertas realizaciones, el síntoma es desmayo. En ciertas realizaciones, el síntoma es entumecimiento de la cara. En ciertas realizaciones, el síntoma es entumecimiento de las extremidades. En ciertas realizaciones, el síntoma es claudicación o calambres de músculos. En ciertas realizaciones, el síntoma es hinchazón del abdomen. En ciertas realizaciones, el síntoma es fiebre a corto plazo alterada.

En ciertas realizaciones, los trastornos metabólicos incluyen, pero no están limitados a, hiperglucemia, prediabetes, diabetes (tipo I y tipo II), obesidad, resistencia a la insulina, síndrome metabólico y dislipidemia diabética.

En ciertas realizaciones, los compuestos dirigidos a ApoCIII como se describen en la presente modulan marcadores o fenotipos fisiológicos de un trastorno metabólico. En ciertas realizaciones, los marcadores fisiológicos de un trastorno metabólico se pueden cuantificar. Por ejemplo, los niveles de glucosa o la resistencia a la insulina pueden medirse y cuantificarse mediante ensayos estándar conocidos en la técnica. Para tales marcadores, en ciertas realizaciones, el marcador puede reducirse en aproximadamente el 5, 10, 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 cualquiera de estos valores. En otro ejemplo, la sensibilidad a la insulina o los niveles de HDL pueden medirse y cuantificarse mediante ensayos estándar conocidos en la técnica. Para tales marcadores, en ciertas realizaciones, el marcador puede aumentarse en aproximadamente el 5, 10, 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 cualquiera de estos valores.

También, se divulgan en la presente métodos para prevenir, tratar o mejorar un síntoma asociado con un trastorno metabólico en un sujeto con necesidad de ello. En ciertas realizaciones, se divulga un método para reducir la velocidad de aparición de un síntoma asociado con un trastorno metabólico. En ciertas realizaciones, se divulga un método para reducir la gravedad de un síntoma asociado con un trastorno metabólico. En dichas realizaciones, los métodos comprenden administrar a un individuo con necesidad de ellos una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto dirigido a un ácido nucleico de ApoCIII.

Los trastornos metabólicos se caracterizan por numerosos síntomas físicos. Cualquier síntoma conocido por un experto en la técnica que se asocie con un trastorno metabólico puede prevenirse, tratarse, mejorarse o modularse de otra manera como se expone con anterioridad en los métodos descritos anteriormente. En ciertas realizaciones, el síntoma puede ser cualquiera de, pero no está limitado a, producción excesiva de orina (poliuria), sed excesiva y aumento de la ingesta de líquidos (polidipsia), visión borrosa, pérdida de peso inexplicable y letargo.

En ciertas realizaciones, se divulgan métodos para tratar un individuo que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más composiciones farmacéuticas como se describe en la presente. En ciertas realizaciones, el individuo tiene una enfermedad cardiovascular. En ciertas realizaciones, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de ApoCIII se acompaña de monitorización de los niveles de ApoCIII o marcadores de enfermedad cardiovascular, diabetes u otro proceso de la enfermedad asociado con la expresión de ApoCIII, para determinar la respuesta de un individuo a la administración del compuesto antisentido. La respuesta de un individuo a la administración del compuesto antisentido se usa por un médico para determinar la cantidad y la duración de la intervención terapéutica.

En ciertas realizaciones, la administración de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de ApoCIII da como resultado la reducción de la expresión de ApoCIII de por lo menos aproximadamente el 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 cualquiera de estos valores. En ciertas realizaciones, la expresión de ApoCIII se reduce a ≤ 50 mg/l, ≤ 60 mg/l, ≤ 70 mg/l, ≤ 80 mg/l, ≤ 90 mg/l, ≤ 100 mg/l, ≤ 110 mg/l, ≤ 120 mg/l, ≤ 130 mg/l, ≤ 140 mg/l, ≤ 150 mg/l, ≤ 160 mg/l, ≤ 170 mg/l, ≤ 180 mg/l, ≤ 190 mg/l o ≤ 200 mg/l.

En ciertas realizaciones, la administración de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de ApoCIII da como resultado un aumento en los niveles de HDL de por lo menos aproximadamente el 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 cualquiera de estos valores.

En ciertas realizaciones, la administración de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de ApoCIII da como resultado la reducción de los niveles de TG (posprandial o en ayunas) en por lo menos aproximadamente el 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 cualquiera de estos valores. En ciertas realizaciones, TG (posprandial o en ayunas) se reduce a ≤ 100 mg/dl, ≤ 110 mg/dl, ≤ 120 mg/dl, ≤ 130 mg/dl, ≤ 140 mg/dl, ≤ 150 mg/dl, ≤ 160 mg/dl, ≤ 170 mg/dl, ≤ 180 mg/dl, ≤ 190 mg/dl, ≤ 200 mg/dl, ≤ 210 mg/dl, ≤ 220 mg/dl, ≤ 230 mg/dl, ≤ 240 mg/dl, ≤ 250 mg/dl, ≤ 260 mg/dl, ≤ 270 mg/dl, ≤ 280 mg/dl, ≤ 290 mg/dl, ≤ 300 mg/dl, ≤ 350 mg/dl, ≤ 400 mg/dl, ≤ 450 mg/dl, ≤ 500 mg/dl, ≤ 550 mg/dl, ≤ 600 mg/dl, ≤ 650 mg/dl, ≤ 700 mg/dl, ≤ 750 mg/dl, ≤ 800 mg/dl, ≤ 850 mg/dl, ≤ 900 mg/dl, ≤ 950 mg/dl, ≤ 1000 mg/dl, ≤ 1100 mg/dl, ≤ 1200 mg/dl, ≤ 1300 mg/dl, ≤ 1400 mg/dl, ≤ 1500 mg/dl, ≤ 1600 mg/dl, ≤ 1700 mg/dl, ≤ 1800 mg/dl o ≤ 1900 mg/dl.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto antisentido dirigido a ApoCIII se usan para la preparación de un medicamento para tratar a un paciente que sufre o es susceptible a una enfermedad cardiovascular.

Administración

Los compuestos o composiciones farmacéuticas se pueden administrar de varias maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y de la zona a ser tratada. La administración puede ser oral o parenteral.

En ciertas realizaciones, los compuestos y las composiciones como se describen en la presente se

administran parenteralmente. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular.

5 En ciertas realizaciones, la administración parenteral es por infusión. La infusión puede ser crónica o continua o corta o intermitente. En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos infundidos se administran con una bomba. En ciertas realizaciones, la infusión es intravenosa.

10 En ciertas realizaciones, la administración parenteral es por inyección. La inyección puede administrarse con una jeringuilla o una bomba. En ciertas realizaciones, la inyección es una inyección de bolo. En ciertas realizaciones, la inyección se administra directamente a un tejido u órgano. En ciertas realizaciones, la administración parenteral es subcutánea.

15 En ciertas realizaciones, las formulaciones para administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados como, pero no limitado a, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

20 En ciertas realizaciones, las formulaciones para administración oral de los compuestos o composiciones pueden incluir, pero no están limitados a, portadores farmacéuticos, excipientes, polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medio no acuoso, cápsulas, cápsulas de gel, bolsitas, comprimidos o minicomprimidos. Pueden ser deseables espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, dispersantes o aglutinantes. En ciertas realizaciones, las formulaciones orales son aquellas en las que los compuestos se administran junto con uno o más potenciadores de la penetración, surfactantes y quelantes.

25 *Dosificación*

30 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran de acuerdo con un régimen de dosificación (por ejemplo, dosis, frecuencia de dosis y duración) en donde el régimen de dosificación puede seleccionarse para lograr un efecto deseado. El efecto deseado puede ser, por ejemplo, la reducción de ApoCIII o la prevención, reducción, mejora o ralentización de la progresión de una enfermedad o afección asociada con ApoCIII.

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

40 La dosificación depende de la gravedad y la sensibilidad del estado de la enfermedad a ser tratada, con el curso del tratamiento durando de varios días a varios meses, o hasta que se efectúa una cura o se logra una disminución del estado de la enfermedad. La dosificación también depende de la potencia del fármaco y del metabolismo. En ciertas realizaciones, la dosificación es de 0,01 µg a 100mg por kg de peso corporal, o dentro de un intervalo de dosificación de 0,001mg - 1000mg, y puede administrarse una o más veces al día, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Después de un tratamiento exitoso, puede ser deseable someter al paciente a terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado de la enfermedad, en donde el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que varían de 0,01 µg a 100 mg por kg de peso corporal, una o más veces al día, a una vez cada 20 años o que varían de 0,001 mg a 1000 mg de dosificación.

50 *Ciertas terapias de combinación*

55 En ciertas realizaciones, un primer agente que comprende el compuesto descrito en la presente se coadministra con uno o más agentes secundarios. En ciertas realizaciones, dichos segundos agentes están diseñados para tratar la misma enfermedad, trastorno o afección que el primer agente descrito en la presente. En ciertas realizaciones, tales segundos agentes están diseñados para tratar una enfermedad, trastorno o afección diferente que la del primer agente descrito en la presente. En ciertas realizaciones, un primer agente está diseñado para tratar un efecto secundario no deseado de un segundo agente. En ciertas realizaciones, los segundos agentes se coadministran con el primer agente para tratar un efecto no deseado del primer agente. En ciertas realizaciones, dichos segundos agentes están diseñados para tratar un efecto secundario no deseado de una o más composiciones farmacéuticas como se describe en la presente. En ciertas realizaciones, los segundos agentes se coadministran con el primer agente para producir un efecto combinatorio. En ciertas realizaciones, los segundos agentes se administran conjuntamente con el primer agente para producir un efecto sinérgico. En ciertas realizaciones, la coadministración del primer y segundo agentes permite el uso de dosificaciones menores de las que se requerirían para lograr un efecto terapéutico o profiláctico si los agentes se administraran como terapia independiente.

65

En ciertas realizaciones, una o más composiciones descritas en la presente y uno o más agentes farmacéuticos diferentes se administran al mismo tiempo. En ciertas realizaciones, una o más composiciones y uno o más agentes farmacéuticos diferentes se administran en momentos diferentes. En ciertas realizaciones, una o más composiciones descritas en la presente y uno o más agentes farmacéuticos diferentes se preparan juntos en una única formulación. En ciertas realizaciones, una o más composiciones descritas en la presente y uno o más agentes farmacéuticos diferentes se preparan por separado.

En ciertas realizaciones, los segundos agentes incluyen, pero no están limitados a, agente reductor de ApoCIII, agente reductor de colesterol, agente reductor de lípidos no HDL (por ejemplo, LDL), agente de elevación de HDL, aceite de pescado, niacina, fibrato, estatina, DCCR (sal de diazóxido), agente reductor de la glucosa y/o agentes antidiabéticos. En ciertas realizaciones, el primer agente se administra en combinación con la dosis máximamente tolerada del segundo agente. En ciertas realizaciones, el primer agente se administra a un sujeto que no responde a una dosis máxima tolerada del segundo agente.

Los ejemplos de agentes reductores de ApoCIII incluyen un oligonucleótido antisentido de ApoCIII diferente del primer agente, niacina o un oligonucleótido antisentido de Apo B.

Los ejemplos de agentes reductores de glucosa y/o antidiabéticos incluyen, pero no están limitados a, un cambio de estilo de vida terapéutico, agonista de PPAR, un inhibidor de dipeptidil peptidasa (IV), un análogo de GLP-1, insulina o un análogo de insulina, una insulina secretagogo, un inhibidor de SGLT2, un análogo de amilina humana, una biguanida, un inhibidor de alfa-glucosidasa, metformina, sulfonilurea, rosiglitazona, meglitinida, tiazolidindiona, inhibidor de alfa-glucosidasa y similares. La sulfonilurea puede ser acetohexamida, clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, glimepirida, glipizida, gliburida o gliclazida. La meglitinida puede ser nateglinida o repaglinida. La tiazolidindiona puede ser pioglitazona o rosiglitazona. La alfa-glucosidasa puede ser acarbosa o miglitol.

La terapia de reducción de colesterol o lípidos puede incluir, pero no está limitada a, un cambio de estilo de vida terapéutico, estatinas, secuestrantes de ácidos biliares, ácido nicotínico y fibratos. Las estatinas pueden ser atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina y similares. Los secuestrantes de ácidos biliares pueden ser colesvelam, colestiramina, colestipol y similares. Los fibratos pueden ser gemfibrozilo, fenofibrato, clofibrato y similares.

Los agentes que aumentan el HDL incluyen fármacos inhibidores de la proteína de transferencia del éster de colesterol (CETP) (como Torcetrapib), agonistas del receptor activado por proliferación de peroxisoma, Apo-AI, Pioglitazona y similares.

Ciertas Poblaciones de Tratamiento

Ciertos sujetos con altos niveles de TG tienen un riesgo significativo de enfermedad cardiovascular y metabólica. En muchos sujetos con TG elevados (por ejemplo, hipertrigliceridemia), los tratamientos actuales no pueden reducir sus niveles de TG a niveles seguros. La ApoCIII juega un papel importante en el metabolismo de los TG y es un factor de riesgo independiente para la enfermedad cardiovascular. La inhibición de ApoCIII, como se muestra en la presente, disminuye significativamente los niveles de TG lo que pueden mejorar la enfermedad cardiovascular o metabólica, o el riesgo de la misma.

Los niveles de TG límite altos (150-199 mg/dl) se encuentran comúnmente en la población general y son un componente común del síndrome metabólico / estados de resistencia a la insulina. El alto nivel de TG en plasma de ≥ 200 mg/dl es un rasgo clínico común asociado con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (Hegele et al., Hum Mol Genet 2009, 18: 4189-4194 ; Hegele y Pollex, Mol Cell Biochem, 2009, 326: 35-43). Los niveles muy altos de TG (≥ 500 y ≤ 2000 mg/dl) se asocian con mayor frecuencia también con niveles elevados de quilomicrones, y van acompañados de un aumento en el riesgo de pancreatitis aguda.

En ciertas realizaciones, los compuestos, composiciones y métodos descritos en la presente se usan para tratar sujetos con un nivel de TG entre 100-200 mg/dl, 100-300 mg/dl, 100-400 mg/dl, 100-500 mg/dl, 200-500 mg/dl, 300-500 mg/dl, 400-500 mg/dl, 500-1000 mg/dl, 600-1000 mg/dl, 700-1000 mg/dl, 800-1000 mg/dl, 900-1000 mg/dl, 500-1500 mg/dl, 1000-1500 mg/dl, 100-2000 mg/dl, 150-2000 mg/dl, 200-2000 mg/dl, 300-2000 mg/dl, 400-2000 mg/dl, 500-2000 mg/dl, 600-2000 mg/dl, 700-2000 mg/dl, 800-2000 mg/dl, 900-2000 mg/dl, 1000-2000 mg/dl, 1100-2000 mg/dl, 1200-2000 mg/dl, 1300-2000 mg/dl, 1400-2000 mg/dl, o 1500-2000 mg/dl. En ciertas realizaciones, el tratamiento con los compuestos divulgados en la presente está indicado para un sujeto con un nivel de TG ≥ 100 mg/dl, ≥ 110 mg/dl, ≥ 120 mg/dl, ≥ 130 mg/dl, ≥ 140 mg/dl, ≥ 150 mg/dl, ≥ 160 mg/dl, ≥ 170 mg/dl, ≥ 180 mg/dl, ≥ 190 mg/dl, ≥ 200 mg/dl, ≥ 300 mg/dl, ≥ 400 mg/dl, ≥ 500 mg/dl, ≥ 600 mg/dl, ≥ 700 mg/dl, ≥ 800 mg/dl, ≥ 900 mg/dl, ≥ 1000 mg/dl, ≥ 1100 mg/dl, ≥ 1200 mg/dl, ≥ 1300 mg/dl, ≥ 1400 mg/dl, ≥ 1500 mg/dl, ≥ 1600 mg/dl, ≥ 1700 mg/dl, ≥ 1800 mg/dl, ≥ 1900 mg/dl, ≥ 2000 mg/dl, ≥ 2100 mg/dl, ≥ 2200 mg/dl, ≥ 2300 mg/dl, ≥ 2400 mg/dl o ≥ 2500 mg/dl.

Algunos tipos de hipertrigliceridemia se pueden caracterizar por el sistema de clasificación de Fredrickson o

por el sistema de clasificación descrito por Tremblay (Tremblay et al., J Clin Lipidol, 2011, 5: 37-44). En ciertas realizaciones, los compuestos, composiciones y métodos descritos en la presente son útiles en el tratamiento de sujetos con, o con riesgo de, hipertrigliceridemia de Fredrickson tipo II, IV o V.

5 El Fredrickson Tipo IIb (también conocido como hiperlipoproteinemia familiar combinada) es una hiperlipidemia mixta (colesterol y niveles de TG altos), provocada por elevaciones de LDL-C y VLDL. Los niveles de VLDL altos se deben a la sobreproducción de sustratos, incluidos TG, acetil CoA y un aumento en la síntesis de B-100. También pueden estar provocados por la disminución de la depuración de LDL. La prevalencia en la población es de aproximadamente el 10%.

10 El Fredrickson Tipo IV (también conocido como hipertrigliceridemia familiar) es una afección autosómica dominante que tiene lugar en aproximadamente el 1% de la población. Los niveles de TG están elevados como resultado del exceso de producción hepática de VLDL o deficiencia de LPL heterocigótica, pero casi siempre son menores a 1000 mg/dl. Los niveles de colesterol en suero generalmente están dentro de los límites normales. El trastorno es heterogéneo y el fenotipo está fuertemente influenciado por factores ambientales, particularmente el consumo de carbohidratos y etanol. En ciertas realizaciones, los compuestos, las composiciones y los métodos descritos en la presente son útiles en el tratamiento de sujetos con un nivel de TG \geq 200 mg/dl y deficiencia de LPL heterocigótica o sobreproducción de VLDL. En ciertas realizaciones, los compuestos, composiciones y métodos descritos en la presente son útiles en el tratamiento de sujetos con un nivel de TG \geq 500 mg/dl y deficiencia de LPL heterocigótica o sobreproducción de VLDL.

25 El Fredrickson Tipo V tiene VLDL y quilomicrones altos. Se caracteriza por portadores de variantes del gen de la LPL con pérdida de función asociadas con la actividad de la LPL de por lo menos el 20% (es decir, deficiencia de LPL parcial). Estos sujetos presentan plasma lactescente e hipertrigliceridemia severa debido a quilomicrones y VLDL. Los niveles de TG son invariablemente superiores a 1000 mg/dl y los niveles de colesterol total siempre son elevados. El nivel de LDL-C es habitualmente bajo. También se asocia con un riesgo incrementado de pancreatitis aguda, intolerancia a la glucosa e hiperuricemia. Los síntomas se presentan generalmente en la edad adulta (> 35 años) y, aunque la prevalencia es relativamente rara, es mucho más común que los sujetos deficientes en LPL de homocigotos o heterocigotos compuestos. En ciertas realizaciones, los compuestos, las composiciones y métodos descritos en la presente son útiles en el tratamiento de sujetos con TG \geq 1000 mg/dl. En ciertas realizaciones, los compuestos, composiciones y métodos descritos en la presente son útiles para tratar sujetos con, o en riesgo de, pancreatitis asociada con niveles de TG altos en un sujeto. En ciertas realizaciones, los compuestos, composiciones y métodos descritos en la presente son útiles para tratar sujetos con, o en riesgo de, enfermedad cardiovascular o metabólica asociada con altos niveles de TG en un sujeto. En ciertas realizaciones, la enfermedad cardiovascular es aneurisma, angina de pecho, arritmia, aterosclerosis, enfermedad cerebrovascular, enfermedad cardíaca coronaria, hipertensión, dislipidemia, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, apoplejía y similares. En ciertas realizaciones, la dislipidemia es quilomicronemia. En ciertas realizaciones, las enfermedades o trastornos metabólicos incluyen, pero no están limitados a, hiperglucemia, prediabetes, diabetes (tipo I y tipo II), obesidad, resistencia a la insulina, síndrome metabólico y dislipidemia diabética.

40 En ciertas realizaciones, el tratamiento con los compuestos divulgados en la presente está indicado para un animal humano con un defecto genético que aumenta los niveles de ApoCIII y/o los niveles de triglicéridos. En ciertas realizaciones, el defecto genético es una variante alélica o polimorfismo que aumenta la expresión de ApoCIII. En ciertas realizaciones, el polimorfismo es T (en la posición 74) a A, C (en la posición -641) a A, G (en la posición -630) a A, T (en la posición -625) a la delección, C (en la posición -482) a T, T (en la posición -455) a C, C (en la posición 1100) a T, C (en la posición 3175) a G, T (en la posición 3206) a G, C (en la posición 3238) a G, y similares. En ciertas realizaciones, el defecto genético es una deficiencia de LPL heterocigótica.

50 En ciertas realizaciones, el tratamiento con los compuestos divulgados en la presente memoria está indicado para un animal humano con niveles elevados de ApoCIII. En ciertas realizaciones, el nivel elevado de ApoCIII es \geq 50 mg/l, \geq 60 mg/l, \geq 70 mg/l, \geq 80 mg/l, \geq 90 mg/l, \geq 100 mg/l, \geq 110 mg/l, \geq 120 mg/l, \geq 130 mg/l, \geq 140 mg/l, \geq 150 mg/l, \geq 160 mg/l, \geq 170 mg/l, \geq 180 mg/l, \geq 190 mg/l, \geq 200 mg/l, \geq 300 mg/l, \geq 400 mg/l o \geq 500 mg/l.

55 EJEMPLOS

Divulgación no limitativa

60 Aunque ciertos compuestos, composiciones y métodos descritos en la presente se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solamente para ilustrar los compuestos descritos en la presente memoria y no se pretende que limiten los mismos.

Ejemplo 1: Efecto de la inhibición antisentido *in vivo* de ApoCIII humano en ratones transgénicos huApoCIII

65 Los ratones transgénicos con el transgén ApoCIII humano utilizado en el estudio fueron la progenie de

híbridos F1 transgénicos de ofhuApoCIII (Jackson Laboratories, CA) y ratones C57BL/6. Se utilizó en este ensayo ISIS 304801 (previamente divulgado en la Patente US 7.598.227) con un sitio de inicio de 508 en la SEQ ID NO: 1 (número de acceso de GENBANK NM_000040.1) y un sitio de inicio de 3139 en SEQ ID NO: 2 (acceso de GENBANK NT_033899.8 truncado de los nucleótidos 20263040 a 20266203), con el la secuencia 5'-AGCTTCTTGTCCAGCTTTAT-3' (SEQ ID NO: 3) y un motivo gapmer 5-10-5 MOE. Otro oligonucleótido antisentido ISIS, "Compuesto X", con un motivo gapmer 5-10-5 MOE, dirigido a otra región de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, también se incluyó en este ensayo. Otro oligonucleótido antisentido ISIS, "Compuesto Y", con un motivo de gapmer 5-10-5 MOE, dirigido a una secuencia ApoCIII de roedor (Nº de Acceso GenBank NM_023114.3, SEQ ID NO: 5) también se incluyó en este ensayo.

Tratamiento

Se mantuvieron ratones transgénicos ApoCIII humanos en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se alimentaron *ad libitum* con comida de laboratorio Teklad. Los animales se aclimataron durante por lo menos 7 días en la instalación de investigación antes del inicio del experimento. Los oligonucleótidos antisentido (ASO) se prepararon en PBS y se esterilizaron filtrando a través de un filtro de 0,2 micrómetros. Los oligonucleótidos se disolvieron en 0,9% de PBS para inyección.

Los ratones machos y hembras se analizaron por separado. Los ratones macho se dividieron en tres grupos de tratamiento que consistían de 5 ratones cada uno. Dos de tales grupos recibieron inyecciones subcutáneas de ISIS 304801 o del Compuesto X a una dosis de 37,5 mg/kg dos veces a la semana durante 2 semanas. Un grupo de ratones recibió inyecciones subcutáneas de PBS dos veces a la semana durante 2 semanas. Los ratones hembra se dividieron en cuatro grupos de tratamiento que consistían en 4-5 ratones cada uno. Tres de tales grupos recibieron inyecciones subcutáneas de ISIS 304801, Compuestos X o Y a una dosis de 37,5 mg/kg dos veces a la semana durante 2 semanas. Un grupo de ratones recibió inyecciones subcutáneas de PBS dos veces a la semana durante 2 semanas. Antes del tratamiento y después de la última dosis, se extrajo sangre de cada ratón y se analizaron las muestras de plasma. Dos días después de la dosis final, se sacrificaron los ratones, se recogieron los órganos y se realizaron los análisis.

Niveles de colesterol y triglicéridos

Los triglicéridos y colesterol en plasma se extrajeron por el método de Bligh y Dyer (Bligh, EG y Dyer, W.J. Can. J. Biochem. Physiol., 37: 911-917, 1959) y se midieron con un kit de triglicéridos comercialmente disponible (DCL Triglyceride Reagent; Diagnostic Chemicals Ltd.).

Los resultados de los análisis de triglicéridos en machos y hembras se presentan en las Tablas 1 y 2, y se expresan en mg/dl. Como se observa, los niveles de triglicéridos en todos los grupos de tratamiento se redujeron significativamente en comparación con los de los grupos de control.

Para medir las diferentes fracciones de colesterol (HDL, LDL y VLDL), las muestras de plasma de los grupos hembra se analizaron por HPLC y se presentan en la Tabla 3. Como se observa, la inhibición antisentido de ApoCIII disminuyó significativamente la VLDL y también aumentó significativamente los niveles de HDL. Un aumento en HDL y una disminución en los niveles de VLDL es un efecto beneficioso cardiovascular de la inhibición antisentido de ApoCIII y puede ser beneficioso para animales con, o en riesgo de, enfermedades dislipidémicas.

Tabla 1

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los niveles de triglicéridos (mg/dl) en ratones transgénicos hembra			
	Semana 0	Semana 2	% de cambio
PBS	2144	2533	+21
Compuesto X	2385	677	-72
Compuesto Y	2632	1644	-37
ISIS 304801	2390	542	-75

Tabla 2

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los niveles de triglicéridos (mg/dl) en ratones transgénicos macho			
	Semana 0	Semana 2	% de cambio
PBS	6191	7073	+14
ISIS 304801	6588	780	-88
Compuesto X	5464	861	-84

Tabla 3

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en fracciones de colesterol en plasma (% de colesterol total) en ratones transgénicos hembra			
	VLDL (%)	LDL (%)	HDL (%)
PBS	77 ± 2.6	4 ± 1.0	19 ± 1.9
ISIS 304801	41 ± 0.6	7 ± 0.3	52 ± 0.5
Compound X	46 ± 5.1	7 ± 1.0	48 ± 5.8

Ejemplo 2: Inhibición antisentido dependiente de la dosis de ApoCIII humana en ratones transgénicos huApoCIII

ISIS 304801 y el Compuesto X se estudiaron adicionalmente en un estudio dependiente de la dosis utilizando ratones transgénicos ApoCIII humanos.

Tratamiento

Se mantuvieron ratones transgénicos ApoCIII humanos en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se alimentaron *ad libitum* con comida de laboratorio Teklad. Los animales se aclimataron durante por lo menos 7 días en la instalación de investigación antes del inicio del experimento. Los oligonucleótidos antisentido (ASO) se prepararon en PBS y se esterilizaron filtrando a través de un filtro de 0,2 micrómetros. Los oligonucleótidos se disolvieron en 0,9% de PBS para inyección.

Los ratones hembra se dividieron en nueve grupos de tratamiento que consistían en 3 ratones cada uno. Ocho de tales grupos recibieron inyecciones subcutáneas de ISIS 304801 o compuesto X a una dosis de 1.5 mg/kg/semana, 5 mg/kg/semana, 15 mg/kg/semana o 50 mg/kg/semana durante 2 semanas. Un grupo de ratones recibió inyecciones subcutáneas de PBS durante 2 semanas. Antes del tratamiento así como después de la última dosis, se extrajo sangre de cada ratón y se analizaron las muestras de plasma. Dos días después de la dosis final, se sacrificaron los ratones, se recogieron los órganos y se realizaron los análisis.

Niveles de Colesterol y Triglicéridos

Los triglicéridos y colesterol en plasma se extrajeron por el método de Bligh y Dyer (Bligh, EG y Dyer, W.J. Can. J. Biochem. Physiol., 37: 911-917, 1959) y se midieron con un kit de triglicéridos comercialmente disponible (DCL Triglyceride Reagent, Diagnostic Chemicals Ltd.).

Los resultados de los análisis de colesterol y triglicéridos en los ratones se presentan en las Tablas 4 y 5, y se expresan en mg/dl. Como se observa, los niveles de HDL en ratones tratados con dosis más altas de ISIS 304801 fueron significativamente elevados, lo que indica el efecto beneficioso de la inhibición de ApoCIII por los oligonucleótidos. Los niveles de LDL y triglicéridos en los grupos de tratamiento de dosis altas se redujeron en comparación con los niveles de los grupos de control. Un aumento en HDL y una disminución en los niveles de LDL y TG es un efecto beneficioso cardiovascular de la inhibición antisentido de ApoCIII y puede ser beneficioso para animales con, o en riesgo de, enfermedades dislipídicas.

Tabla 4

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los niveles de colesterol y triglicéridos (mg/dl) en ratones transgénicos			
	Dosis (mg/kg/sem)	Colesterol Total	Trigliceridos
PBS	-	124	1017
ISIS 304801	50.0	105	417
	15.0	116	593
	5.0	101	871
	1.5	125	1092
Compuesto X	50.0	90	496
	15.0	127	1168
	5.0	166	1506
	1.5	168	1518

Tabla 5

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los niveles de colesterol HDL y LDL (mg/dl) en ratones transgénicos			
	Dosis (mg/kg/sem)	HDL	LDL
PBS	-	40 ± 8	42 ± 8
ISIS 304801	50.0	62 ± 19	28 ± 7
	15.0	60 ± 9	34 ± 7
	5.0	44 ± 3	30 ± 13
	1.5	39 ± 2	40 ± 2
Compuesto X	50.0	46 ± 10	25 ± 3
	15.0	37 ± 7	40 ± 2
	5.0	40 ± 10	47 ± 5
	1.5	45 ± 7	44 ± 6

Ejemplo 3: Efecto de la inhibición antisentido de ApoCIII en Ratones nulos de receptor LDL transgénicos CETP

El compuesto Y se estudió adicionalmente en un modelo de ratón LDLr^{-/-} transgénico CETP humano para examinar los efectos de un inhibidor antisentido de ApoCIII de ratón sobre los lípidos del plasma y el metabolismo de lipoproteínas en ratones hiperlipidémicos.

Tratamiento

Se mantuvieron ratones transgénicos transgénicos LDLr^{-/-} CETP humanos en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se alimentaron *ad libitum* con una dieta occidental (42% de calorías de grasa, 0,2% de colesterol). Los animales se aclimataron a esta dieta durante 10 días en la instalación de investigación antes del inicio del experimento. Los oligonucleótidos antisentido (ASO) se prepararon en PBS y se esterilizaron filtrando a través de un filtro de 0,2 micrómetros. Los oligonucleótidos se disolvieron en 0,9% de PBS para inyección.

Se dividieron ratones macho de ocho semanas en tres grupos de tratamiento. Uno de dichos grupos de 6 ratones recibió inyecciones subcutáneas del compuesto Y a una dosis de 12,5 mg/kg/semana durante 4 semanas. Un grupo de 4 ratones recibió inyecciones subcutáneas del oligonucleótido control ISIS 141923 (SEQ ID NO: 4) a una dosis de 12,5 mg/kg/semana durante 4 semanas. Un grupo de 5 ratones recibió inyecciones

subcutáneas de PBS durante 4 semanas. Se tomaron muestras de plasma antes del inicio de la dosificación, y a las 2 y 4 semanas de tratamiento.

Niveles de Colesterol y Triglicéridos

5 Los triglicéridos y el colesterol en plasma se extrajeron por el método de Bligh y Dyer (Bligh, E.G. y Dyer, W.J. Can. J. Biochem. Physiol., 37: 911-917, 1959) y se midieron con un kit de triglicéridos comercialmente disponible (DCL Triglyceride Reagent; Diagnostic Chemicals Ltd.).

10 Los resultados de los análisis de colesterol y triglicéridos en los ratones se presentan en las Tablas 6 a 7, y se expresan en mg/dl. Los niveles de colesterol y triglicéridos en el grupo de tratamiento se redujeron significativamente en comparación con los del grupo de control. Una disminución en los niveles de colesterol y TG es un efecto beneficioso cardiovascular de la inhibición antisentido de ApoCIII y puede ser beneficioso para animales con, o en riesgo de, enfermedades dislipídicas.

Tabla 6

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los niveles de colesterol (mg/dl) en ratones transgénicos		
Semana	PBS	Compuesto Y
0	1851	1747
2	2035	878
4	2359	686

Tabla 7

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los niveles de triglicéridos (mg/dl) en ratones transgénicos		
Semana	PBS	Compuesto Y
0	297	451
2	420	150
4	496	86

Inhibición de los Niveles y Actividad de Proteína CETP

45 Los niveles de proteína CETP en plasma se midieron usando un kit de ELISA comercial (ALPCO, Cat # 47-CETHU-E01). La actividad de la proteína CETP se midió usando un kit de ensayo fluorométrico (Roar Biomedical, Inc. Cat # RB-CETP). Como se presenta en la Tabla 8, el tratamiento con oligonucleótido antisentido redujo la expresión y la actividad de la proteína CETP. La CETP (proteína de transferencia de éster de colesterol) facilita el intercambio de triglicéridos y ésteres de colesterol entre las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y las lipoproteínas que contienen apoB, como las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), LDL y quilomicrones. Una disminución en la CETP se asocia con niveles de HDL incrementados y niveles de LDL disminuidos (Barter P.J. et al. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23: 160-167, 2003). Por lo tanto, la inhibición de los niveles y la actividad de la proteína CETP es un efecto beneficioso cardiovascular de la inhibición antisentido de ApoCIII y puede ser beneficioso para animales con, o en riesgo de, enfermedades dislipémicas. El oligonucleótido de control no tuvo ningún efecto significativo sobre CETP, como se esperaba.

Tabla 8

Porcentaje de inhibición de la proteína CETP en ratones transgénicos		
	Nivel	Actividad
Compuesto Y	24	24
ISIS 141923	0	3

Aumento de los niveles de Proteína apoA1 y actividad de paraoxahasa-1 (PON1)

Los niveles en plasma de proteína ApoA1 se midieron mediante ELISA. La actividad de la proteína PON1 se midió usando un kit de ensayo fluorométrico EnzChek® Paroxanase (Invitrogen, Cat # E33702). Como se presenta en las Tablas 9 y 10, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido aumentó la expresión de la proteína ApoA1 y aumentó la actividad de la proteína PON1. La ApoA1 y la PON1 son componentes de proteínas principales de HDL en plasma (Aviram, M y Rosenblat, M. *Curr. Opin Lipidol.* 16: 393-399, 2005). Por lo tanto, la potenciación del nivel de proteína y la actividad de estos dos componentes proteicos es un efecto beneficioso cardiovascular de la inhibición antisentido de ApoCIII y puede ser beneficioso para animales con, o con riesgo de, enfermedades dislipidémicas. El oligonucleótido de control no tuvo ningún efecto sobre ninguna proteína, como se esperaba.

Tabla 9

Porcentaje de aumento en los niveles de proteína APOA1 en ratones transgénicos	
	mg/dl
PBS	65
Compuesto Y	211
ISIS 141923	106

Tabla 10

Porcentaje de aumento en la actividad de la proteína PON1 en ratones transgénicos			
Minutos	PBS	CompuestoY	ISIS 141923
15	0.2	0.5	0.2
30	0.8	1.1	0.8
60	2.3	3.5	2.3
120	4.9	7.5	4.8
180	7.7	11.6	7.6

Ejemplo 4: Efecto de la inhibición antisentido de ApoCIII sobre la depuración de colesterol HDL en ratones nulos del receptor de LDL transgénico CETP

El compuesto Y se estudió adicionalmente en un modelo de ratón LDLr^{-/-} transgénico CETP humano para examinar los efectos de un inhibidor antisentido de ApoCIII sobre la depuración y el metabolismo del colesterol HDL en ratones hiperlipidémicos.

Tratamiento

Se mantuvieron ratones LDLr^{-/-} transgénicos CETP humanos en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se les alimentó *ad libitum* con una dieta occidental (42% de calorías de grasa, 0,2% de colesterol). Los animales se aclimataron a esta dieta durante 10 días en la instalación de investigación antes del inicio del experimento. Los oligonucleótidos antisentido (ASO) se prepararon en PBS y se esterilizaron filtrando a través de un filtro de 0,2 micrómetros. Los oligonucleótidos se disolvieron en 0,9% de PBS para inyección.

Los ratones macho de ocho semanas se dividieron en tres grupos de tratamiento. Un grupo de 6 ratones recibió inyecciones subcutáneas de compuesto Y a una dosis de 15 mg/kg/semana durante 6 semanas. Un grupo de 4 ratones recibió inyecciones subcutáneas del oligonucleótido de control ISIS 141923 a una dosis de 15 mg/kg/semana durante 6 semanas. Un grupo de 5 ratones recibió inyecciones subcutáneas de PBS durante 6 semanas.

Niveles de Colesterol y Triglicéridos

Los triglicéridos y colesterol en plasma se extrajeron por el método de Bligh y Dyer (Bligh, EG y Dyer, W.J. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917, 1959) y se midieron con un kit de triglicéridos comercialmente disponible

(DCL Triglyceride Reagent; Diagnostic Chemicals Ltd.).

Los resultados de los análisis de colesterol y triglicéridos en los ratones se presentan en la Tabla 11, y se expresan en mg/dl. Los niveles de colesterol y triglicéridos en el grupo de tratamiento se redujeron significativamente en comparación con el grupo de control. Una disminución en los niveles de colesterol y TG es un efecto beneficioso cardiovascular de la inhibición antisentido de ApoCIII y puede ser beneficioso para animales con, o en riesgo de, enfermedades dislipidémicas.

Tabla 11

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los niveles de colesterol y triglicéridos (mg/dl) en ratones transgénicos		
	Colesterol Total	Triglicéridos
PBS	2188	641
Compuesto Y	1402	170

Depuración de HDL

Los ratones de todos los grupos se inyectaron a través de la vena de la cola con 1×10^6 dpm de éter de ^3H -colesterilo (^3H -CEth)-HDL etiquetado. El éter de colesterilo radiomarcado es estructuralmente similar al colesterol, pero quedará atrapado en los tejidos que lo absorben. Por lo tanto, la depuración del éter de colesterilo radiomarcado del plasma y su acumulación en el hígado puede usarse para evaluar los efectos sobre el transporte de colesterol inverso. Se recogieron muestras de plasma al de 5 min, 1,5 h, 3 h, 6 h y 24 h después de la inyección y se contó la radioactividad usando un contador de centelleo líquido. A las 24 horas, los ratones se sacrificaron y se recogió el hígado. Las muestras de hígado se extrajeron en cloroformo/metanol 2:1 y el extracto se sometió a un proceso de soplado bajo gas de nitrógeno, se solubilizó en un cóctel de centelleo y se contó usando el mismo contador de centelleo líquido.

La disminución del radiomarcado, como se presenta en la Tabla 12, está asociada con la depuración de HDL-Ceth del plasma. Los resultados indican que el tratamiento con el Compuesto Y lleva a una tasa aumentada de depuración de colesterol HDL del plasma. Esto se asoció con la mayor acumulación de éterina de colesteril radiomarcada en el hígado de ratones tratados con Compuesto Y, como se presenta en la Tabla 13. Por lo tanto, los datos indican que la inhibición de ApoCIII en estos ratones transgénicos mejora el transporte de colesterol inverso y, por lo tanto, tendría un efecto beneficioso en pacientes con enfermedad cardiovascular, como pacientes con una enfermedad dislipidémica.

Tabla 12

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre el colesterol HDL en plasma (% de recuento a las 0 h) en ratones transgénicos				
	1.5 hr	3 hr	6 hr	24 hr
PBS	87	79	64	38
ISIS 141923	84	82	69	39
Compuesto Y	78	71	57	25

Tabla 13

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre la absorción hepática de CEth radiomarcado en ratones transgénicos	
	% de Incremento (dpm/g tejido hepático)
ISIS 141923	0
Compuesto Y	14

Ejemplo 5: Comparación del efecto de la inhibición antisentido de ApoCIII humana en ratones C57BL/6 con un modelo de ratón knockout de ApoCIII

Se obtuvieron ratones knockout ApoCIII de Jackson Laboratories (número de serie 002057) y se

compararon con ratones C57BL/6 tratados con oligonucleótidos antisentido de ApoCIII. Se usó en este estudio el compuesto Z, con un motivo gapmer 5-10-5 MOE y que dirigido a una secuencia de ApoCIII de roedor (número de acceso de GenBank NM_023114.3, SEQ ID NO: 5).

5 *Tratamientos de oligonucleótidos antisentido*

Se mantuvieron ratones C57BL/6 en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se alimentaron con una dieta rica en grasas (comida de laboratorio Harland Teklad # 88137) durante una semana. Los oligonucleótidos antisentido (ASO) se prepararon en PBS y se esterilizaron filtrando a través de un filtro de 0,2 micrómetros. Los oligonucleótidos se disolvieron en 0,9% de PBS para inyección. Los ratones se aleatorizaron en base a los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma totales en grupos de 6-8 ratones cada uno. Tres grupos de ratones C57BL/6 recibieron inyecciones intraperitoneales semanales del Compuesto Z a dosis de 3,1 mg/kg, 6,3 mg/kg o 12,5 mg/kg durante un período de 6 semanas. Un grupo de ratones C57BL/6 recibió inyecciones intraperitoneales semanales de PBS durante un período de 6 semanas. El grupo de PBS sirvió como control con el que se compararon los grupos tratados con oligonucleótidos y los ratones knockout ApoCIII.

Dos días después de la dosis final, se sacrificaron los ratones y se recogieron los órganos. También se probaron grupos similares de ratones alimentados con un alimento murino normal.

20 *Triglicéridos del hígado*

Los triglicéridos del hígado se obtuvieron con un analizador clínico Olympus (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los datos se presentan en la Tabla 14 y demuestran que los ratones tratados con un oligonucleótido antisentido ApoCIII tienen un fenotipo diferente que los ratones knockout ApoCIII. Los ratones tratados con dosis altas de oligonucleótidos antisentido ApoCIII tenían niveles de triglicéridos en el hígado similares a los del control con PBS. Los niveles de triglicéridos en el hígado en los ratones knockout ApoCIII fueron significativamente mayores que en los ratones C57BL/6 tratados con un oligonucleótido antisentido ApoCIII o el control PBS. Por lo tanto, la inhibición antisentido de ApoCIII tuvo el efecto beneficioso de disminuir el riesgo de esteatosis hepática en comparación con el modelo de ratón knockout ApoCIII.

Tabla 14

Niveles de triglicéridos del hígado (mg/g de tejido hepático)		
	Dosis (mg/kg)	Alimentado con dieta rica en grasas
PBS	-	33
Compuesto Z	3.1	44
	6.3	47
	12.5	33
ApoCIII KO	-	60

Ejemplo 6: Efecto de la inhibición antisentido *in vivo* de ApoCIII en ratones C57BL/6

Se evaluó el efecto de la inhibición antisentido de ApoCIII sobre los niveles de lípidos en plasma y la depuración de grasa.

Tratamiento

Se mantuvieron ratones C57/BL6 macho en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se les alimentó *ad libitum* con una dieta occidental (Harland Tekland 88137). Los animales se aclimataron durante por lo menos 7 días en la instalación de investigación antes del inicio del experimento. Los oligonucleótidos antisentido (ASO) se prepararon en PBS y se esterilizaron filtrando a través de un filtro de 0,2 micrómetros. Los oligonucleótidos se disolvieron en 0,9% de PBS para inyección.

Grupos de 7-8 ratones cada uno recibieron inyecciones intraperitoneales de Compuesto Z a una dosis de 12,5 mg/kg/semana durante 6 semanas. Otro grupo de ratones recibió inyecciones intraperitoneales del oligonucleótido de control ISIS 141923 a una dosis de 12,5 mg/kg/semana durante 6 semanas. Un tercer grupo de ratones recibió inyecciones intraperitoneales de PBS durante 6 semanas. Dos días después de la dosis final, los ratones se mantuvieron en ayunas durante 4 horas, se sacrificaron y se recogieron plasma y tejidos.

Inhibición del ARNm de ApoCIII

El ARN total se extrajo del hígado y del intestino delgado y se cuantificó el ARNm de ApoCIII por RT-PCR usando un conjunto de sonda de cebador ApoCIII y se normalizó a ciclofilina. Los resultados se presentan en la Tabla 15, expresada como porcentaje de inhibición del ARNm de ApoCIII en comparación con el control de PBS. El ISIS 141923 no provocó ninguna reducción en los niveles de ARNm de ApoCIII, como se esperaba. Los datos demostraron la inhibición significativa del ARNm de ApoCIII en el hígado y el intestino delgado por el Compuesto Z en comparación con el control de PBS.

La inhibición de la expresión intestinal de ApoCIII podría ser importante en la prevención de la quilomicronemia (Chait et al., 1992, Adv Intern Med. 1992, 37: 249-73), un estado dislipidémico provocado por la depuración inadecuada de triglicéridos de quilomicrones. Las formas graves de quilomicronemia pueden provocar pancreatitis, una afección potencialmente mortal. Inhibiendo la ApoCIII intestinal, se reduciría la inhibición de la lipoproteína lipasa y se mejoraría la depuración de triglicéridos de quilomicrones, evitando de esta manera la pancreatitis. Adicionalmente, la inhibición de la ApoCIII intestinal mejoraría la depuración de los triglicéridos posprandiales, disminuyendo de este modo la TG posprandial, un factor de riesgo conocido para enfermedad coronaria.

Tabla 15

Porcentaje de inhibición del ARNm de ApoCIII en relación con el control de PBS	
	% de inhibición
Higado	74
Intestino Delgado	13

Niveles de colesterol y triglicéridos

El colesterol en plasma se extrajo por el método de Bligh y Dyer (Bligh, EG y Dyer, W.J. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917, 1959) y se midió con un analizador clínico Olympus (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). El colesterol HDL y no HDL se midieron individualmente por HPLC. Los niveles de triglicéridos se midieron con el uso de un kit de triglicéridos comercialmente disponible (DCL Triglyceride Reagent, Diagnostic Chemicals Ltd., Charlottetown, Canadá). Los resultados se presentan en la Tabla 16 y se expresan en mg/dl. El tratamiento con el Compuesto Z dio como resultado una reducción significativa de los niveles de colesterol total, colesterol no HDL y triglicéridos en plasma en comparación con el control con PBS. Una disminución en los niveles de colesterol total, colesterol no HDL y dTG es un efecto beneficioso cardiovascular de la inhibición antisentido de ApoCIII y puede ser beneficioso para animales con, o con riesgo de, enfermedades dislipidémicas.

Tabla 16

Niveles de colesterol y triglicéridos en plasma (mg/dl) en ratones C56BL/6						
Tratamiento	Dosis (mg/kg/sem)	Colesterol Total	Colesterol HDL	Colesterol LDL	Colesterol VLDL	Trigliceridos
PBS	-	93	70	20	2.9	84
ISIS 141923	12.5	97	78	19	2.1	82
Compuesto Z	12.5	95	75	17	3.1	70

Depuración de grasas

Se recogieron muestras de plasma al de 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas y 4 horas después de la inyección y se midió el contenido total de lípidos en plasma con un analizador clínico Olympus (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). El nivel de lípidos en el plasma como se presenta en la Tabla 17 era un indicador inverso de la depuración de lípidos del plasma. Los resultados indican que el tratamiento con el Compuesto Z lleva a una velocidad aumentada de depuración de grasa del plasma.

Por lo tanto, los datos indican que la inhibición de ApoCIII en estos ratones transgénicos mejora el transporte de colesterol inverso, y tendría un efecto beneficioso en pacientes con enfermedad cardiovascular.

Tabla 17

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los lípidos en plasma (mg/dl) en ratones C57BL/6							
	0 hr	0.5 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	Area bajo la curva
PBS	86	80	64	122	118	90	23631
ISIS 141923	115	142	124	236	225	150	43677
Compuesto Z	66	55	96	156	151	101	28371

Ejemplo 7: Efecto de la inhibición antisentido *in vivo* de ApoCIII en ratones C57BL/6

Se evaluó el efecto de la inhibición antisentido de ApoCIII sobre los niveles de expresión de ApoCIII y la depuración de grasa.

Tratamiento

Se mantuvieron ratones C57/BL6 macho en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se les alimentó *ad libitum* con una dieta occidental (Harland Tekland 88137). Los animales se aclimataron durante por lo menos 7 días en la instalación de investigación antes del inicio del experimento. Los oligonucleótidos antisentido (ASO) se prepararon en PBS y se esterilizaron filtrando a través de un filtro de 0,2 micrómetros. Los oligonucleótidos se disolvieron en 0,9% de PBS para inyección.

Grupos de 5 ratones cada uno recibieron inyecciones intraperitoneales de un oligonucleótido antisentido dirigido a ApoCIII, Compuesto Z, a una dosis de 12,5 mg/kg/semana durante 6 semanas. Otro grupo de ratones recibió inyecciones intraperitoneales del oligonucleótido de control ISIS 141923 a una dosis de 12,5 mg/kg/semana durante 6 semanas. Dos días después de la dosis final, los ratones se dejaron en ayunas durante la noche, y se administró un bolo de 200 µl de aceite de oliva por sonda oral. Después del bolo, se midieron los niveles de triglicéridos en plasma a intervalos regulares durante 4 horas. Los ratones se sacrificaron y se recogieron plasma y tejidos.

Inhibición del ARNm de ApoCIII

Se extrajo ARN total del hígado y del intestino delgado y el ARNm de ApoCIII se cuantificó por RT-PCR usando un conjunto de sonda de cebador ApoCIII y se normalizó a ciclofilina. Los resultados se presentan en la Tabla 18, expresada como porcentaje de inhibición del ARNm de ApoCIII en comparación con el control de oligonucleótidos. Los datos demostraron la inhibición significativa de ARNm de ApoCIII en el hígado y el intestino delgado por el Compuesto Z en comparación con el control de oligonucleótidos.

Como se observa en otra parte de la presente, la inhibición de la expresión de ApoCIII intestinal podría ser importante en la prevención de la quilomicronemia (Chait et al., 1992, Adv. Intern Med. 1992, 37: 249-73), un estado dislipidémico provocado por la depuración inadecuada de triglicéridos de quilomicrones. Las formas graves de quilomicronemia pueden provocar pancreatitis, una afección potencialmente mortal. Al inhibir la ApoCIII intestinal, se reduciría la inhibición de la lipoproteína lipasa y se mejoraría la depuración de triglicéridos de quilomicrones, evitando de este modo la pancreatitis. Además, la inhibición de la ApoCIII intestinal mejoraría el depuración de los triglicéridos posprandiales, disminuyendo de ese modo la TG posprandial, un factor de riesgo conocido de enfermedad coronaria.

Tabla 18

Porcentaje de inhibición del ARNm de ApoCIII en relación con el control de ratones C57/BL/6 tratados con oligonucleótidos		
Raza de ratones		% de inhibición
C57BL/6	Hígado	74
	Intestino Delgado	60

Depuración de grasas

Se recogieron muestras de plasma al de 0 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min y 240 min después de la inyección y se midieron las concentraciones de triglicéridos en plasma con un analizador clínico Olympus (Hitachi

Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados indican que el tratamiento con el Compuesto Z lleva a una tasa aumentada de eliminación de triglicéridos del plasma.

Este estudio se puede comparar con los ensayos clínicos de bolos de grasa en los que los pacientes que expresan niveles de apo-CIII elevados mostraron concentraciones de TG postprandiales elevadas (Petersen K.F. et al., N Engl J Med 2010; 362: 1082-1089).

Tabla 19

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre TG plasmáticos posprandiales (mg/dl en ratones C57BL/6)							
Raza de ratones		0 min	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min
C57BL/6	ISIS 141923	115	142	124	236	225	150
	Compuesto Z	66	55	96	156	151	101

Ejemplo 8: Efecto de la inhibición antisentido *in vivo* de ApoCIII en ratones C57BL/6

Se evaluó el efecto de la inhibición antisentido de ApoCIII sobre el depuración de grasa.

Tratamiento

Se mantuvieron ratones C57/BL6 machos en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se les alimentó *ad libitum* con una dieta occidental (Harland Tekland 88137). Los animales se aclimataron durante por lo menos 7 días en la instalación de investigación antes del inicio del experimento. Los oligonucleótidos antisentido (ASO) se prepararon en PBS y se esterilizaron filtrando a través de un filtro de 0,2 micrómetros. Los oligonucleótidos se disolvieron en 0,9% de PBS para inyección.

Grupos de 6 ratones cada uno recibieron inyecciones intraperitoneales de un oligonucleótido antisentido dirigido a ApoCIII, Compuesto Y o Compuesto Z, a una dosis de 12,5 mg/kg/semana, 6,3 mg/kg/semana o 3,1 mg/kg/semana durante 6 semanas. Otro grupo de ratones recibió inyecciones intraperitoneales del oligonucleótido de control ISIS 141923 a una dosis de 12,5 mg/kg/semana durante 6 semanas. Otro grupo de ratones recibió inyecciones intraperitoneales de PBS durante 6 semanas. Dos días después de la dosis final, los ratones se dejaron en ayunas durante la noche, y se administró un bolo de 200 µl de aceite de oliva por sonda oral. Después del bolo, se midieron los niveles de triglicéridos en plasma a intervalos regulares durante 4 horas.

Depuración de grasas

Se recogieron muestras de plasma al de 0 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min y 240 min después de la inyección y se midieron las concentraciones de triglicéridos en plasma con un analizador clínico Olympus (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados indican que el tratamiento con el Compuesto Y y el Compuesto Z lleva a una velocidad aumentada de depuración de grasas del plasma. N.d indica que el conjunto de datos no se calculó.

Este estudio se puede comparar con estudios clínicos de bolos de grasa en los que los pacientes que expresaban niveles altos de apo-CIII mostraron concentraciones de TG postprandiales elevadas (Petersen K.F. et al., N Engl J Med 2010; 362: 1082-1089).

Tabla 20

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre TG plasmáticos posprandiales (mg/dl) en ratones C57BL/6							
	Dosis (mg/kg/sem)	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min
PBS	-	79	104	118	126	113	116
ISIS 141923	12.5	75	100	116	150	138	133
Compuesto Y	12.5	79	74	103	117	120	96
	6.3	64	70	81	94	120	112
	3.1	91	85	106	139	164	133
Compuesto Z	12.5	73	65	84	118	94	76
	6.3	70	73	89	117	120	89
	3.1	86	98	143	137	152	128

Ejemplo 9: Efecto de oligonucleótidos antisentido ISIS dirigidos a ApoCIII humana en modelo de mono de hipertrigliceridemia

Se trataron monos Rhesus mantenidos con una dieta alta en fructosa con ISIS 304801. Se evaluaron la eficacia y tolerabilidad de los oligonucleótidos antisentido, así como el efecto farmacológico.

Tratamiento

Los monos eran de 2-4 años de edad y pesaban entre 2 y 5 kg. Los monos fueron asignados a seis grupos de cinco monos rhesus cada uno asignados al azar. Se proporcionaron aproximadamente 60 g de dieta (Dieta de Primates Certificada N° 5048, PMI Nutrition International, Inc.) a cada mono en los grupos 1-4 dos veces al día. Se suministró un suplemento de fructosa apropiado (es decir, aproximadamente 15% de mezcla Kool Aid®) a la mañana durante 16 semanas antes de la dosificación de oligonucleótidos antisentido. Para confirmar aumentos suficientes del nivel de triglicéridos, se recogieron muestras de sangre para la química del suero de todos los animales 1-2 semanas antes de la dosificación.

Los grupos de monos se inyectaron por vía subcutánea con oligonucleótido ISIS o PBS usando una aguja de dosificación de acero inoxidable y una jeringuilla de tamaño apropiado en uno de los 4 sitios en la espalda de los monos; cada sitio usándose por dosis en forma de reloj. Algunos de los grupos se dosificaron tres veces por semana durante la primera semana (días 1, 3 y 5) como dosis de carga, y posteriormente dos veces a la semana durante 2-12 semanas, con 5 mg/kg, 10 mg/kg o 20 mg/kg de ISIS 304801. Dos grupos de control de 5 monos rhesus cada uno fueron inyectados con PBS por vía subcutánea tres veces a la semana durante la primera semana (Días 1, 3 y 5) y posteriormente dos veces por semana durante 2-12 semanas. El cuadro de dosificación se muestra en la Tabla 21. Los monos de los Grupos 1-4 se sacrificaron el Día 86.

Se administró un desafío rico en grasas adicional a los monos de los Grupos 5 y 6 en forma de un batido de leche batida. El batido de leche se estandarizó para consistir de 782 calorías por m² de superficie corporal con 77,6% de calorías de grasa, 19,2% de carbohidratos y 3,1% de proteínas. Los monos de los grupos 5 y 6 se dejaron en ayunas durante la noche y el batido de leche se administró una vez en el día 84 a través de un tubo gástrico. Se extrajo sangre justo antes (tiempo = 0 horas) y 1, 2, 3, 4 y 6 horas después de la ingestión de la carga de grasa para evaluar la excursión de triglicéridos. Los monos estaban descansados y, por lo demás permanecieron en ayunas durante las 6 horas posteriores al desafío de grasas. Los monos de este grupo fueron sacrificados el día 87.

Tabla 21

Grupos de monos rhesus con una dieta alta en fructosa				
Grupo	Artículo de Prueba	Dosis semanal (mg/kg/sem.)	Sexo	Nº de Animales
<i>Grupos toxicológicos</i>				
1	PBS	0	Macho	5
2	ISIS 304801	10	Macho	5
3	ISIS 304801	20	Macho	5
4	ISIS 304801	40	Macho	5
<i>Grupos de Prueba de Desafío Rico en Grasas</i>				
5 6	PBS	0	Macho	5
	ISIS 304801	40	Macho	5

Reducción de objetivo hepático25 *Análisis de ARN*

Se recogieron aproximadamente 150 mg de hígado de los Grupos 1-4 para el análisis de ARNm de ApoCIII en el sacrificio. El hígado se dividió en 2 piezas y se empapó en dos tubos que contenían tampón RLT con 1% de beta-mercaptoetanol. Los tejidos se homogeneizaron y se cuantificó la expresión de ApoCIII por análisis RT-PCR. Como se muestra en la Tabla 22, el tratamiento con ISIS 304801 dio como resultado una reducción significativa del ARNm de ApoCIII en comparación con el control de PBS.

Tabla 22

Porcentaje de inhibición de ARNm de ApoCIII en el hígado de mono rhesus en relación con el control de PBS		
Grupos	Dosis (mg/kg/semana)	% de inhibición
2	10	68
3	20	78
4	40	83

45 *Análisis de proteínas*

Se recogieron aproximadamente 1,5 ml de sangre de todos los animales de estudio en los grupos 1-4 y se colocaron en tubos que contenían K₂-EDTA y luego se centrifugaron para separación del plasma. Los niveles de proteína ApoCIII se cuantificaron en un analizador clínico usando un ensayo turbidométrico disponible comercialmente (Kamiya Biomedical Co., Seattle, WA). Como se muestra en la Tabla 23, el tratamiento con ISIS 304801 dio como resultado una reducción significativa de los niveles de proteína ApoCIII en comparación con el control de PBS. También se analizó la cinética de reducción del nivel de proteína ApoCIII y se presenta en la Tabla 24.

Tabla 23

Porcentaje de inhibición de los niveles de proteína en plasma de ApoCIII en el mono rhesus en relación con el control de PBS		
Grupos	Dosis (mg/kg/semana)	% de inhibición
2	10	74
3	20	72
4	40	89

Tabla 24

Niveles de proteína en plasma ApoCIII (mg/dl) en días diferentes en el mono rhesus en relación con el control de PBS					
Grupos	Dosis (mg/kg/sem)	Día -7	Día 16	Día 30	Día 86
1	-	4.0	5.5	3.8	5.7
2	10	4.8	3.2	0.2	1.5
3	20	4.5	3.8	0.9	1.6
4	40	5.2	2.9	0.0	0.6

Análisis de partículas de lipoproteínas

Para establecer la cinética de la supresión de ApoCIII en plasma, se recogieron muestras de plasma 7 días antes del comienzo de la dosificación, así como en los días 16, 30 y 86 del período de dosificación. Las muestras se sometieron a análisis de partículas de lipoproteínas NMR (Liposcience, Raleigh, NC). Como no hubo diferencias significativas en la disminución de ApoCIII entre los grupos de tratamiento (Grupos 2-4), se presentan solo los análisis del Grupo 2 (grupo de tratamiento que recibió 10 mg/kg/semana). Los datos se presentan en las Tablas 25 y 26.

Se observaron cambios medios estadísticamente significativos desde el valor inicial en los triglicéridos totales en plasma (TG) y en VLDL y TG de quilomicrones del grupo de tratamiento en el día 30. Al mismo tiempo, los monos control demostraron aumentos medios en los mismos parámetros. El tratamiento sostenido con ISIS 304801 en estos monos alimentados con fructosa llevó a incrementos dependientes del tiempo en el número de partículas de colesterol HDL de aproximadamente 8 $\mu\text{mol/l}$ (Tabla 27) y no produjo elevaciones en el colesterol LDL en estos estudios (Tabla 28). No hubo cambios significativos en la cantidad de partículas de colesterol LDL durante el período de tratamiento de 12 semanas, en relación con el grupo control PBS.

En el momento del sacrificio, se extrajeron los hígados usando el método de extracción Bligh y Dyer (Bligh EG y Dyer W.J.. Can J Biochem Physiol 1959; 37: 911-917) y se cuantificaron usando un ensayo de TG colorimétrico Wako. La inhibición antisentido de ApoCIII no aumentó la acumulación de TG hepática en ninguno de los grupos de tratamiento en relación con el grupo de control de PBS (Tabla 29).

Tabla 25

Cambio del el TG (mg/dl) en plasma de valor inicial en días diferentes en el mono rhesus					
	Dosis (mg/kg/sem)	Día -7	Día 16	Día 30	Día 86
PBS	-	0	18	23	27
ISIS 304801	10	0	-22	-32	-27

Tabla 26

Cambio del VLDL y TG de quilomicrones de valor inicial (mg/dl) en días diferentes en el mono rhesus					
	Dosis (mg/kg/sem)	Día -7	Día 16	Día 30	Día 86
PBS	-	0	17	22	28
ISIS 304801	10	0	-22	-31	-26

Tabla 27

Cambio de las partículas de colesterol HDL de valor inicial (mmol/l) en días diferentes en el mono rhesus					
	Dosis (mg/kg/sem)	Día -7	Día 16	Día 30	Día 86
PBS	-	0.3	-5.6	-3.5	-8.1
ISIS 304801	10	0.0	0.5	9.7	8.0

Tabla 28

Partículas de colesterol LDL totales (nmol/l) en días diferentes en el mono rhesus					
	Dosis (mg/kg/sem)	Día -7	Día 16	Día 30	Día 86
PBS	-	982	928	1005	1184
ISIS 304801	10	1007	938	781	910

Tabla 29

Contenido de triglicéridos hepáticos en cohortes de PBS de control y ISIS 304801 después de 12 semanas en monos rhesus HTG	
TG hepáticos(ug/mg)	Media
PBS	9
10mg/kg/sem	16
20mg/kg/sem	18
40mg/kg/sem	6

Depuración de TG en plasma posprandial

A las 10 semanas, se midieron los niveles de TG en plasma posprandiales en monos del grupo de 10 mg/kg/semana (Grupo 2) a las 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, y 4 h después de proporcionar una comida a los monos. Como se muestra en las Tablas 30 y 31, la depuración de TG plasmático posprandial se incrementó significativamente, como lo muestra la disminución del 38% en el área bajo la curva (AUC)de TG postprandial en monos del grupo de 10 mg/kg/semana.

La depuración de TG postprandial también se evaluó en los grupos 5 y 6 (el control de PBS y el grupo de 40 mg/kg/semana después de un desafío con grasas) a las 12 semanas. Los datos se presentan en la Tabla 32, y también indica una disminución significativa en el área bajo la curva (AUC) de TG postprandial en monos de ese grupo en comparación con el control.

Tabla 30

TG en plasma (mg/dl) en el mono rhesus						
	Dosis (mg/kg/sem)	0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
PBS	-	167	169	146	147	131
ISIS 304801	10	105	87	95	102	80

Tabla 31

Área bajo la curva (AUC) de TG posprandial en el mono rhesus	
	AUC
PBS	610
ISIS 304801	376

Tabla 32

Área bajo la curva (AUC) de TG posprandial en el mono rhesus después del desafío de grasas	
	AUC
PBS	613
ISIS 304801	405

Los monos en el grupo de 10 mg/kg/semana tuvieron niveles más bajos de TG en plasma en ayunas que el grupo de PBS a las 10 semanas. Los resultados en primates no humanos demuestran que la inhibición antisentido de ApoCIII representa una estrategia terapéutica atractiva para reducir los TG y VLDL en plasma en individuos dislipémicos, y el tratamiento puede elevar concurrentemente los niveles de HDL-C sin efectos adversos sobre LDL-C.

Ejemplo 10: Ensayo clínico Fase I de ISIS 304801

En un estudio de Fase 1 doble ciego, de dosis única y múltiple ascendente (SAD y MAD), los sujetos sanos, de 18 a 55 años, fueron asignados aleatoriamente en una proporción de 3:1 para recibir ISIS 304801 o placebo (solución salina normal).

A los sujetos con SAD se les administró una única inyección subcutánea (SC) de 50, 100, 200 ó 400 mg (n=4/cohorte) en el Centro de Estudio. Los sujetos regresaron al Centro de Estudio para una visita ambulatoria en los días 4 y 8 (ventana de ± 24 horas) para muestreo de sangre y evaluación clínica. Los sujetos fueron seguidos hasta el Día 15 cuando fueron evaluados mediante una entrevista telefónica.

A los sujetos MAD se les administraron múltiples inyecciones SC a 50, 100, 200 y 400 mg en el Centro de Estudio. Los sujetos recibieron un régimen de carga de 3 dosis la primera semana (Días 1, 3 y 5) seguido por una dosificación semanal durante 3 semanas (Días 8, 15 y 22). Los sujetos fueron seguidos durante 8 semanas después de su última dosis del fármaco del estudio. Los sujetos regresaron al Centro de Estudio para una visita ambulatoria los Días 29, 36 y 50 (ventana de ± 24 horas) para evaluaciones de seguridad y laboratorio clínico y para muestreo de sangre para análisis PK. Los sujetos fueron seguidos hasta el Día 78 (ventana de ± 7 días) cuando fueron evaluados mediante una entrevista telefónica.

Los sujetos MAD permanecieron en el Centro de estudio desde los días -1 a 6 y los días 22 a 23, donde se les proporcionó la dieta mostrada en la Tabla 33. Los sujetos ayunaron durante por lo menos 12 horas antes de que se tomaran muestras de sangre para evaluación en los Días 5, 8, 15, 22, 23, 29, 36, 43 y 50 (ventana de ± 24 horas).

Tabla 33

Dieta del Paciente en el Centro de Estudio		
Día de Estudio	Ración Servida	Descripción del alimento
5 10	525 ml.	• fideos tailandeses con carne de vaca y vegetales mixtos, brócoli, brotes de frijol, pimientos verdes y rojos
	375 ml. 300 ml.	• Ensalada de fruta fresca • Zumo de naranja
15	1 250 ml.	• Torta de herradura • 2% de Leche
	1 2 250 ml. 300 ml.	• Croissant de mantequilla • Huevos revueltos • Melocotones en rodajas con almíbar • Zumo de naranja
20 25	75 g. 1.5 copa 1-paquete Pequeña Acompañamiento 355 ml.	• Pechuga de pollo a la parrilla [sándwich] en panecillo Kaiser • Crema de Sopa de Champiñones • Crackers • Ensalada Condimentos • Ginger Ale
	75 g. 250 ml. 375 ml. Acompañamiento Acompañamiento 300 ml.	• Carne Asada • Puré de Patata • Macedonia de Verduras • Salsa • Pan de Ajo • Zumo de manzana
30 35	1 250 ml.	• Muffin de zanahoria • 2% de leche
	3 Acompañamiento 1 300 ml.	• Panqueques • Almíbar • Banana • Zumo de naranja
40 45	9" Acompañamiento	• Pollo con mezquite, Pollo, bacon, queso cheddar, tomate, cebolla roja, y lechuga en pan de trigo integral • Aderezo de rancho
	Copa 1-paquete 355 ml.	• Sopa de Brócoli y queso • Crackers • Ginger ale
50	Día 2	

55

60

65

ES 2 663 635 T3

(continuación)

Dieta del Paciente en el Centro de Estudio		
Día de Estudio	Ración Servida	Descripción del Alimento
5	375 g.	<ul style="list-style-type: none"> • Salteado de carne y verduras mixtas, brócoli, zanahorias, apio y cebollas
10	150 g. 1-paquete. 300 ml.	<ul style="list-style-type: none"> • Arroz al vapor • Pasas • Zumo de manzana
	250 ml. 300 ml.	<ul style="list-style-type: none"> • Ensalada de fruta fresca • Zumo de arándanos
15	Med. 300 ml.	<ul style="list-style-type: none"> • Tortilla de queso y verduras en bagel de trigo integral • Zumo de uvas
20	9" Acompañamiento Copa 1-paquete. 355 ml.	<ul style="list-style-type: none"> • Filete Black Angus, mozzarella, queso cheddar, cebolla salteada & champiñones en pan de queso • Mostaza de Miel Bourbon, Salsa Zesty Grille • Sopa de fideos con pollo • Crackers • Ginger ale
25	400 g.	<ul style="list-style-type: none"> • Pechuga de Pollo a la barbacoa, Verduras, cocido mixto, coliflor, zanahorias, pimientos rojos y verdes, judías verdes
30	1.5 copas 1-paquete. 300 ml.	<ul style="list-style-type: none"> • Arroz aromatizado • Uvas • Zumo de manzana
	1 250 ml.	<ul style="list-style-type: none"> • Galleta de avena con pasas • 2% de leche
35	1 250 ml. 300 ml.	<ul style="list-style-type: none"> • Croissant de queso • Melocotón en rodajas en almíbar • Zumo de naranja
40	2 Acompañamiento Copa 1-paquete. 355 ml.	<ul style="list-style-type: none"> • Pan plano Sammie, con pollo, b�acon, cheddar, tomate y lechuga romana • Aderezo ranchero de leche agria • Sopa de brocoli y queso • Crackers • Ginger ale
45		
50	425 g. 325 g. 1 paquete 250 ml. 300 ml.	<ul style="list-style-type: none"> • Estofado de ternera, tacos de carne tiernos, con zanahorias, cebollas y patatas • Ensalada tailandesa, con lechuga romana, pasta y aderezos • Pan italiano • Peras en rodajas en almíbar • Zumo de manzana
55	1 250 ml.	<ul style="list-style-type: none"> • Muffin de ar�ndanos • 2% de leche
60	375 ml. Med. 250 ml. 300 ml.	<ul style="list-style-type: none"> • Copos de maíz • Banana • 2% de leche • Zumo de manzana
65	6 piezas. 250 ml. 250 ml.	<ul style="list-style-type: none"> • Alitas de pollo • Arroz frito • Verduras cocidas mixtas, judías verdes, zanahorias y pimientos rojos con salsa de tomate secada al sol

(continuación)

Dieta del Paciente en el Centro de Estudio				
Día de Estudio	Ración Servida	Descripción del Alimento		
5 10	Día 5	355	<ul style="list-style-type: none"> 7-up 	
	6" Pizza Pequeña	355 ml.	<ul style="list-style-type: none"> Pizza Pepperoni lovers una porción doble de Pizza deli estilo pepperoni & 100% Mozzarella Ensalada Ginger Ale 	
	1	250 ml.	<ul style="list-style-type: none"> Croissant de almendras 2% de Leche 	
15	Día 6 [Descarga]	45 g. 300 ml.	<ul style="list-style-type: none"> Bagel con queso en crema Zumo de naranja 	
20 25 30 35	Día 22	450 g. 2 rodajas 300 ml.	<ul style="list-style-type: none"> Tortita de espinacas de desayuno y queso feta Tostada Marrón Zumo de naranja 	
		9" Acompañamiento Copa	<ul style="list-style-type: none"> Filete de costilla de Zesty Grille Steak Prime, mozzarella, cheddar, champiñones, cebolla salteada, en pan de queso Mostaza con miel y Bourbon, Salsa Zesty Grille Brocoli y sopa de queso Crackers Ginger Ale 	
		400 g. 1.5 copas Pequeña	300	<ul style="list-style-type: none"> Pechuga de Pollo con Verduras a la plancha Arroz aromatizado Ensalada de fruta fresca Zumo de manzana
		1	250 ml.	<ul style="list-style-type: none"> Galleta de avena con pasas 2% de Leche
40	Día 23 [Descarga]	45 g. 300 ml.	<ul style="list-style-type: none"> Croissant de mantequilla Zumo de naranja 	

Resultados

En general, el ISIS 304801 demostró un buen perfil de seguridad y fue bien tolerado en todos los sujetos sin elevaciones clínicamente significativas de las enzimas transaminasas y sin eventos adversos significativos.

Las características del valor inicial de las cohortes MAD se muestran en la Tabla 34. Los sujetos MAD mostraron reducciones dependientes de la dosis sostenidas en los niveles totales de apoC-III y TG expresados como un cambio porcentual desde el valor inicial en las Tablas 35-36.

Tabla 34

Características de valor inicial de cohortes MAD					
	Placebo (n=4)	50 mg (n=3)	100 mg (n=3)	200 mg (n=3)	400 mg (n=3)
Género (M:F)	3:1	3:0	3:0	3:0	3:0
Edad (años)	43.0	40.0	40.0	43.0	40.0
BMI (kg/m ²)	27.7	24.0	27.3	28.0	27.5
Lípidos & Lipoproteínas, mg/dl					
Apo CIII	6.3	10.4	9.5	11.6	8.7
Triglicéridos	97	124	94	195	89
Colesterol Total	195	157	196	185	181

(continuación)

Características de valor inicial de cohortes MAD					
HDL-C	45	42	46	43	62
Non-HDL-C	136	118	150	149	126
LDL-C	112	93	131	95	102

Población por protocolo. Los valores presentados son medianos.

Tabla 35

Reducción prolongada dependiente de la dosis en ApoCIII en suero: % de cambio mediano en ApoCIII del valor inicial					
Día de Estudio	Placebo	50 mg	100 mg	200 mg	400 mg
Día 5	38.6	33.4	-4.5	-10.8	-42.6
Día 8	31.9	17.8	-5.2	-36.0	-78.6
Día 15	0.0	-22.1	-24.0	-54.1	-79.8
Día 22	11.7	-20.9	-21.0	-61.7	-86.4
Día 23	15.8	-15.6	-11.9	-58.7	-79.0
Día 29	-11.0	-19.7	-17.3	-70.5	-77.5
Día 36	1.9	-26.6	-32.1	-57.3	-69.5
Día 50	16.4	21.9	-3.9	-63.0	-78.6

Tabla 36

Reducciones dependientes de la dosis en triglicéridos: % de cambio mediano en triglicéridos del valor inicial					
Día de Estudio	Placebo	50 mg	100 mg	200 mg	400 mg
Día 5	78.5	50.0	15.9	-15.6	-7.7
Día 8	34.9	17.7	-24.5	-31.8	-38.5
Día 15	21.2	-27.4	-12.8	-50.8	-46.2
Día 22	12.2	-18.3	-9.8	-25.1	-53.8
Día 23	51.8	-4.0	1.1	-41.0	-44.2
Día 29	28.5	-19.5	-25.0	-43.1	-43.8
Día 36	15.4	-33.1	-34.8	-17.9	-36.5
Día 50	33.1	48.8	-23.9	-48.2	-48.1

El cambio mediano porcentual de los valores iniciales en los grupos de dosis múltiple de 50, 100, 200 y 400 mg mostró reducciones de apoC-III totales del 20, 17, 71 y 78% y de TG del 20, 25, 43 y 44%, respectivamente, una semana (Día 29) después de la última dosis. Las reducciones se mantuvieron durante por lo menos cuatro semanas después de la última dosis en los grupos con dosis más altas.

Los niveles de TG se dispararon en el día 5 y 23 para el grupo de placebo, coincidiendo con las estadias nocturnas de los sujetos en el Centro de Estudio. Se cree que la dieta proporcionada por el Centro de Estudio llevó al aumento en los niveles de TG en los sujetos que pasaron la noche en el Centro de Estudio. El ISIS 304801 disminuyó el pico de TG de una manera dependiente de la dosis. De una manera, los resultados mostrados en la presente, indican un efecto posprandial en los TG (aunque los niveles de TG fueron evaluados después de un ayuno de 12 horas) por el ISIS 304801 cuando un aumento repentino inducido por la dieta en los TG disminuyó de manera dependiente de la dosis por ISIS 304801.

Los valores de LDL-C no cambiaron (datos no mostrados) mientras que los valores de HDL-C tendieron a aumentar de una manera dependiente del tratamiento como se muestra en la Tabla 37.

5

Tabla 37

Sin efectos nocivos en HDL-C					
Día de Estudio	Placebo	50 mg	100 mg	200 mg	400 mg
Día 5	-5.9	7.7	-3.1	-3.2	-16.1
Día 8	2.1	2.4	0.0	-11.1	-2.9
Día 15	-2.8	4.8	10.9	4.7	-9.7
Día 22	-0.6	4.8	8.7	11.6	-2.0
Día 23	0.7	7.1	12.5	19.4	-1.6
Día 29	2.1	19.0	0.0	13.9	8.0
Día 36	0.0	23.8	8.8	13.9	1.6
Día 50	-4.8	16.7	5.9	25.0	14.5

10

15

20

25 **Ejemplo 11: Ensayo clínico de Fase II de ISIS 304801**

Se planificó un estudio de respuesta a la dosis, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, para evaluar los efectos farmacodinámicos de dosis/respuesta de ISIS 304801 frente a placebo en apoC-III en ayunas asociados con los niveles de VLDL. Los puntos finales adicionales para evaluar incluyen: los efectos farmacodinámicos de ISIS 304801 frente a placebo en ayunas apoC-III total, TG, apoC-II (total y asociado con VLDL), apolipoproteína B-100 (apoB-100), apolipoproteína A-1 (apoA-1), apolipoproteína A-2 (apoA-2), apolipoproteína E (apoE), colesterol total (TC), colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C), LDL-TG, VLDL-C, VLDL-TG, lipoproteína-colesterol no de alta densidad (no-HDL-C), no-HDL-TG, HDL-C, HDL-TG, quilomicrón-C (CM-C), CM-TG, ácidos grasos libres (AGL) y niveles de glicerol; las características y cinéticas de lípidos postprandiales, apolipoproteínas y lipoproteínas, y los niveles de glucosa en un subconjunto de los pacientes en el estudio y se evalúan una PK más extensa en otro subgrupo de pacientes (no serán los mismos pacientes que los sometidos a la evaluación posprandial); y, la seguridad, tolerabilidad y PK de ISIS 304801.

Para cada paciente, el período de participación consiste en un período de examen de ≤ 5 semanas (que incluye un período de calificación de ejecución de control ajustado de la dieta de 4 semanas), un período de calificación/evaluación de valores iniciales del estudio de 1 semana, un período de tratamiento de 13 semanas, y un período de evaluación posterior al tratamiento de 13 semanas, para un total de 32 semanas de participación en el estudio. Las medicaciones concomitantes y los eventos adversos (EA) se registrarán a lo largo de todos los períodos del estudio.

Los pacientes serán de por lo menos 18 años de edad y tendrán TG ≥ 500 mg/dl en ayunas durante el examen y los TG en ayunas ≥ 300 mg/dl y ≤ 2000 mg/dl después de 4 semanas de control de ejecución ajustado de la dieta.

Para este estudio están planificados setenta y dos (72) pacientes. Habrá 24 pacientes planificados por cohorte de dosis (100, 200, 300 mg) con 18 ISIS 304801 (activo) y 6 pacientes con placebo por cohorte. Los pacientes elegibles se inscribirán por igual (1:1) en un grupo PK no extenso/posprandial (Grupo 1) o en un grupo PK extenso/posprandial (Grupo 2). Los pacientes en el Grupo 2 serán aleatorizados por igual (1:1) a un grupo PK extenso (Grupo 2a) o un grupo de evaluación posprandial (Grupo 2b). Los pacientes del grupo 2a serán aleatorizados por igual (1:1:1) a 1 de las 3 cohortes de dosis (100, 200, 300 mg) y, dentro de cada cohorte de dosis, 5:1 para recibir activo o placebo. Los pacientes del grupo 2b se aleatorizarán por igual (1:1) a 1 de 2 cohortes de dosis (200, 300 mg) y, dentro de cada cohorte de dosis, 2:1 para recibir activo o placebo. Los pacientes del grupo 1 se aleatorizarán a cohortes de dosis y tratamiento de una manera que logre una aleatorización del estudio total de 1:1:1 para cohorte de dosis (100, 200, 300 mg) y 3:1 para tratamiento (activo, placebo).

Los pacientes serán colocados en una dieta estrictamente controlada (después de que se realicen los procedimientos de examen) durante la duración de la participación en el estudio. Después de 28 días con la dieta controlada, los pacientes tendrán valores iniciales y serán evaluados para calificación de la inscripción en la fase de tratamiento del estudio. Los pacientes que cumplan con los criterios de inscripción después de la ejecución de la dieta se inscribirán por igual (1:1) en un grupo PK no extenso/posprandial (Grupo 1) o en un grupo PK

65

extenso/posprandial (Grupo 2) y se aleatorizarán dentro de su asignación grupal.

Estudio de Fármacos y Tratamiento

5 Se proporcionará una solución de ISIS 304801 (200 mg/ml, 1,0 ml) contenida en viales de vidrio con tapón de 2 ml.

10 El placebo para este estudio será 0,9% de solución salina estéril. La solución de ISIS 304801 y el placebo se prepararán por un farmacéutico conocedor de las asignaciones (o un delegado calificado). Los viales son sólo para un único uso. Un profesional capacitado, desconocedor de la identidad del fármaco, administrará el Fármaco del Estudio. El Fármaco del Estudio se administrará como una inyección SC en el abdomen, el muslo o el área externa de la parte superior del brazo en cada día de la dosificación. Las dosis de 100 y 200 mg se administrarán como una única inyección SC. Las dosis de 300 mg se administrarán como dos inyecciones SC no contiguas de igual volumen.

15 Los pacientes recibirán 13 dosis de Fármaco del Estudio administrado por inyección SC una vez a la semana durante 13 semanas (Días 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 y 85).

20 Los pacientes completarán las visitas de tratamiento el Día 1 \pm 0 días y el Día 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 y 85 dentro de \pm 1 día. Los pacientes en el grupo de PK extenso también visitarán la clínica el Día 2 y 86 \pm 0 días en relación con el Día 1 y 85, respectivamente, para extracción de sangre de 24 horas. Los pacientes completarán las visitas de seguimiento el Día 92 y 99 dentro de \pm 1 día, el Día 127 dentro de \pm 3 días y el Día 176 dentro de \pm 5 días de la fecha de visita programada. Los pacientes en el grupo de evaluación posprandial también visitarán la clínica en el día 103 dentro de \pm 2 días y al día siguiente de la visita del día 103 para la extracción de sangre de 24 horas.

30 Antes de cada visita que incluya una extracción de sangre para mediciones farmacodinámicas (Días 8, 15, 29, 43, 57, 71 y 85), a los pacientes se les proporcionará una comida precocinada estandarizada para la cena la noche anterior a su visita (para asegurar la misma moderación de la ingesta de grasas, por paciente y por momento temporal) después de lo cual permanecerán en ayunas. No se permitirá el consumo de alcohol 48 horas antes de estas visitas a la clínica.

35 La sangre se recogerá para la medición de VLDL apoC-III y otros marcadores farmacodinámicos en los días 8, 15, 29, 43, 57, 71 y 85 (antes de la administración del Fármaco del Estudio).

40 Los pacientes en el grupo de evaluación posprandial consumirán comidas precocinadas estandarizadas (almuerzos y cenas (proporcionadas) e instrucciones para desayunos y tentempiés) durante los 2 días anteriores a las evaluaciones posprandiales. En cada uno de los días de evaluación posprandial, después de los extracciones de sangre, los pacientes consumirán una comida líquida estandarizada, que representa aproximadamente un tercio de los requisitos calóricos diarios, con un trazador de radioisótopos estable, seguido de un muestreo de sangre en serie. Los pacientes recibirán una comida precocinada estandarizada 9 horas después de consumir la comida líquida, después de lo cual ayunarán hasta la extracción de sangre de 24 horas al día siguiente.

45 Además de la recolección de muestras, los pacientes en el grupo de evaluación de PK extenso serán sometidos a un muestreo de sangre en serie durante 24 horas después de su primera dosis (Día 1-2) y la última (Día 85-86) del Fármaco del Estudio.

Período de Evaluación Post-tratamiento

50 Los pacientes serán seguidos hasta el Día de Estudio 176. Durante este tiempo, los pacientes regresarán al centro de estudio para visitas a consultas externas en los días de estudio 92, 99, 127 y 176 (y el día 103 para pacientes en el grupo de evaluación posprandial) para evaluaciones de laboratorio clínico y de seguridad (extracciones de sangre), asesoramiento y monitorización de la dieta, registro de uso de medicación concomitante y recopilación de eventos de AE.

55 Las muestras de sangre para el análisis PK y PD se recogerán periódicamente durante el período de evaluación post-tratamiento. Las mediciones de laboratorio de la química del suero, análisis de orina, coagulación, complemento, hematología, función inmune, función tiroidea y panel de lípidos completo se realizarán en diferentes momentos a lo largo del estudio.

60 Las evaluaciones posprandiales se realizarán en un subconjunto de pacientes como se describe a continuación.

Comida Posprandial, Programación de Muestreo y Evaluación

65 La evaluación posprandial para el metabolismo de lipoproteínas se realizará utilizando una comida

radiomarcada suplementada con un trazador marcado, 3H-palmitato (300 μ Ci, Perkin Elmer Inc., Woodbridge, ON, Canadá), sonicado en la comida líquida. El palmitato es un ácido graso que es un constituyente común de cualquier dieta. El trazador de 3H-palmitato emite una radioactividad débil, equivalente a un rayo X. Como el palmitato dietético se incorpora en los quilomicrones ya que se forman en los enterocitos del intestino, esto permite controlar la aparición y la depuración de los quilomicrones recién formados de la circulación. La metodología a ser aplicada aplicará para estudiar la cinética posprandial de la aparición y la depuración de los quilomicrones está bien establecida (Mittendorfer et al., 2003, Diabetes, 52: 1641-1648 ; Bickerton et al., 2007; Normand-Lauziere et al. 2010, PLoS. One, 5: e10956).

Se proporcionará una comida líquida (similar a un batido) que contiene una pequeña cantidad (300 μ Ci) de ácidos grasos radiomarcados (3H-palmitato). La comida líquida proporcionará aproximadamente un tercio de los requisitos calóricos diarios. Desde 1 hora antes a las 9 horas posteriores a la ingestión de la comida, se administrará una infusión constante de [U-13C]-K palmitato (0,01 μ mol/kg/min en 100 ml de 25% de albúmina de suero humano; Cambridge Isotopes Laboratories Inc., Andover, MA) y una infusión cebada (1,6 μ mol/kg) continua (0,05 μ mol/kg/min) de [1,1,2,3,3-2H]-glicerol (Cambridge Isotopes Laboratories Inc.) como se ha descrito anteriormente (Normand-Lauziere et al., 2010, PLoS. One, 5: e10956). Se calcularán las tasas de aparición de palmitato y glicerol en plasma usando la ecuación de estado no estacionario de Steele suponiendo un volumen de distribución de 90 ml/kg y 230 ml/kg, respectivamente (Gastaldelli et al., 1999, J Appl. Physiol, 87: 1813-1822).

Las muestras de sangre se extraerán a intervalos antes y después de la ingestión de la comida radiomarcada los días previos a y posteriores a la fase de tratamiento, como se indica observa en la tabla siguiente. A los participantes se les dará una comida estandarizada después de la extracción de sangre de 9 horas. La sangre se recogerá en tubos que contienen Na₂ EDTA y Orlistat (30 μ g/ml, Roche, Mississauga, Canadá) para prevenir la lipólisis de triacilglicerol *in vitro* y se recogerán muestras separadas en tubos NaF para la determinación de glucosa en plasma.

Lo siguiente se medirá en cada punto temporal:

- Niveles de fracción de plasma y CM para trazador 3H
- Tasas de aparición de plasma [U-13C]-Kpalmitato y [1,1, 2, 3, 3-2H]-glicerol
- Niveles de fracción de plasma y CM para TG, TC y apoB
- Niveles de fracción de plasma y VLDL para apo CIII, apo CII y apo E
- Niveles de plasma para glucosa

Las muestras de plasma también pueden usarse para el perfil de proteínas de enlace a fármacos, con propósitos de validación del método bioanalítico, evaluaciones de la estabilidad y metabolitos, o para evaluar otras acciones del ISIS 304801 con constituyentes en plasma.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc.
Adam Mullick
Rosanne M. Crooke
Mark J. Graham
Kenneth W. Dobie
Thomas A. Bell III
Richard Lee

<120> MODULACION DE LA EXPRESION DE APOLIPOPROTEINA CIII(APOCIII) EXPRESSION

<130> BIOL0130WO

<150> 61/479,817

<151> 2011-04-27

<150> 61/595,009

<151> 2012-02-03

<160> 5

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 533

<212> ADN

ES 2 663 635 T3

<213> Homo sapiens

<400> 1

5	tgctcagttc	atccctagag	gcagctgctc	caggaacaga	ggtgccatgc	agccccgggt	60
	actccttggt	ggtgccctcc	tggcgctcct	ggcctctgcc	cgagcttcag	aggccgagga	120
	tgctccctt	ctcagcttca	tgcagggtta	catgaagcac	gccaccaaga	ccgccaagga	180
	tgactgagc	agcgtgcagg	agtcccaggt	ggcccagcag	gccaggggct	gggtgaccga	240
10	tggcttcagt	tccctgaaag	actactggag	caccgttaag	gacaagttct	ctgagttctg	300
	ggatttgac	cctgaggtca	gaccaacttc	agccgtggct	gcctgagacc	tcaatacccc	360
	aagtccacct	gcctatccat	cctgcgagct	ccttgggtcc	tgcaatctcc	agggctgccc	420
	ctgtaggttg	cttaaaaggg	acagtattct	cagtgtctctc	ctaccccacc	tcatgcctgg	480
	ccccctcca	ggcatgctgg	cctcccaata	aagctggaca	agaagctgct	atg	533

15

<210> 2

<211> 3964

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20

<400> 2

	ctactccagg	ctgtgttcag	ggcttggggc	tgggtggaggg	aggggcctga	aattccagtg	60
25	tgaaaggctg	agatgggccc	gaggcccctg	gcctatgtcc	aagccatttc	ccctctcacc	120
	agcctctccc	tggggagcca	gtcagctagg	aaggaatgag	ggctccccag	gcccaccccc	180
	agttcctgag	ctcatctggg	ctgcagggct	ggcgggacag	cagcgtggac	tcagtctcct	240
	agggatthcc	caactctccc	gcccgcttgc	tgcatctgga	caccctgcct	caggccctca	300
	tctccactgg	tcagcaggtg	acctttgccc	agcgcctggg	gtcctcagtg	cctgctgccc	360
30	tggagatgat	ataaaacagg	tcagaaccct	cctgcctgtc	tgctcagttc	atccctagag	420
	gcagctgctc	caggtaatgc	cctctgggga	ggggaaagag	gaggggagga	ggatgaagag	480
	gggcaagagg	agctccctgc	ccagcccagc	cagcaagcct	ggagaagcac	ttgctagagc	540
	taaggaagcc	tcggagctgg	acgggtgccc	cccaccctc	atcataacct	gaagaacatg	600
	gagggccggg	aggggtgtca	cttgccaaa	gctacacagg	gggtggggct	ggaagtggct	660
35	ccaagtgcag	gtccccccct	cattcttcag	gcttagggct	ggaggaagcc	ttagacagcc	720
	cagtcttacc	ccagacaggg	aaactgaggc	ctggagaggg	ccagaaatca	cccaaagaca	780
	cacagcatgt	tggctggact	ggacggagat	cagtccagac	cgcaggtgcc	ttgatgttca	840
	gtctggtggg	ttttctgctc	catcccacc	acctcccttt	gggcctcgat	ccctcgcccc	900

40

45

50

55

60

65

ES 2 663 635 T3

	tcaccagtcc	cccttctgag	agcccgtatt	agcaggggagc	cggcccctac	tccttctggc	960
	agaccagct	aaggttctac	cttaggggcc	acgccacctc	cccagggagg	ggtccagagg	1020
	catggggacc	tggggtgccc	ctcacaggac	acttccttgc	aggaacagag	gtgccatgca	1080
5	gccccgggta	ctccttggtg	ttgcccctct	ggcgtcctg	gcctctgccc	gtaagcaactt	1140
	ggtgggactg	ggctgggggc	aggggtggagg	caacttgggg	atcccagtcc	caatgggtgg	1200
	tcaagcagga	gcccagggct	cgtccagagg	ccgatccacc	ccactcagcc	ctgctctttc	1260
	ctcaggagct	tcaagggccg	aggatgcctc	ccttctcagc	ttcatgcagg	gttacatgaa	1320
	gcacgccacc	aagaccgcca	aggatgcact	gagcagcgtg	caggagtccc	aggtggccca	1380
10	gcaggccagg	tacaccgct	ggcctccctc	cccaccccc	ctgccagctg	cctccattcc	1440
	caccgcgcc	tgccctgggtg	agatcccaac	aatggaatgg	aggtgctcca	gcctcccctg	1500
	ggcctgtgca	tcttcagcct	cctctttcct	cacagggcct	ttgtcaggct	gctgcgggag	1560
	agatgacaga	gttgagactg	cattcctccc	aggtccctcc	tttctcccc	gagcagctct	1620
	agggcgtgcc	gttttagccc	tcatttccat	tttctttcc	tttccctttc	tttctttctt	1680
15	tatttctttc	tttctttctt	tctttctttc	tttctttctt	tctttctttc	tttctttctt	1740
	tctttctttc	ctttctttct	ttcctttctt	tctttctttc	ctttctttct	ttcctttctt	1800
	tctctttctt	tctttctttc	ctttttcttt	ctttccctct	cttctttctt	ctctttcttt	1860
	cttctttctt	tttttttaat	ggagtctccc	tctgtcacct	aggctggagt	gcagtgggtg	1920
20	catctcggct	cactgcaacc	tccgtctccc	gggttcaacc	cattctcctg	cctcagcctc	1980
	ccaagtagct	gggattacag	gcacgcgcca	ccacacccag	ctaatttttg	tatttttagc	2040
	agagatgggg	tttcaccatg	ttggccaggt	tggtcttgaa	ttcctgacct	caggggatcc	2100
	tcctgcctcg	gcctcccaaa	gtgctgggat	tacaggcatg	agccactgcg	cctggcccca	2160
	ttttcctttt	ctgaaggtct	ggctagagca	gtggtcctca	gcctttttgg	caccagggac	2220
25	cagttttgtg	gtggacaatt	tttccatggg	ccagcgggga	tggttttggg	atgaagctgt	2280
	tccacctcag	atcatcaggc	attagattct	cataaggagc	cctccaccta	gatccctggc	2340
	atgtgcagtt	cacaataggg	ttcacactcc	tatgagaatg	taaggccact	tgatctgaca	2400
	ggaggcggag	ctcaggcggg	attgctcact	caccacccac	tcacttcgtg	ctgtgcagcc	2460
	cggctcctaa	cagtccatgg	accagtaact	atctatgact	tgggggttgg	ggacccctgg	2520
30	gctaggggtt	tgccttggga	ggccccacct	gacccaattc	aagcccgtga	gtgcttctgc	2580
	tttgttctaa	gacctggggc	cagtgtgagc	agaagtgtgt	ccttctctc	ccatcctgcc	2640
	cctgcccatc	agtactctcc	tctcccctac	tcccttctcc	acctcaccct	gactggcatt	2700
	agctggcata	gcagaggtgt	tcataaacat	tcttagtccc	cagaaccggc	tttggggtag	2760
35	gtgttatttt	ctcactttgc	agatgagaaa	attgaggctc	agagcgatta	ggtgacctgc	2820
	cccagatcac	acaactaatc	aatcctccaa	tgactttcca	aatgagaggc	tgctccctc	2880
	tgtcctacc	tgctcagagc	caccaggttg	tgcaactcca	ggcgggtgctg	tttgcacaga	2940
	aaacaatgac	agccttgacc	tttcacatct	ccccaccctg	tcactttgtg	cctcaggccc	3000
	aggggcataa	acatctgagg	tgacctggag	atggcagggg	ttgacttgtg	ctggggttcc	3060
40	tgcaaggata	tctcttctcc	cagggtggca	gctgtggggg	attcctgcct	gaggtctcag	3120
	ggctgtcgtc	cagtgaagtt	gagaggggtg	tgtggtcctg	actggtgtcg	tccagtgggg	3180
	acatgggtgt	gggtcccatg	gttgccata	gaggagtctt	catgccctgc	tctgttgctt	3240
	cccctgactg	atthtaggggc	tgggtgaccg	atggcttcag	ttccctgaaa	gactactgga	3300
	gcaccgttaa	ggacaagttc	tctgagttct	gggatttggg	ccctgaggtc	agaccaactt	3360
45	cagccgtggc	tgcttgagac	ctcaataccc	caagtccacc	tgcttatcca	tctgagagc	3420
	tccttgggtc	ctgcaatctc	cagggtgcc	cctgtaggtt	gcttaaaagg	gacagtattc	3480
	tcagtgtctt	cctaccccac	ctcatgcctg	gccccctcc	aggcatgctg	gcctcccaat	3540
	aaagctggac	aagaagctgc	tatgagtggg	ccgtcgcaag	tgtgccatct	gtgtctgggc	3600
	atgggaaagg	gccgaggctg	ttctgtgggt	gggactgga	cagactccag	gtcaggcagg	3660
50	catggaggcc	agcgtctctat	ccacctctg	gtagctgggc	agtctctggg	cctcagtttc	3720
	ttcatctcta	aggtaggaat	cacctccgt	accctgcctt	ccttgacagc	tttgtcggg	3780
	aggtcaaaca	ggacaataag	tttgctgata	ctttgataaa	ctgttaggtg	ctgcacaaca	3840
	tgacttgagt	gtgtgcccc	tgccagccac	tatgcctggc	acttaagttg	tcatcagagt	3900
55	tgagactgtg	tgtgtttact	caaaaactgtg	gagctgacct	cccctatcca	ggccccctag	3960
	ccct						3964

<210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65

ES 2 663 635 T3

<400> 3
agcttctgt ccagcttat 20

5 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 4
ccttccctga aggtcctcc 20

15 <210> 5
<211> 524
<212> ADN
<213> Mus musculus

20 <400> 5

	ctgctcagtt	ttatccctag	aagcagctag	ctactccagg	tacgtaggtg	ccatgcagcc	60
	ccggacgctc	ctcactgtgg	ccctcttggc	tctcctggca	tctgcccgag	ctgaagaggt	120
25	agagggatcc	ttgctgctgg	gctctgtaca	gggctacatg	gaacaagcct	ccaagacggt	180
	ccaggatgcg	ctaagtagcg	tgcaggagtc	cgatatagct	gtggtggcca	ggggctggat	240
	ggacaatcac	ttcagatccc	tgaaaggcta	ctggagcaag	tttactgaca	agttcaccgg	300
	cttctgggat	tctaaccctg	aggaccaacc	aactccagct	attgagtcgt	gagacttctg	360
	tgttgcagat	gtgcctgttc	ctccatcctg	ctgccccct	ccaggcctgc	caggtggccc	420
30	ctgaaggttg	ctttaagggg	aaagtatgtt	ctcatgtctt	caccctccc	tagatctcac	480
	ctaaacatgc	tgtccctaat	aaagctggat	aagaagctgc	tgtt		524

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un compuesto antisentido dirigido a ApoCIII que comprende un oligonucleótido modificado para su uso en la prevención, tratamiento, retraso o mejora de la pancreatitis en un sujeto, en donde el compuesto antisentido inhibe la expresión de ApoCIII en el sujeto, y en donde el oligonucleótido modificado comprende por lo menos una fracción de azúcar modificado, ligamiento inter-nucleósidos y/o nucleobase modificada.
- 10 **2.** El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:
- a) los niveles de CETP están disminuidos;
 - b) Están aumentadas ApoA1, PON1, depuración de grasas, depuración de triglicéridos de quilomicrones
- 15 **3.** El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde
- a) la secuencia de nucleobases del oligonucleótido modificado es el 80%, 90% o 100% complementaria a una secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2;
 - b) el oligonucleótido modificado consiste de un oligonucleótido modificado de cadena sencilla; y/o
 - c) el oligonucleótido modificado consiste de 12 a 30 nucleósidos ligados.
- 20 **4.** El compuesto para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que:
- a) por lo menos uno o cada ligamiento inter-nucleósidos modificado del oligonucleótido modificado es un ligamiento inter-nucleósidos de fosforotioato;
 - b) por lo menos un azúcar modificado es un azúcar bicíclico; y/o
 - c) por lo menos una nucleobase modificada es una 5-metilcitosina.
- 25 **5.** El compuesto para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde por lo menos un azúcar modificado comprende un 2'-O-metoxietilo.
- 30 **6.** El compuesto para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el oligonucleótido modificado comprende:
- a) un segmento gap que consiste de desoxinucleósidos ligados;
 - b) un segmento de ala 5' que consiste de nucleósidos ligados;
 - c) un segmento de ala 3' que consiste en nucleósidos ligados;
- 35 en donde el segmento gap está situado inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3' y en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado.
- 40 **7.** El compuesto para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el oligonucleótido modificado comprende:
- a) un segmento gap que consiste en 10 desoxinucleósidos ligados;
 - b) un segmento de ala 5' que consiste en 5 nucleósidos ligados;
 - c) un segmento de ala 3' que consiste en 5 nucleósidos ligados;
- 45 en donde el segmento gap está situado inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, en donde cada citosina es una 5'-metilcitosina, y en donde cada ligamiento inter-nucleósidos es un ligamiento de fosforotioato.
- 50 **8.** El compuesto para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el compuesto se administra parenteralmente, en donde opcionalmente la administración parenteral es administración subcutánea.
- 55 **9.** El compuesto para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, para su uso en combinación con un segundo agente.
- 60 **10.** El compuesto para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el compuesto es una forma de sal.

60

65