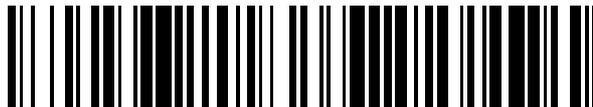


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 405**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2004** E 15189401 (1)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018** EP 3002007

54 Título: **Modulación de la expresión de apolipoproteína C-III**

30 Prioridad:

16.04.2003 US 418780

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

04.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CROOKE, ROSANNE M.;
GRAHAM, MARK J.;
LEMONIDIS TARBET, KRISTINA M. y
DOBIE, KENNETH**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 666 405 T3

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

DESCRIPCIÓN

Modulación de la expresión de apolipoproteína C-III**CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención proporciona compuestos capaces de modular la expresión de apolipoproteína C-III, para su uso en terapia. En particular, la presente invención se refiere a compuestos, en particular compuestos oligonucleótidos, que hibridan con moléculas de ácidos nucleicos que codifican la apolipoproteína C-III. Se muestra en la presente que dichos compuestos modulan la expresión de apolipoproteína C-III.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las lipoproteínas son partículas globulares, similares a micelas, que constan de un núcleo no polar de acilglicerol y ésteres de colesterol rodeado por un recubrimiento anfífilo de proteína, fosfolípido y colesterol. Las lipoproteínas se han clasificado en cinco amplias categorías sobre la base de sus propiedades funcionales y físicas: 15 quilomicrones, que transportan los lípidos de la dieta del intestino a los tejidos; lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL); lipoproteínas de densidad intermedia (IDL); lipoproteínas de baja densidad (LDL); todas ellas transportan triacilglicerol y colesterol del hígado a los tejidos; y lipoproteínas de alta densidad (HDL), que transportan colesterol endógeno de los tejidos al hígado.

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

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

30 El gen que codifica la apolipoproteína C-III humana (también denominada APOC3, APOC-III, APO CIII y APO C-III) fue clonado en 1984 por tres grupos de investigación (Levy-Wilson y col., DNA, 1984, 3, 359-364; Protter y col., DNA, 1984, 3, 449-456; Sharpe y col., Nucleic Acids Res., 1984, 12, 3917-3932). La secuencia codificante está interrumpida por tres intrones (Protter y col., DNA, 1984, 3, 449-456). El gen de la apolipoproteína C-III humana está ubicado aproximadamente a 2,6 kb en la dirección 3' del gen de la apolipoproteína A-1 y estos dos genes se transcriben de forma convergente (Karathanasis, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1985, 82, 6374-6378). También se clonó una variante de la apolipoproteína C-III humana con mutación Thr74 a Ala74 a partir de un paciente con un nivel inusualmente alto de apolipoproteína C-III en suero. Debido a que la Thr74 está O-glucosilada, el mutante Ala74, por lo tanto, provocó unos niveles aumentados en suero de apolipoproteína C-III que carece del resto de carbohidrato (Maeda y col., J. Lipid Res., 1987, 28, 1405-1409).

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

50 Además de la insulina, se han identificado otros reguladores de la expresión del gen de la apolipoproteína III. Un elemento de respuesta para el receptor huérfano nuclear rev-erb alfa se ha localizado en las posiciones -23/-18 55 en la región promotora de la apolipoproteína C-III y el rev-erb alfa disminuye la actividad del promotor de la apolipoproteína C-III (Raspe y col., J. Lipid Res., 2002, 43, 2172-2179). La región promotora de la apolipoproteína C-III -86 a -74 se reconoce por dos factores nucleares CIIIb1 y CIIIb2 (Ogami y col., J. Biol. Chem., 1991, 266, 9640-9646). La expresión de la apolipoproteína C-III está también regulada al alza por retinoides que actúan a través del receptor X retinoide, y las alteraciones en la abundancia del receptor X de retinoides afectan a la transcripción de apolipoproteína C-III (Vu-Dac y col., J. Clin. Invest., 1998, 102, 625-632). Se ha demostrado que la proteína de especificidad 1 (Sp1) y el factor nuclear del hepatocito 4 (HNF-4) actúan de forma sinérgica para transactivar el promotor de la apolipoproteína C-III a través del sitio de unión HNF-4 (Kardassis y col., Biochemistry, 2002, 41, 1217-1228). El HNF-4 también actúa conjuntamente con SMAD3-SMAD4 para transactivar el promotor de la apolipoproteína C-III (Kardassis y col., J. Biol. Chem., 2000, 275, 41405-41414).

65

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

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

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona un compuesto de 15 a 30 bases nitrogenadas de longitud dirigidas a;

- (a) un intrón;
- (b) una unión intrón-exón; o
- (c) una unión exón-intrón

de una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III, en el que dicho compuesto hibrida específicamente con dicha molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III e inhibe la expresión de la apolipoproteína C-III, y en el que dicho compuesto es al menos un 90% complementario a dicha molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III, para su uso en terapia.

SUMARIO DE LA DIVULGACION

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

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

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

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

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

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

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

documento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 A. Visión general

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

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

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

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

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

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

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

"Complementario", tal como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad para un apareamiento preciso entre dos bases nitrogenadas de un compuesto oligomérico. Por ejemplo, si una base nitrogenada en una posición determinada de un oligonucleótido (un compuesto oligomérico) es capaz de formar un enlace de hidrógeno con una base nitrogenada en una posición determinada de un ácido nucleico diana, siendo dicho ácido nucleico diana una molécula de ADN, de ARN o de oligonucleótido, entonces la posición del enlace de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana se considera que es una posición complementaria. El oligonucleótido y

la molécula adicional de ADN, ARN u oligonucleótido son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias de cada molécula están ocupadas por bases nitrogenadas que pueden formar enlaces de hidrógeno una con otra. De este modo, "que puede hibridarse específicamente" y "complementario" son expresiones que se usan para indicar un grado suficiente de apareamientos precisos o complementariedad a lo largo de un número suficiente de bases nitrogenadas de tal modo que tenga lugar una unión estable y específica entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana.

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

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

B. Compuestos

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

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

Aunque la forma preferente de compuesto antisentido es un oligonucleótido monocatenario, en muchas

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

5 La primera evidencia de que el ARNds podría provocar el silenciamiento génico en animales se tuvo en 1995 por el trabajo en el nematodo, *Caenorhabditis elegans* (Guo y Kempheus, Cell, 1995, 81, 611-620). Los efectos de interferencia principales del ARNds son postranscripcionales (Montgomery y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 15502-15507). El mecanismo antisentido postranscripcional definido en *Caenorhabditis elegans* resultante de la
10 exposición al ARN bicatenario (ARNds) se ha denominado desde entonces ARN de interferencia (ARNi). Se ha generalizado que este término significa silenciamiento génico mediado por antisentido que implica la introducción de ADNds que provoca la reducción específica de secuencia de niveles de ARNm dirigido endógeno (Fire y col., Nature, 1998, 391, 806-811). Recientemente, se ha informado que estos oligómeros de ARN monocatenario de polaridad antisentido de los ARNds son inductores potentes de ARNi (Tijsterman y col., Science, 2002, 295, 694-697).

15 En el contexto de la presente invención, la expresión "compuesto oligomérico" se refiere a un polímero u oligómero que comprende una pluralidad de unidades monoméricas. En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o desoxirribonucleico (ADN) o miméticos, quimeras, análogos y homólogos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos
20 compuestos por bases nitrogenadas de origen natural, azúcares y enlaces covalentes entre nucleósidos (esqueleto), así como oligonucleótidos que no tienen porciones de origen natural que operan de modo similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos son preferentes a menudo sobre las formas nativas debido a unas propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por un ácido nucleico diana y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas.

25 Los oligonucleótidos de la presente invención también incluyen oligonucleótidos modificados en los que una base nitrogenada diferente está presente en una o varias de las posiciones de nucleótidos en el oligonucleótido. Por ejemplo, si el primer nucleótido es adenosina, pueden producirse oligonucleótidos modificados que contengan timidina, guanosina o citidina en esta posición. Esto puede realizarse en cualquiera de las posiciones del oligonucleótido.
30 Estos oligonucleótidos se analizan después usando los procedimientos descritos en el presente documento para determinar su capacidad para inhibir la expresión de la apolipoproteína C-III.

Aunque los oligonucleótidos son una forma preferente de los compuestos de la presente divulgación, la presente divulgación comprende también otras familias de compuestos, incluidos, pero no limitados a, análogos y miméticos de oligonucleótidos tales como los que se describen en el presente documento.

35 Los compuestos según la divulgación comprenden preferentemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 bases nitrogenadas (es decir, de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleósidos enlazados). Un experto en la técnica apreciará que esto abarca compuestos de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 bases nitrogenadas de longitud.

45 En una realización preferente, los compuestos tienen de 12 a 50 bases nitrogenadas de longitud. Un experto en la técnica apreciará que esto abarca compuestos de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50 bases nitrogenadas de longitud.

50 En una realización preferente, los compuestos tienen de 15 a 30 bases nitrogenadas de longitud. Un experto en la técnica apreciará que esto abarca compuestos de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 bases nitrogenadas de longitud.

55 Son compuestos particularmente preferentes los oligonucleótidos de aproximadamente 12 a aproximadamente 50 bases nitrogenadas; son incluso más preferentes los que comprenden de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 bases nitrogenadas.

60 Los compuestos antisentido de 8-80 bases nitrogenadas de longitud que comprenden un tramo de al menos ocho (8) bases nitrogenadas consecutivas seleccionadas de entre los compuestos antisentido ilustrativos se consideran también compuestos antisentido adecuados.

65 Los compuestos antisentido preferidos ejemplares incluyen secuencias de oligonucleótidos que comprenden al menos las 8 bases nitrogenadas consecutivas desde el extremo 5' de uno de los compuestos antisentido preferentes ilustrativos (siendo las bases nitrogenadas restantes un tramo consecutivo del mismo oligonucleótido que comienza inmediatamente cadena arriba del extremo 5' del compuesto antisentido que puede hibridarse específicamente al ácido nucleico diana y que continúa hasta el oligonucleótido que comprende de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 bases nitrogenadas). Similarmente, los compuestos antisentido

preferentes están representados por secuencias de oligonucleótidos que comprenden al menos las 8 bases nitrogenadas consecutivas desde el extremo 3' de uno de los compuestos antisentido preferentes ilustrativos (siendo las bases nitrogenadas restantes un tramo consecutivo del mismo oligonucleótido que comienza inmediatamente cadena abajo del extremo 3' del compuesto antisentido que puede hibridarse específicamente al ácido nucleico diana y que continúa hasta el oligonucleótido que comprende de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 bases nitrogenadas). Pueden encontrarse identificados ejemplos de compuestos de una variedad de fuentes de mamífero, incluido el ser humano, en los ejemplos y enumerados en las tablas 1 a 21. Un experto en la técnica equipado con los compuestos antisentido preferentes que se ilustran en el presente documento será capaz, sin una experimentación excesiva, de identificar compuestos antisentido preferentes adicionales.

C. Dianas

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

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

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

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

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

Otras regiones diana incluyen la región no traducida 5' (5'UTR), conocida en la técnica por referirse a la porción de un ARNm en la dirección 5' a partir de un codón de iniciación de la traducción y que, de este modo, incluye nucleótidos entre el sitio de remate 5' y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen), y la región no traducida 3' (3'UTR), conocida en la técnica por referirse a la porción de un ARNm en la dirección 3' a partir de un codón de iniciación de la traducción y que, de este modo, incluye nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm (o nucleótidos correspondientes

en el gen). El sitio de remate 5' de un ARNm comprende un resto de guanosina metilada en N7 unido al resto del extremo 5' del ARNm por medio de un enlace 5'-5' trifosfato. La región de remate 5' de un ARNm se considera que incluye la estructura de remate 5' en sí misma así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes al sitio de remate. También es preferente dirigirse a la región de remate 5'.

En consecuencia, la presente divulgación incluye compuestos antisentido que se dirigen a una porción de bases nitrogenadas 1 – 533 tal como se expone en la SEC ID N°: 18. En una realización, los compuestos antisentido se dirigen al menos a una porción de 8 bases nitrogenadas de las bases nitrogenadas 1 - 533 tal como se expone en la SEC ID N°: 18 y las tablas 1 y 4. En otra realización, los compuestos antisentido se dirigen a al menos una porción de bases nitrogenadas de 8 bases nitrogenadas que comprende la región 5' UTR tal como se expone en la SEC ID N°: 18 y las tablas 1 y 4. En otra realización, los compuestos antisentido se dirigen a al menos una porción de bases nitrogenadas de 8 bases nitrogenadas que comprende la región 3' UTR tal como se expone en la SEC ID N°: 18 y las tablas 1 y 4. En otra realización, los compuestos antisentido se dirigen a al menos una porción de bases nitrogenadas de 8 bases nitrogenadas que comprende la región codificante tal como se expone en la SEC ID N°: 18 y las tablas 1 y 4. En otras realizaciones más, los compuestos antisentido se dirigen a al menos una porción de 8 bases nitrogenadas de un "segmento diana preferente" (tal como se define en el presente documento) tal como se expone en la tabla 3.

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

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

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

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

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

Las localizaciones del ácido nucleico diana a las que los compuestos antisentido preferentes se hibridan se denominan en adelante en el presente documento "segmentos diana preferentes". Tal como se usa en el presente documento la expresión "segmento diana preferente" se define como al menos una porción de 8 bases nitrogenadas de

una región diana a la que se dirige un compuesto antisentido activo. Aunque sin pretender vincularse a ninguna teoría, se cree actualmente que estos segmentos diana representan porciones del ácido nucleico diana que son accesibles para la hibridación.

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

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

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

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

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

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

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

55 **D. Selección y validación de la diana**

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

disminuyendo o bien aumentando) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III, el modulador puede usarse en otros estudios de investigación de la función de la apolipoproteína C-III, o como agente de investigación, de diagnóstico o terapéutico según la presente invención.

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

10 Se ha demostrado en la técnica que dichos restos de oligonucleótido bicatenario modulan la expresión diana y la traducción regulada, así como el procesamiento de ARN mediante un mecanismo antisentido. Además, los restos bicatenarios pueden ser objeto de modificaciones químicas (Fire y col., Nature, 1998, 391, 806-811; Timmons y Fire, Nature 1998, 395, 854; Timmons y col., Gene, 2001, 263, 103-112; Tabara y col., Science, 1998, 282, 430-431; Montgomery y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 15502-15507; Tuschl y col., Genes Dev., 1999, 13, 3191-3197; Elbashir y col., Nature, 2001, 411, 494-498; Elbashir y col., Genes Dev. 2001, 15, 188-200). Por ejemplo, se ha demostrado que dichos restos bicatenarios inhiben la diana mediante la hibridación clásica de cadena antisentido del dúplex a la diana, desencadenando, por lo tanto, la degradación enzimática de la diana (Tijsterman y col., Science, 2002, 295, 694-697).

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

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

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

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

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

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

60 Los ejemplos de procedimientos de análisis de expresión génica conocidos en la técnica incluyen chips o microchips de ADN (Brazma y Vilo, FEBS Lett., 2000, 480, 17-24; Celis, y col., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16), SAGE (serial analysis of gene expresión (análisis en serie de la expresión génica))(Madden y col., Drug Discov. Today, 2000, 5, 415-425), READS (restriction enzyme amplification of digested cDNAs (amplificación de enzimas de restricción de ADN digeridos) (Prashar y Weissman, Methods Enzymol., 1999, 303, 258-72), TOGA (total gene expression analysis (análisis de expresión génica total)) (Sut-cliffe y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 1976-81), chips de proteínas y proteómica (Celis y col., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Jungblut y col., Electrophoresis, 1999, 20, 2100-10), secuenciación de etiquetas de secuencias expresadas (EST) (Celis y col., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson y col.,

J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57), huella genética de ARN sustractiva (SuRF) (Fuchs y col., Anal. Biochem., 2000, 286, 91-98; Larson y col., Cytometry, 2000, 41, 203-208), clonación sustractiva, presentación diferencial (DD) (Jurecic y Belmont, Curr. Opin. Microbiol., 2000, 3, 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli y col., J. Cell Biochem. Suppl., 1998, 31, 286-96), técnicas de FISH (hibridación fluorescente in situ) (Going y Gusterson, Eur. J. Cancer, 1999, 35, 1895-904) y procedimientos de espectrometría de masas (To, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2000, 3, 235-41).

Los compuestos divulgados en el presente documento son útiles para investigación y diagnóstico, debido a que estos compuestos se hibridan con ácidos nucleicos que codifican apolipoproteína C-III. Por ejemplos, los oligonucleótidos que se ha demostrado que se hibridan con la eficacia y en las condiciones que se divulgan en el presente documento como para ser inhibidores eficaces de la apolipoproteína C-III también serán cebadores y sondas eficaces en condiciones que favorecen la amplificación o la detección de genes, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en procedimientos que requieren la detección específica de moléculas de ácidos nucleicos que codifican la apolipoproteína C-III y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios posteriores de la apolipoproteína C-III. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y sondas, de la invención con un ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Dichos medios pueden incluir la conjugación de una enzima al oligonucleótido, radiomarcado del oligonucleótido o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse los kits que usan dichos medios de detección para detectar el nivel de apolipoproteína C-III en una muestra.

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

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

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

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

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

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

En una realización, la actividad o expresión de la apolipoproteína C-III en un animal se inhibe aproximadamente el 10 %. Preferentemente, la actividad o expresión de la apolipoproteína C-III en un animal se inhibe aproximadamente el 30 %. Más preferentemente, la actividad o expresión de la apolipoproteína C-III en un animal se inhibe aproximadamente el 50 %. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión de ARNm de apolipoproteína C-III en al menos el 10 %, en al menos el 20 %, en al menos el 25 %, en al menos el 30 %, en al

menos el 40 %, en al menos el 50 %, en al menos el 60 %, en al menos el 70 %, en al menos el 75 %, en al menos el 80 %, en al menos el 85 %, en al menos el 90 %, en al menos el 95 %, en al menos el 98 %, en al menos el 99 % o el 100 %.

5 Por ejemplo, la reducción de la expresión de apolipoproteína C-III puede medirse en suero, tejido adiposo, hígado o cualquier otro fluido corporal, tejido u órgano del animal. Preferentemente, las células presentes en dichos fluidos, tejidos u órganos que están siendo analizados contienen una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III y/o apolipoproteína C-III.

10 Los compuestos de la presente invención pueden usarse en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad eficaz de un compuesto a un diluyente o vehículo adecuado farmacéuticamente aceptable. El uso de los compuestos y procedimientos de la presente invención también pueden ser útiles profilácticamente.

15 F. Modificaciones

15 Tal como se sabe en la técnica, un nucleósido es una combinación base-azúcar. La porción de la base del nucleósido es normalmente una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de dichas bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para los nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar unido o bien al resto 2', 3' o 5'-hidroxilo del azúcar. Al formar oligonucleótidos, los grupos fosfato unen covalentemente nucleósidos adyacentes entre sí formando un compuesto polimérico lineal. A su vez, los extremos respectivos de este compuesto polimérico lineal pueden unirse posteriormente formando un compuesto circular; no obstante, son preferentes, generalmente, los compuestos lineales. Además, los compuestos lineales pueden tener complementariedad de bases nitrogenadas internas y pueden, por lo tanto, plegarse de modo que se produzca un compuesto bicatenario total o parcial. Dentro de los oligonucleótidos, los grupos fosfato se denominan comúnmente formadores del esqueleto entre nucleósidos del oligonucleótido. La unión normal o esqueleto de ARN y ADN es una unión 3' a 5' fosfodiéster.

30 *Uniones entre nucleósidos modificadas (esqueleto)*

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

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

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

45 Los esqueletos de oligonucleótidos modificados preferentes que no incluyen un átomo de fósforo en el mismo tienen esqueletos que se forman por uniones entre nucleósidos alquílicas de cadena corta o cicloalquílicas, uniones entre nucleósidos mixtas de heteroátomos y alquilo o cicloalquilo, o una o más uniones entre nucleósidos heteroatómicas o heterocíclicas de cadena corta. Estos incluyen los que tienen uniones de morfolino (formadas en parte desde la porción de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano, esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metileno formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de riboacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilnimino y metilhidrazon; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes componentes mixtas de N, O, S y CH₂.

65 Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los oligonucleótidos

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

Azúcar modificado y uniones entre nucleótidos - miméticos

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

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

Azúcares modificados

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o varios restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferentes comprenden uno de los grupos siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, pudiendo ser el alquilo, el alqueno y el alquino alquilo C_1 a C_{10} o alqueno y alquino C_2 a C_{10} sustituidos o no sustituidos. Son particularmente preferentes $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ y $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, en los que n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferentes comprenden uno de los grupos siguientes en la posición 2': alquilo C_1 a C_{10} inferior, alquilo, alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, o-alcarilo o O-aralquilo inferiores sustituidos, SH, SCH_3 , OCN , Cl, Br, CN, CF_3 , OCF_3 , SOCH_3 , SO_2CH_3 , ONO_2 , NO_2 , N_3 , NH_2 , heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo comunicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tengan propiedades similares. Una modificación preferente incluye 2'-metoxietoxi ($2'\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin y col., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504), es decir, un grupo alcoxi. Una modificación preferente adicional incluye 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en ejemplos más adelante en el presente documento, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetil-amino-etoxi-etilo o 2'-DMAEOE), es decir, $2'\text{-O-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$, que también se describe en ejemplos más adelante en el presente documento.

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

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

Publicaciones de patente internacional N°. WO 98/39352 y WO 99/14226.

Bases nitrogenadas naturales y modificadas

5 Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de bases nitrogenadas (a menudo denominadas en la técnica simplemente como "bases"). Tal como se usan en el presente documento, bases nitrogenadas "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases purinas adenina (A) y guanina (G) y las bases pirimidinas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las bases nitrogenadas modificadas incluyen otras bases nitrogenadas sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 10 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halo-uracilo y citosina, 5-propinil (-C≡C-CH₃) uracilo y citosina y otros derivados de alquilo de bases pirimidínicas, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en la posición 8, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en la posición 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Otras bases nitrogenadas modificadas incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoti-azin-2(3H)-ona), abrazaderas en G tales como una fenoxazina citidina sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4] benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimido [4,5-b] indol-2-ona), piridoindol citidina (H-pirido[3',2':4,5] pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las bases nitrogenadas modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base purina o pirimidina está reemplazada por otros heterociclos, por ejemplo, 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Otras bases nitrogenadas incluyen las divulgadas en el documento de patente de Estados Unidos N° 3.687.808, las divulgadas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, las divulgadas por Englisch y col., Angewandte Chemie, edición internacional, 1991, 30, 613, y las divulgadas por Sanghvi, Y.S., capítulo 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas bases nitrogenadas son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos de la invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluidas 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C y son actualmente sustituciones de bases preferentes, incluso más particularmente si se combinan con modificaciones 2'-O-metoxietil azúcar.

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

Conjugados

45 Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica la unión química al oligonucleótido de uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular de los oligonucleótidos. Estos restos o conjugados pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la presente invención incluyen intercaladores, moléculas comunicadoras, poliaminas, polietileno, glicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de oligómeros y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesterolos, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, coumarinas y pigmentos. Los grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de la presente invención, incluyen grupos que mejoran la captación, potencian la resistencia a la degradación y/o potencian la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico diana. Los grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de la presente invención, incluyen grupos que mejoran la captación, la distribución, el metabolismo o la excreción de los compuestos de la presente invención. Se divulgan grupos conjugados representativos en la Solicitud de patente internacional PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre de 1992, y en el documento de patente de Estados Unidos N° 6.287.860. Los restos conjugados incluyen, pero no están limitados a, restos lipídicos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietileno glicol, o ácido adamantano acético, un resto palmitílico, o un resto de octadecilamina o de hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la invención también pueden conjugarse con sustancias farmacológicamente activas, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, 65 suprofenofeno, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triidobenzoico,

ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometicina, un barbiturato, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Los conjugados oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 09/334.130 (presentada el 15 de junio de 1999).

5 Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos conjugados de oligonucleótido incluyen, pero no están limitadas a, los documentos de patente de Estados Unidos N°: 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 10 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941, algunas de las cuales se encuentran en propiedad conjunta con la presente solicitud.

15 *Compuestos quiméricos*

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

La presente divulgación también incluye compuestos antisentido que son compuestos quiméricos. Compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras," en el contexto de la presente invención, son compuestos antisentido, en particular oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta por al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región en la que el oligonucleótido está modificado de modo que confiere sobre el oligonucleótido una resistencia aumentada a la degradación por nucleasa, captación celular aumentada, estabilidad aumentada y/o afinidad de unión aumentada por el ácido nucleico diana. Una región adicional del nucleótido puede servir con sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplos, la ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN. La activación de la ARNasa H, por lo tanto, da como resultado la escisión de la diana de ARN, potenciando ampliamente de este modo la eficacia de la inhibición mediada por oligonucleótidos de la expresión génica. La escisión de los híbridos ARN:ARN puede, de igual manera, realizarse mediante las acciones de endorribonucleasas, tales como ARNasa L, que escinde tanto el ARN celular como vírico. La escisión de la diana de ARN puede detectarse rutinariamente mediante electroforesis en gel y, si es necesario, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica.

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

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

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

55 **G. Formulaciones**

Los compuestos de la invención también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas o de otro tipo, para asistir en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas formulaciones que asisten la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no están limitadas a, los documentos de patente de Estados Unidos N°: 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 65 5.556.948; 5.580.575 y 5.595.756.

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

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

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

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

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

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

Las emulsiones son típicamente sistemas heterogéneos de un líquido disperso en otro en forma de gotas que generalmente exceden 0,1 μm de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersas y el fármaco activo que puede estar presente como solución bien en la fase acuosa, en la fase oleosa o bien por sí mismo como fase separada. Las microemulsiones están incluidas como una realización de la presente invención. Las emulsiones y sus usos son bien conocidas en la técnica y se describen adicionalmente en el documento de patente de Estados Unidos N° 6.287.860.

Las formulaciones divulgadas en el presente documento incluyen formulaciones liposomales. Tal como se usa en la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta por lípidos anfífilos dispuestos en una bicapa o en bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada a partir de material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición que se va a administrar. Los liposomas catiónicos son liposomas cargados positivamente que se cree que interactúan con moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable. Los liposomas que son sensibles al pH

o están cargados negativamente se cree que atrapan el ADN más que acomplejarse con el mismo. Tanto los liposomas catiónicos como los no catiónicos se han usado para proporcionar ADN a las células.

5 Los liposomas también incluyen liposomas “estabilizados estéricamente”, una expresión que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o varios lípidos especializados que, cuando se incorporan a los liposomas, dan como resultado una duración en circulación potenciada con respecto a liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Los ejemplos de liposomas estabilizados estéricamente son aquellos en los que parte de la porción lipídica que forma la vesícula del liposoma comprende uno o varios glucolípidos o está derivatizada con uno o varios polímeros hidrófilos, tales como un resto polietileno glicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en el documento de patente de Estados Unidos N° 6.287.860.

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

20 En una realización, la presente invención usa diversos potenciadores de la penetración para incluir en la administración eficaz de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos. Además de dirigir la difusión de fármacos no lipófilos a través de membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos. Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como que pertenecen a una de cinco categorías amplias, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes. Los potenciadores de la penetración se describen adicionalmente en el documento de patente de Estados Unidos N° 6.287.860.

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

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

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

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

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

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

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

H. Dosificación

La formulación de composiciones terapéuticas y su administración subsiguiente (dosificación) se asume que está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. La dosificación depende de la gravedad y de la respuesta del estado patológico que se va a tratar, con una duración del curso del tratamiento de varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución del estado patológico. La planificación óptima de la dosificación pueden calcularse a partir de mediciones de la acumulación de fármaco en el organismo del paciente. Los expertos pueden determinar fácilmente las dosis óptimas, las metodologías de dosificación y las tasas de repetición. Las dosis óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de oligonucleótidos individuales y pueden estimarse, en general, sobre la base de los CE_{50} que se ha encontrado que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosis varía de 0,01 μ g a 1,00 g por kg de peso corporal y puede administrarse una o más veces al día, a la semana, al mes o al año, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la técnica pueden estimar fácilmente las tasas de repetición para dosificaciones sobre la base del tiempo de residencia medido y las concentraciones de fármaco en fluidos y tejidos corporales. Después de un tratamiento exitoso, puede ser deseable que el paciente se someta a una terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado patológico, en la que el nucleótido se administra en dosis de mantenimiento que varían de 0,01 μ g a 1,00 g por kg de peso corporal, una o varias veces al día a una vez cada 20 años.

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

EJEMPLOS

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

Ejemplo 1: Síntesis de fosforamiditas de nucleósido

Los compuestos siguientes, que incluyen fosforamiditas y sus intermedios se prepararon tal como se describe en el documento de patente de Estados Unidos N° 6.426.220 y en la Publicación de patente internacional N° WO 02/36743; 5'-O-dimetoxitritil-timidina intermedio para 5-metil dC amidita, 5'-O-dimetoxitritil-2'-deoxi-5-metilcitidina intermedio para 5-metil-dC amidita, 5'-O-dimetoxitritil-2'-desoxi-N⁴-benzoil-5-metilcitidina penúltimo intermedio para 5-metil dC amidita, [5'-O-(4,4'-dimetoxitriphenilmetil)-2'-desoxi-N⁴-benzoil-5-metilcitidin-3'-O-il]-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (5-metil dC amidita), 2'-fluorodesoxiadenosina, 2'-fluorodesoxiguanosina, 2'-fluorouridina, 2'-fluorodesoxicidina, 2'-O-(2-metoxietil) amiditas modificadas, intermedio 2'-O-(2-metoxietil)-5-metiluridina, intermedio penúltimo 5'-O-DMT-2'-O-(2-metoxietil)-5-metiluridina, [5'-O-(4,4'-dimetoxitriphenilmetil)-2'-O-(2-metoxietil)-5-metiluridin-3'-O-il]-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (MOE T amidita), intermedio 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-(2-metoxietil)-5-metilcitidina, intermedio penúltimo 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-(2-metoxietil)-N⁴-benzoil-5-metil-citidina, [5'-O-(4,4'-

dimetoxitriifenilmetil)-2'-O-(2-metoxietil)-N⁴-benzoil-5-metilcitol-3'-O-il]-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (MOE 5-Me-C amidita), [5'-O-(4,4'-dimetoxitriifenilmetil)-2'-O-(2-metoxietil)-N⁶-benzoiladenosin-3'-O-il]-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (MOE A amidita), [5'-O-(4,4'-dimetoxitriifenilmetil)-2'-O-(2-metoxietil)-N⁴-isobutirilguanosin-3'-O-il]-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (MOE G amidita), 2'-O-(aminooxietil) nucleósido amiditas y 2'-O-(dimetilaminooxietil) nucleósido amiditas, 2'-(dimetilaminooxietoxi) nucleósido amiditas, 5'-O-terc-butildifenilsilil-O²-2'-anhidro-5-metiluridina, 5'-O-terc-butildifenilsilil-2'-O-(2-hidroxi)etil-5-metiluridina, 2'-O-([2-ftalimidoxi)etil]-5'-t-butildifenilsilil-5-metiluridina, 5'-O-terc-butildifenilsilil-2'-O-[(2-formadoximinooxi)etil]-5-metiluridina, 5'-O-terc-butildifenilsilil-2'-O-[N,N-dimetilaminooxietil]-5-metiluridina, 2'-O-(dimetilaminooxietil)-5-metiluridina, 5'-O-DMT-2'-O-(dimetilaminooxietil)-5-metiluridina, 5'-O-DMT-2'-O-(2-N,N-dimetilaminooxietil)-5-metiluridina-3'-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita], 2'-(aminooxietoxi) nucleósido amiditas, N2-isobutiril-6-O-difenilcarbamoil-2'-O-(2-etilacetil)-5'-O-(4,4'-dimetoxitriifenil)guanosina-3'-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita], 2'-dimetilaminoetoxietoxi (2'-DMAEOE) nucleósido amiditas, 2'-O-[2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)etil]-5-metil uridina, 5'-O-dimetoxitriifenil-2'-O-[2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)-etil]-5-metil uridina y 5'-O-dimetoxitriifenil-2'-O-[2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)-etil]-5-metil uridina-3'-O-(cianoetil-N,N-diisopropil) fosforamidita.

Ejemplo 2: Oligonucleótidos y síntesis de oligonucleótidos

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

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

Los fosforotioatos (P=S) se sintetizan de forma similar a los oligonucleótidos de fosfodiéster con las siguientes excepciones: la tiación se efectuó usando una solución al 10 % p/v de 1,1-dióxido de 3,4-dihidro-1,2-benzoditiol-3-ona en acetonitrilo para la oxidación de los enlaces de fosfito. El tiempo de la etapa de reacción de tiación se aumentó a 180 s y fue precedida por la etapa normal de remate. Después de escisión a partir de la columna CPG y desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55 °C (12-16 h), los oligonucleótidos se recuperaron por precipitación con >3 volúmenes de etanol de una solución 1 M de NH₄OA. Los oligonucleótidos de fosfinato se preparan tal como se describe en el documento de patente de Estados Unidos N° 5.508.270.

Los oligonucleótidos de fosfonato de alquilo se preparan tal como se describe en el documento de patente de Estados Unidos N° 4.469.863.

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

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

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

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

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

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

Los oligonucleósidos unidos a formacetal y tiformacetal se preparan tal como se describe en los documentos de

patente de Estados Unidos N° 5.264.562 y 5.264.564.

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

5

Ejemplo 3: Síntesis de ARN

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

15

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

20

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

25

Siguiendo con la síntesis, los grupos protectores de metilo en los fosfatos se escinden en 30 minutos usando 2-carbamoil-2-cianoetilen-1,1-ditiolato de disodio trihidrato (S_2Na_2) 1 M en DMF. La solución de desprotección se lava a partir del oligonucleótido unido al soporte sólido usando agua. Después, el soporte se trata con metilamina al 40 % en agua durante 10 minutos a 55 °C. Esto libera los oligonucleótidos de ARN a la solución, desprotege las aminas exocíclicas y modifica los grupos 2'. En este estado pueden analizarse los oligonucleótidos mediante HPLC de intercambio aniónico.

30

35

Los grupos 2'-ortoéster son los últimos grupos de protección que se eliminan. El grupo protector de ortoéster de monoacetato de etilenglicol desarrollado por Dharmacon Research, Inc. (Lafayette, CO, Estados Unidos) es un ejemplo de un grupo protector de ortoéster útil que tiene las siguientes propiedades importantes. Es estable en las condiciones de síntesis de fosforamidita de nucleósidos y la síntesis de oligonucleótidos. No obstante, después de la síntesis de oligonucleótido, el oligonucleótido se trata con metilamina, que no sólo escinde el oligonucleótido del soporte sólido, sino que también elimina los grupos acetilo de los ortoésteres. Los sustituyentes 2-etilhidroxilo resultantes en el ortoéster son menos electroaceptores que su precursor acetilado. Como resultado, el ortoéster modificado se vuelve más lábil frente a la hidrólisis catalizada por ácidos. Específicamente, la velocidad de escisión es aproximadamente 10 veces más rápida después de eliminar los grupos acetilo. Por lo tanto, este ortoéster posee suficiente estabilidad con el fin de ser compatible con la síntesis de oligonucleótidos y ahora, cuando se modifica subsiguientemente, permite que la desprotección se realice en condiciones acuosas relativamente templadas compatibles con el producto de oligonucleótido de ARN final.

40

45

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

50

55

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

60

65

Ejemplo 4: Síntesis de oligonucleótidos quiméricos

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

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

Los oligonucleótidos quiméricos que tienen segmentos de oligonucleótidos de 2'-O-alkil fosforotioato y de 2'-desoxi fosforotioato se sintetizan usando un sintetizador de ADN automático de Applied Biosystems modelo 394, como anteriormente. Los oligonucleótidos se sintetizan usando el sintetizador automático y 2'-desoxi-5'-dimetoxitritil-3'-O-fosforamidita para la porción de ADN y 5'-dimetoxitritil-2'-O-metil-3'-O-fosforamidita para los flancos 5' y 3'. El ciclo de síntesis estándar se modifica incorporando etapas de acoplamiento con tiempos de reacción aumentados para la 5'-dimetoxitritil-2'-O-metil-3'-O-fosforamidita. El oligonucleótido totalmente protegido se escinde del soporte y se desprotege en amoniaco concentrado (NH₄OH) durante 12-16 h a 55 °C. El oligo desprotegido se recupera después usando un procedimiento apropiado (precipitación, cromatografía en columna, volumen reducido al vacío y se analiza espectrofotométricamente para determinar el rendimiento y la pureza por electroforesis capilar y espectrometría de masas.

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

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

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

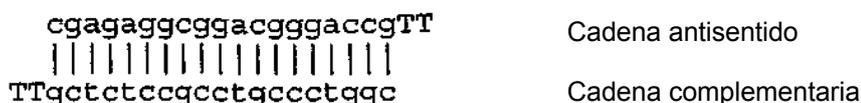
Los oligonucleótidos quiméricos de [2'-O-(2-metoxietil)fosfodiéster]--[2'-desoxi fosforotioato]--[2'-O-(metoxietil) fosfodiéster] se prepararon igual que en el procedimiento anterior para oligonucleótidos de 2'-O-metilo quiméricos con la sustitución de 2'-O-(metoxietil) amiditas por las 2'-O-metil amiditas, oxidación con yodo para generar las uniones entre nucleótidos fosfodiéster dentro de las porciones de los flancos de las estructuras quiméricas y la sulfuración usando 1,1-dióxido de 3,4,5-trisubstituido-1,2,4-benzoditiol-3-ona (Beaucage Reagent) para generar las uniones fosforotioato entre nucleótidos para el hueco central.

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

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

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

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



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

5 **cgagagggcggacgggaccg** Cadena antisentido
 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
 gctctccgcctgccctggc Cadena complementaria

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

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

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

30 **Ejemplo 6: Aislamiento de oligonucleótidos**

35 Después de la escisión a partir del soporte sólido de vidrio poroso controlado y de desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55 °C durante 12-16 horas, los oligonucleótidos u oligonucleótidos se recuperan por precipitación de NH₄OAC 1 M con >3 volúmenes de etanol. Los oligonucleótidos sintetizados se analizaron por electroscopía de masas por electropulverización (determinación del peso molecular) y por electroforesis en gel capilar y se determinó que eran al menos en el 70 % material de cadena completa. Las cantidades relativas de uniones fosforotioato y fosfodiéster obtenidas en la síntesis se determinaron mediante la relación del peso molecular correcto con respecto al producto de -16 uma (+/-32 +/-48). Para algunos estudios los oligonucleótidos se purificaron por HPLC, tal como se describe por Chiang y col., J. Biol. Chem. 1991, 266, 18162-18171. Los resultados obtenidos con material purificado por HPLC fueron similares a los obtenidos con material no purificado por HPLC.

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

45 Los oligonucleótidos se sintetizaron mediante química de fosforamidita en fase sólida P(III) en un sintetizador automático capaz de ensamblar 96 secuencias simultáneamente en un formato de 96 pocillos. Las uniones entre nucleótidos fosfordiéster se realizaron por oxidación con yodo acuoso. Las uniones entre nucleótidos fosforotioato se generaron por sulfuración usando 1,1-dióxido de 3, H-1,2-benzoditioil-3-ona (Beaucage Reagent) en acetonitrilo anhidro. Las beta-cianoetil-diiso-propil fosforamiditas protegidas de bases se adquirieron de proveedores comerciales (por ejemplo, PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos, o Pharmacia, Piscataway, NJ, Estados Unidos). Los nucleósidos no estándar se sintetizaron como para los procedimientos estándar o patentados. Se utilizan como beta-cianoetildisopropil fosforamiditas protegidas de bases.

50 Los oligonucleótidos se escindieron del soporte y se desprotegeron con NH₄OH concentrado a temperatura elevada (55-60 °C) durante 12-16 horas y el producto liberado se secó después al vacío. El producto seco se resuspendió después en agua estéril para proporcionar una placa maestra a partir de la cual se diluyeron después todas las muestras de placas analíticas y de ensayo usando un pipeteador automático.

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

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

compuestos de la placa tenían al menos el 85 % de longitud completa.

Ejemplo 9: Cultivo celular y tratamiento de oligonucleótidos

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

Células T-24:

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

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

Células A549:

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

Células NHDF:

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

Células HEK:

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

Células HepG2:

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

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

Células Hep3B:

65

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

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

Hepatocitos de ratón primarios:

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

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

Hepatocitos de rata primarios:

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

Tratamiento con compuestos antisentido:

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

La concentración de oligonucleótido usado varía de línea celular a línea celular. Para determinar la concentración óptima de oligonucleótido para una línea celular particular, las células se trataron con un oligonucleótido de control positivo a una variedad de concentraciones. Para células humanas el oligonucleótido de control positivo se selecciona de bien ISIS 13920 (**TCCGT-CATCGCTCCTCAGGG**, SEC ID N°: 1) que está dirigido a H-ras humano, o bien ISIS 18078, (GT-GCGCGCGAGCCCGAAATC, SEC ID N°: 2) que está dirigido a quinasa Jun-N-terminal 2 (JNK2) humana. Ambos controles con 2'-O-metoxietil *gapmers* (2'-O-metoxietilos se muestran en negrita) con un esqueleto de fosforotioato. Para células de ratón o rata, el oligonucleótido de control positivo es ISIS 15770, **ATGCATTCTGCCCAAGGA**, SEC ID N°: 3, un 2'-O-metoxietil *gapmer* (2'-O-metoxietilo se muestra en negrita) con un esqueleto de fosforotioato que está dirigido a c-raf tanto de ratón como de rata. La concentración de oligonucleótido de control positivo que da como resultado un 80 % de inhibición de ARNm de c-H-ras (para ISIS 13920), JNK2 (para ISIS 18078) o c-raf (para ISIS 15770) se usa después como la concentración para seleccionar nuevos nucleótidos en experimentos subsiguientes para esa línea celular. Si no se logra una inhibición del 60 %, la concentración más baja de oligonucleótido de control positivo que da como resultado una inhibición del 60 % de ARNm de c-H-ras, JNK2 o c-raf se usa después como la concentración para seleccionar nuevos nucleótidos en experimentos subsiguientes para esa línea celular. Si no se logra el 60 % de inhibición, esa línea celular particular se considera inadecuada para los experimentos de transfección de oligonucleótidos. Las concentraciones de oligonucleótidos antisentido que se usan en el presente documento son de 50 nM a 300 nM.

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

La modulación antisentido de la expresión de apolipoproteína C-III puede analizarse mediante una variedad

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

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

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

Ensayos fenotípicos

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

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

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

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

*Estudios *in vivo**

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

El ensayo clínico se somete a controles rigurosos para asegurar que no se ponga en riesgo innecesariamente a los individuos y que éstos estén informados de su papel en el estudio. Para justificar los efectos psicológicos de los tratamientos que se van a recibir, a los voluntarios se les administró aleatoriamente placebo o inhibidor de la apolipoproteína C-III. Además, para evitar que los médicos estuvieran predispuestos con respecto a los

tratamientos, no se les informó de si la medicación que van a administrar es un inhibidor de la apolipoproteína C-III o un placebo. Usando este enfoque de aleatoriedad, cada voluntario tiene la misma posibilidad de que se le administre el nuevo tratamiento o el placebo.

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

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

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

25

Ejemplo 12: Aislamiento de ARN

Aislamiento de ARNm de Poli(A)+

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

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

45

Aislamiento de ARN total

El ARN total se aisló usando un kit RNEASY 96™ y tampones adquiridos de Qiagen Inc. (Valencia, CA, Estados Unidos) siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante. Brevemente, para células cultivadas en placas de 96 pocillos, el medio de crecimiento se retiró de las células y cada pocillo se lavó con 200 µl de PBS frío. Se añadieron a cada pocillo 150 µl de tampón RLT y la placa se agitó vigorosamente durante 20 segundos. Después se añadieron a cada pocillo 150 µl de etanol al 70 % y los contenidos se mezclaron pipeteando tres veces hacia arriba y hacia abajo. Después se transfirieron las muestras a una placa RNEASY 96™ de 96 pocillos unida a un colector QIAVAC™ equipado con una bandeja de recogida de desechos y unido a una fuente de vacío. Se aplicó vacío durante
50 1 minuto. Se añadieron 500 µl de tampón RW1 a cada pocillo de la placa RNEASY 96™ y se incubaron durante 15 minutos y se aplicó de nuevo vacío durante 1 minuto. Se añadieron 500 µl adicionales de tampón RW1 a cada pocillo de la placa RNEASY 96™ y se aplicó vacío durante 2 minutos. Después se añadió 1 ml de tapón RPE a cada pocillo de la placa RNEASY 96™ y se aplicó vacío durante un periodo de 90 segundos. Después se repitió el lavado con tampón RPE y se aplicó vacío durante 3 minutos adicionales. Después se retiró la placa del colector QIAVAC™ y se transfirió sobre toallas de papel para que se secase. Después se volvió a unir la placa al colector QIAVAC™ equipado con una gradilla de tubos de recolección que contenía tubos de recolección de 1,2 ml. Después se eluyó el ARN pipeteando 140 µl de ARNasa exenta de agua a cada pocillo, incubando durante 1 minuto y, después, aplicando vacío durante 3 minutos.

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

9604 (Qiagen, Inc., Valencia, CA, Estados Unidos). Esencialmente, después de lisar las células en la placa de cultivo, la placa se transfiere a una cubierta robótica en la que se llevaron a cabo las etapas de pipeteo, tratamiento de ADNasa y de elución.

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

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

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

Los reactivos de PCR se obtuvieron de Invitrogen Corporation, (Carlsbad, CA, Estados Unidos). Las reacciones de RT-PCR se realizaron añadiendo 20 µl de cóctel de PCR (2,5 x tampón PCR menos MgCl₂, MgCl₂ 6,6 mM, dATP, dCTP, dGTP y dTTP, cada uno 375 µM, cebador directo y cebador inverso, cada uno 375 nM, sonda 125 nM, 4 unidades de inhibidor de ARNasa, 1,25 unidades de PLAT-INUM® Taq, 5 unidades de transcriptasa inversa MuLV y 2,5 x colorante ROX) a placas de 96 pocillos que contenían 30 µl de solución de ARN total (20-200 ng). La reacción a tiempo real se llevó a cabo por incubación durante 30 minutos a 48 °C. Siguiendo a 10 minutos de incubación a 95 °C para activar el PLATINUM® Taq, se llevaron a cabo 40 ciclos de un protocolo de PCR de dos etapas: 95 °C durante 15 segundos (desnaturalización) seguidos de 60 °C durante 1,5 minutos (alineamiento/extensión).

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

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

Las sondas y los cebadores de apolipoproteína C-III humana se diseñaron para que se hibridaran con una

secuencia de apolipoproteína C-III humana usando información de secuencias publicada (nucleótidos 6238608 a 6242565 de la secuencia de número de acceso del GenBank NT_035088.1, que se incorpora al presente documento como SEC ID N°: 4). Para la apolipoproteína C-III humana los cebadores de PCR fueron: cebador directo: TCAGCTTCATGCAGGGTTACAT (SEC ID N°: 5) cebador inverso: ACGCTGCTCAGTGCATCCT (SEC ID N°: 6) y la sonda PCR fue: FAM-AAGCACGCCACCAAGACCGCC-TAMRA (SEC ID N°: 7) en la que FAM es el colorante fluorescente y TAMRA es el colorante inactivador. Para GAPDH humano los cebadores PCR fueron: cebador directo: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC (SEC ID N°: 8) cebador inverso: GAAGATGGTGATGGGATTTT GGGTCTCGCTCCT-GGAAGAT (SEC ID N°: 9) y la sonda PCR fue: 5' JOE-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC- TAMRA 3' (SEC ID N°: 10) en la que JOE es el colorante fluorescente y TAMRA es el colorante inactivador.

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

cebador directo: GGCAAATTCACGGCACAGT (SEC ID N°: 15)
cebador inverso: GGGTCTCGCTCCTGGAAGAT (SEC ID N°: 16) y la

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

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

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

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

Para detectar la apolipoproteína C-III de ratón se preparó una sonda específica de apolipoproteína PCR de ratón usando el cebador directo TGCAGGGCTACATGGAACAA (SEC ID N°: 12) y el cebador inverso CGGACTCCT-GCAGCTACTT (SEC ID N°: 13). Para normalizar por variaciones en la eficacia en la carga y la transferencia se retiraron membranas y se analizaron para evaluar el ARN de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de ratón (Clontech, Palo Alto, CA, Estados Unidos).

Las membranas hibridadas se visualizaron y cuantificaron usando un aparato PHOSPHORIMAGER™ y el programa informático IM-AGEQUANT™ V3.3 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, Estados Unidos). Los datos se normalizaron a niveles de GAPDH en controles no tratados.

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

Se diseñó una serie de compuestos antisentido para dirigirlos a regiones diferentes de ARN de apolipoproteína C-III humana, usando secuencias publicadas (nucleótidos 6238608 a 6242565 de número de acceso del GenBank NT_035088.1, que representa una secuencia genómica que se incorpora al presente documento como SEC ID N°: 4, y el número de acceso del GenBank NM_000040.1, que se incorpora al presente documento como SEC ID N°: 18). Los compuestos se muestran en la tabla 1. "Sitio diana" indica el primer nucleótido (extremo 5') numerado en la secuencia diana particular al que se une el compuesto. Todos los compuestos de la tabla 1 son oligonucleótidos quiméricos ("gapmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos por una región "hueco" que consta de diez 2'-desoxi-nucleótidos, que están flanqueados por ambos lados (direcciones 5' y 3') por "flancos" de cinco nucleótidos.

Los flancos están compuestos por 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, también conocidos como (2'-MOE) nucleótidos. Las uniones entre nucleósidos (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los restos de citidina son 5-metilcitidinas. Los compuestos se analizan para determinar su efecto sobre niveles de ARNm de apolipoproteína C-III humana mediante PCR cuantitativa en tiempo real tal como se describe en otros ejemplos en el presente documento. Los datos son datos promedio de los tres experimentos en los que se trataron células HepG2 con los oligonucleótidos antisentido. El control positivo para cada dato puntual se identifica en la tabla por el número de secuencia ID. Si está presente, "N.D." indica "sin datos".

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

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

	ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	%DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º	SECUENCIA CONTROL SEC ID N.º
5	167824	5'UTR	4	414	ctggagcagctgcctctagg	79	19	1
10	167835	Codificante	4	1292	ccctgcatgaagctgagaag	60	20	1
	167837	Codificante	18	141	gtgcttcatgtaaccctgca	88	21	1
	167846	Codificante	4	1369	tggcctgctgggcccacctgg	66	22	1
15	167848	Codificante	4	3278	tgctccagtagctttcagg	81	23	1
	167851	Codificante	4	3326	tgacctcagggtccaaatcc	41	24	1
	304739	5'UTR	4	401	ctctagggatgaactgagca	62	25	1
20	304740	5'UTR	4	408	cagctgcctctagggatgaa	44	26	1
	304741	5'UTR	18	17	ttcctggagcagctgcctct	57	27	1
	304742	5'UTR	18	24	acctctgttctggagcagc	78	28	1
25	304743	Codón de inicio	18	29	atggcacctctgttctgga	78	29	1
	304744	Codón de inicio	4	1065	gggctgcatcggcacctctgt	73	30	1
	304745	Codificante	4	1086	ggcaacaacaaggagtacc	90	31	1
30	304746	Codificante	4	1090	ggagggcaacaacaaggagt	80	32	1
	304747	Codificante	18	87	agctcggcagaggccagga	49	33	1
	304748	Codificante	18	92	tctgaagctcggcagaggc	72	34	1
35	304749	Codificante	18	97	cggcctctgaagctcgggca	11	35	1
	304750	Codificante	4	1267	catcctcggcctctgaagct	49	36	1
	304751	Codificante	4	1273	gggaggcatcctcggcctct	65	37	1
40	304752	Codificante	4	1278	gagaaggaggatcctcgg	82	38	1
	304753	Codificante	4	1281	gctqagaaggagqcatcct	75	39	1
	304754	Codificante	4	1289	tgcatgaagctgagaaggga	74	40	1
45	304755	Codificante	18	143	gcgtgcttcatgtaaccctg	95	41	1
	304756	Codificante	4	1313	ttggtggcgtgcttcatgta	92	42	1
	304757	Codificante	4	1328	gcatcctggcggcttgggt	98	43	1
50	304758	Codificante	4	1334	ctcagtgatccttggcggt	97	44	1
	304759	Codificante	4	1336	tgctcagtcaccttggcg	93	45	1
	304760	Codificante	4	1347	ctcctgcacgctgctcagtg	65	46	1
55	304761	Codificante	4	1349	gactcctgcacgctgctcag	77	47	1
	301762	Codificante	4	1358	gccacctgggactcctgcac	89	48	1
	304763	Codificante	18	210	gcccctggcctgctgggcca	71	49	1

60

65

ES 2 666 405 T3

(continuación)

	ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	%DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º	SECUENCIA CONTROL SEC ID N.º
5	304764	Codificante	18	211	agcccctggcctgctgggcc	62	50	1
	304765	Codificante	4	3253	gaagccatcggtcaccacgc	71	51	1
10	304766	Codificante	4	3255	ctgaagccatcggtcaccca	85	52	1
	304767	Codificante	4	3265	tttcagggaaactgaagccat	73	53	1
	304768	Codificante	4	3273	cagtagctttcagggaaact	40	54	1
15	304769	Codificante	4	3283	aacgggtgctccagtagctt	66	55	1
	304770	Codificante	4	3287	cctaacgggtgctccagtag	88	56	1
	304771	Codificante	4	3295	gaactgtccttaacgggtgc	59	57	1
20	304772	Codificante	4	3301	ctcagagaactgtccttaa	88	58	1
	304773	Codificante	4	3305	agaactcagagaactgtcc	75	59	1
	304774	Codificante	4	3310	atcccagaactcagagaact	0	60	1
25	304775	Codificante	4	3320	caggggtccaaatcccagaac	70	61	1
	304776	Codificante	4	3332	ttgggtctgacctcaggggtcc	90	62	1
	304777	Codificante	4	3333	gtgggtctgacctcaggggtc	84	63	1
30	304778	Codificante	4	3339	gctgaagttgggtgacctc	81	64	1
	304779	Codificante	4	3347	cagccacgggtgaagttggt	75	65	1
	304780	Codón de detención	4	3351	caggcagccacgggtgaagt	83	66	1
35	304781	Codón de detención	4	3361	attgaggctcaggcagcca	79	67	1
	304782	3'UTR	4	3385	tgatagggcaggtggacttg	64	68	1
	304783	3'UTR	18	369	ctcgaggatggataggcag	76	69	1
40	304784	3'UTR	18	374	aggagctgcaggatggata	58	70	1
	304785	3'UTR	18	380	gaccaaggagctgcagga	73	71	1
	304786	3'UTR	18	385	tgcaggacccaaggagctcg	92	72	1
45	304787	3'UTR	4	3417	tggagattgcaggacccaag	88	73	1
	304788	3'UTR	4	3422	agccctggagattgcaggac	69	74	1
	304789	3'UTR	4	3425	ggcagccctggagattgcag	76	75	1
50	304790	3'UTR	4	3445	cctttaagcaacctacagg	65	76	1
	304791	3'UTR	4	3450	ctgtccctttaagcaacct	53	77	1
	304792	3'UTR	4	3456	agaatactgtccctttaag	72	78	1
55	304793	3'UTR	4	3461	cactgagaatactgtccctt	67	79	1
	304794	3'UTR	4	3469	taggagagcactgagaatac	59	80	1
	304795	3'UTR	4	3472	gggtaggagagcactgagaa	74	81	1
	304796	3'UTR	4	3509	aggccagcatgctggaggg	63	82	1
60	304797	3'UTR	4	3514	ttgggagccagcatgcctg	55	83	1
	304798	3'UTR	4	3521	agcttattgggagccagc	90	84	1

65

(continuación)

ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	%DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º	SECUENCIA CONTROL SEC ID N.º
5							
10							
15							
20							
25							
30							

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

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

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

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

	ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	% DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º
5	167858	5'UTR	11	1	tagggataaaactgagcagg	47	97
10	167859	5'UTR	11	21	ctggagtagctagctgcttc	30	98
	167860	Codón de inicio	11	41	gctgcatggcacctacgtac	80	99
15	167861	Codificante	11	62	ccacagtgaggagcgccgg	86	100
	167862	Codificante	11	88	ggcagatgccaggagagcc a	55	101
	167863	Codificante	11	104	ctacctctcagctcgggca	56	102
20	167864	Codificante	11	121	cagcagcaaggatccctcta	83	103
	167865	Codificante	11	131	gcacagagcccagcagcaa g	49	104
25	167867	Codificante	11	215	ccctggccaccgcagctata	67	105
	167868	Codificante	11	239	atctgaagtgattgtccatc	11	106
	167869	Codificante	11	254	agtagccttcaggaatctg	57	107
30	167870	Codificante	11	274	ctgtcagtaaactgtctcc	89	108
	167871	Codificante	11	286	gaagccggtgaactgtcag	55	109
	167872	Codificante	11	294	gaatcccagaagccggtgaa	29	110
35	167873	Codificante	11	299	ggtagaatcccagaagccg	55	111
	167874	Codificante	11	319	tggagttggtgtcctcag	79	112
	167875	Codón de detención	11	334	tcacgactcaatagctggag	77	113
40	167877	3'UTR	11	421	ccctaaagcaaccttcagg	71	114
	167878	3'UTR	11	441	agacatgagaacatacttc	81	115
	167879	3'UTR	11	471	catgttagtgagatctag	87	116
45	167880	3'UTR	11	496	tcttatccagctttattagg	98	117

Tal como se muestra en la tabla 2, las SEC ID N° 97, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 107, 108, 109, 111, 112, 113, 114, 115, 116 y 117 mostraron al menos un 45 % de inhibición de la expresión de la apolipoproteína C-III de ratón en este experimento y son, por lo tanto, preferentes. Son más preferentes las secuencias SEC ID N° 117, 116 y 100. Las regiones diana a las que estas secuencias preferentes son complementarias se denominan en el presente documento "segmentos diana preferentes" y son preferentes, por lo tanto, como diana para los compuestos de la presente divulgación. Estos segmentos diana preferentes se muestran en la tabla 3. Las secuencias representan el complemento inverso de los compuestos antisentido preferentes que se muestran en la tabla 2. Se muestra que estas secuencias contienen timina (T) pero un experto en la técnica apreciará que la timina (T) se reemplaza generalmente por uracilo (U) en secuencias de ARN. "Sitio diana" indica el primer nucleótido (extremo 5') numerado en un ácido nucleico diana particular el que se une el oligonucleótido. En la tabla 3 se muestran también las especies en las que se han encontrado cada uno de los segmentos diana preferentes.

60

65

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

SITIO ID	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	ASOCIADO INVERSO DE SEC ID	ACTIVO EN	SEC ID N.º	
5	82975	4	414	cctagaggcagctgctccag	19	<i>H. sapiens</i>	118
	82980	4	1292	cttctcagctcatgcaggg	20	<i>H. sapiens</i>	119
10	82981	18	141	tgccaggttacatgaagcac	21	<i>H. sapiens</i>	120
	82985	4	1369	ccaggtggcccagcaggcca	22	<i>H. sapiens</i>	121
	82987	4	3278	cctgaagactactggagca	23	<i>H. sapiens</i>	122
15	220510	4	401	tgctcagttcatccctagag	25	<i>H. sapiens</i>	123
	220512	18	17	agaggcagctgctccaggaa	27	<i>H. sapiens</i>	124
	220513	18	24	gctgctccaggaacagaggt	28	<i>H. sapiens</i>	125
20	220514	18	29	tccaggaacagaggtgccat	29	<i>H. sapiens</i>	126
	220515	4	1065	acagaggtgccatgcagccc	30	<i>H. sapiens</i>	127
	220516	4	1086	gggtactcctgtgtgtgcc	31	<i>H. sapiens</i>	128
25	220517	4	1090	actcctgtgtgtgccctcc	32	<i>H. sapiens</i>	129
	220518	18	87	tcctggcctctgcccagct	33	<i>H. sapiens</i>	130
	220519	18	92	gcctctgcccagcttcaga	34	<i>H. sapiens</i>	131
30	220521	4	1267	agcttcagaggccagagatg	36	<i>H. sapiens</i>	132
	220522	4	1273	agaggccagagatgcctccc	37	<i>H. sapiens</i>	133
	220523	4	1278	ccgaggatgcctcctctc	38	<i>H. sapiens</i>	134
35	220524	4	1281	aggatgcctcctctcagc	39	<i>H. sapiens</i>	135
	220525	4	1289	tcctctcagctcatgca	40	<i>H. sapiens</i>	136
	220526	18	143	cagggttacatgaagcacgc	41	<i>H. sapiens</i>	137
40	220527	4	1313	tacatgaagcacgccaccaa	42	<i>H. sapiens</i>	138
	220528	4	1328	accaagaccgccaaggatgc	43	<i>H. sapiens</i>	139
	220529	4	1334	accgccaaggatgcactgag	44	<i>H. sapiens</i>	140
45	220530	4	1336	cgccaaggatgcactgagca	45	<i>H. sapiens</i>	141
	220531	4	1347	cactgagcagcgtgcaggag	46	<i>H. sapiens</i>	142
	220532	4	1349	ctgagcagcgtgcaggagtc	47	<i>H. sapiens</i>	143
50	220533	4	1358	gtgcaggatcccaggtggc	48	<i>H. sapiens</i>	144
	220534	18	210	tggcccagcaggccaggggc	49	<i>H. sapiens</i>	145
	220535	18	211	ggcccagcaggccaggggct	50	<i>H. sapiens</i>	146
55	220536	4	3253	gctgggtgaccgatggcttc	51	<i>H. sapiens</i>	147
	220537	4	3255	tgggtgaccgatggcttcag	52	<i>H. sapiens</i>	148
	220538	4	3265	atggctcagttccctgaaa	53	<i>H. sapiens</i>	149
60	220540	4	3283	aagactactggagcaccgtt	55	<i>H. sapiens</i>	150
	220541	4	3287	ctactggagcaccgtaagg	56	<i>H. sapiens</i>	151

ES 2 666 405 T3

(continuación)

	SITIO ID	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	ASOCIADO INVERSO DE SEC ID	ACTIVO EN	SEC ID N.º
5	220542	4	3295	gcaccgtaaggacaagttc	57	<i>H. sapiens</i>	152
	220543	4	3301	ftaaggacaagttctctgag	58	<i>H. sapiens</i>	153
10	220544	4	3305	ggacaagttctctgagttct	59	<i>H. sapiens</i>	154
	220546	4	3320	gttctgggatttgaccctg	61	<i>H. sapiens</i>	155
	220547	4	3332	ggaccctgaggtcagaccaa	62	<i>H. sapiens</i>	156
15	220548	4	3333	gaccctgaggtcagaccaac	63	<i>H. sapiens</i>	157
	220549	4	3339	gaggtcagaccaactcagc	64	<i>H. sapiens</i>	158
	220550	4	3347	accaactcagccgtggctg	65	<i>H. sapiens</i>	159
20	220551	4	3351	acttcagccgtggctgcctg	66	<i>H. sapiens</i>	160
	220552	4	3361	tggtgcctgagacctcaat	67	<i>H. sapiens</i>	161
	220553	4	3385	caagtcacctgcctatcca	68	<i>H. sapiens</i>	162
25	220554	18	369	ctgcctatccatctgcgag	69	<i>H. sapiens</i>	163
	220555	18	374	tatccatcctgcgagctcct	70	<i>H. sapiens</i>	164
	220556	18	380	tcctgcgagctcctgggtc	71	<i>H. sapiens</i>	165
30	220557	18	385	cgagctcctgggtcctgca	72	<i>H. sapiens</i>	166
	220558	4	3417	cttgggtcctgcaatctcca	73	<i>H. sapiens</i>	167
	220559	4	3422	gtcctgcaatctccagggt	74	<i>H. sapiens</i>	168
35	220560	4	3425	ctgcaatctccagggtgcc	75	<i>H. sapiens</i>	169
	220561	4	3445	cctgtaggtgctaaaagg	76	<i>H. sapiens</i>	170
	220562	4	3450	aggttgctaaaaggacag	77	<i>H. sapiens</i>	171
40	220563	4	3456	ctaaaaggacagtattct	78	<i>H. sapiens</i>	172
	220564	4	3461	aaggacagtattctcagtg	79	<i>H. sapiens</i>	173
	220565	4	3469	gtattctcagtgctctcta	80	<i>H. sapiens</i>	174
45	220566	4	3472	ttctcagtgctctctaccc	81	<i>H. sapiens</i>	175
	220567	4	3509	ccctccagcatgctggcct	82	<i>H. sapiens</i>	176
	220568	4	3514	caqqcatgctggcctcccaa	83	<i>H. sapiens</i>	177
50	220569	4	3521	gctggcctccaataaagct	84	<i>H. sapiens</i>	178
	220570	4	3526	cctccaataaagctggaca	85	<i>H. sapiens</i>	179
	220571	4	3528	tccaataaagctggacaag	86	<i>H. sapiens</i>	180
55	220572	4	3533	ataaagctggacaagaagct	87	<i>H. sapiens</i>	181
	220573	4	3539	ctggacaagaagctgctatg	88	<i>H. sapiens</i>	182
	220574	4	416	tagaggcagctgctccaggt	89	<i>H. sapiens</i>	183
60	220575	4	424	gctgctccaggtaatgcct	90	<i>H. sapiens</i>	184
	220576	4	1053	ttcctgcaggaacagaggt	91	<i>H. sapiens</i>	185
	220577	4	1121	gcctctgcccgaagcactt	92	<i>H. sapiens</i>	186
65	220578	4	1380	agcaggccaggtacaccgc	93	<i>H. sapiens</i>	187

(continuación)

	SITIO ID	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	ASOCIADO INVERSO DE SEC ID	ACTIVO EN	SEC ID N.º
5	220579	4	2337	gtgcagttcacaacagggtt	94	<i>H. sapiens</i>	188
	220580	4	2405	ctcaggcggtattqctcact	95	<i>H. sapiens</i>	189
10	220581	4	2542	cctgacctaatcaagcccg	96	<i>H. sapiens</i>	190
	82997	11	1	cctgctcagttttatcccta	97	<i>M. musculus</i>	191
	82999	11	41	gtacgtaggtgcatgcagc	99	<i>M. musculus</i>	192
15	83000	11	62	cgggacgctcctcactgtgg	100	<i>M. musculus</i>	193
	83001	11	88	tggctctcctggcatctgcc	101	<i>M. musculus</i>	194
	83002	11	104	tgccgagctgaagaggtag	102	<i>M. musculus</i>	195
20	83003	11	121	tagagggatcctgtctgctg	103	<i>M. musculus</i>	196
	83004	11	131	cttgctgctgggctctgtgc	104	<i>M. musculus</i>	197
	83006	11	215	tatagctgctggccaggg	105	<i>M. musculus</i>	198
25	83008	11	254	cagattcctgaaaggctact	107	<i>M. musculus</i>	199
	83009	11	274	ggagcaagttactgacaag	108	<i>M. musculus</i>	200
	83010	11	286	ctgacaagttaccggcttc	109	<i>M. musculus</i>	201
30	83012	11	299	cggcttctgggattctaacc	111	<i>M. musculus</i>	202
	83013	11	319	ctgaggaccaaccaactcca	112	<i>M. musculus</i>	203
	83014	11	334	ctccagctattgagtcgtga	113	<i>M. musculus</i>	204
35	83016	11	421	cctgaaggttgcttaaggg	114	<i>M. musculus</i>	205
	83017	11	441	gaaagtatgttctcatgtct	115	<i>M. musculus</i>	206
	83018	11	471	ctagatctcacctaaacatg	116	<i>M. musculus</i>	207
40	83019	11	496	cctaataaagctggataaga	117	<i>M. musculus</i>	208

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

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

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

Se diseñó una serie adicional de compuestos antisentido para dirigirlos a regiones diferentes de ARN de apolipoproteína C-III humana, usando secuencias publicadas (nucleótidos 6238608 a 6242565 de número de acceso del GenBank NT_035088.1, que representa una secuencia genómica que se incorpora al presente documento como SEC ID N°: 4, y el número de acceso del GenBank NM_000040.1, que se incorpora al presente documento como SEC ID N°: 18). Los compuestos se muestran en la tabla 4. "Sitio diana" indica el primer nucleótido (extremo 5') numerado en la secuencia diana particular al que se une el compuesto. Todos los compuestos de la tabla 4 son oligonucleótidos quiméricos ("gapmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos por una región "hueco" que consta de diez 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada por ambos lados (direcciones 5' y 3') por "flancos" de cinco nucleótidos. Los flancos están compuestos por 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, también conocidos como (2'-MOE) nucleótidos. Las

uniones entre nucleósidos (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los restos de citidina son 5-metilcitidinas. Los compuestos se analizan para determinar su efecto sobre niveles de ARNm de apolipoproteína C-III mediante PCR cuantitativa en tiempo real tal como se describe en otros ejemplos en el presente documento. Los datos son datos promedios de tres experimentos en los que se trataron células HepG2 con los oligonucleótidos antisentido. Si están presentes, "N.D." indica "sin datos".

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

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

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

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

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

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

Estos datos demuestran que la expresión de apolipoproteína C-III está inhibida de un modo dependiente de la dosis después del tratamiento de células con compuestos antisentido dirigidos a apolipoproteína C-III. Estos compuestos se analizaron adicionalmente en células Hep3B para determinar su capacidad para reducir los niveles de ARNm en células Hep3B y se determinó que ISIS 167842 y 167837 inhibieron la expresión de apolipoproteína C-III de un modo dependiente de la dosis en esta línea celular también.

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

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

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

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

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

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

Los análisis de inmunotransferencia (Western) se realizaron usando procedimientos estándar. Las células se recogieron 16-20 h después del tratamiento con oligonucleótido y se lavaron una vez con PBS, suspendido en tampón Laemmli (100 µl/pocillo), se hirvieron durante 5 minutos y se cargaron en un gel SDS-PAGE al 16 %. El gel se somete a

150 V durante 1,5 horas y se transfiere a membranas para el análisis de inmunotransferencia (Western). Se usa un anticuerpo primario apropiado dirigido a la apolipoproteína C-III, con un anticuerpo secundario radioetiquetado o etiquetado fluorescentemente dirigido contra las especies de anticuerpo primario. Las bandas se visualizaron usando un instrumento PHOSPHORIMAGER™ (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA, Estados Unidos).

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

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

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

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

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

30 Los ratones alimentados con dieta rica en grasas con ISIS 167880 mostraron una reducción tanto en colesterol (196 mg/dl para animales control y 137 mg/dl para ISIS 167880) como en triglicéridos (151 mg/dl para animales control y 58 mg/dl para ISIS 167880) en suero al finalizar el estudio.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

167880, en comparación con 92 UI/l para el control salino).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

solución salina.

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

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

	Unidades medidas del biológico	ISIS N°	Dieta, duración del experimento	
			Rica en grasas, 6 semanas	Magra, 2 semanas
Colesterol mg/dl		control	196	91
		167880	137	91
		167879	N.D.	116
Triglicéridos mg/dl		control	151	91
		167880	58	59
		167879	N.D.	65
Glucosa mg/dl		control	213	204
		167880	183	203
		167879	N.D.	216
Enzimas hepáticas	AST U/l	control	92	51
		167880	157	58
		167879	N.D.	51
	ALT U/l	control	40	26
		167880	64	27
		167879	N.D.	21
ARNm de polipoproteína C-III % de control		167880	8 %	21 %
		167879	N.D.	27 %

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

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

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

Se analizaron ratones C57BL/6 machos (n=8; 7 a 8 semanas que edad) que recibieron una dieta rica en grasas (60 % kcal de grasas) para evaluar la expresión de ARNm de apolipoproteína C-III en hígado 6 semanas después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos a apolipoproteína C-III. Los ratones recibieron dos veces a la semana inyecciones intraperitoneales a una dosis de 25 mg/kg de ISIS 167880 (SEC ID N°: 117), ISIS

167875 (SEC ID N°: 113), ISIS 167878 (SEC ID N°: 115) o ISIS 167879 (SEC ID N°: 116). Los animales control recibieron tratamiento de solución salina dos veces a la semana durante un periodo de 6 semanas.

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

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

15 En una realización posterior, los ratones tratados con solución salina o una dosis de 25 mg/kg de ISIS 167880 (SEC ID N°: 117), ISIS 167875 (SEC ID N°: 113), ISIS 167878 (SEC ID N°: 115) o ISIS 167879 (SEC ID N°: 116) tal como se describe en el **ejemplo 25** se analizaron para determinar los niveles de colesterol y triglicéridos en suero después de 6 semanas de tratamiento.

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

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

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

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

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

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

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

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

Tal como resulta evidente en la tabla 9, el tratamiento con compuestos antisentido dirigidos a apolipoproteína C-III de ratón dio como resultado reducciones significativas en el peso de la almohadilla grasa. ISIS 167875 e ISIS 167878 produjeron ambos una reducción del 31 % en el peso de la almohadilla grasa, mientras que ISIS 167879 e ISIS 167880 produjeron ambos una reducción del 66 % en el peso de la almohadilla grasa. Los pesos corporales no cambiaron significativamente y el peso de los bazos aumentaron ligeramente siguiendo el tratamiento del compuesto antisentido. Con la excepción de los hígados de los animales tratados con ISIS 167875, los pesos de los hígados no cambiaron significativamente.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Se usó la secuencia de apolipoproteína C-III de macaco cangrejero, incorporada al presente documento como SEC ID N°: 223, para diseñar un oligonucleótido antisentido que tiene el 100 % de complementariedad con el ARNm de apolipoproteína C-III de macaco cangrejero. ISIS 340340 (GGCAGCCCTGGAGGCTGCAG; incorporada al presente documento como SEC ID N°: 224) está dirigida al nucleótido 397 de SEC ID N°: 223, dentro de una región

que corresponde a la 3' UTR de la apolipoproteína C-III humana con la que se hibrida ISIS 304789. ISIS 340340 es un oligonucleótido quimérico ("*gapmer*") de 20 nucleótidos de longitud, compuesto por una región "hueco" central que consta de diez 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada a ambos lados (direcciones 5' y 3') por "flancos" de cinco nucleótidos. Los flancos están compuestos por 2'-metoxietil (2'-MOE) nucleótidos. Las uniones entre nucleósidos (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los restos de citidina son 5-metilcitidinas.

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

Con el fin de diseñar oligonucleótidos antisentido para las regiones codificantes y no traducidas de ARNm de apolipoproteína C-III de rata, se secuenció un segmento de ARNm de apolipoproteína C-III de rata para proporcionar la secuencia 3' UTR, ya que la secuencia de ARNm de apolipoproteína C-III de rata publicada está restringida a la región codificante. El ARN se aisló y purificó a partir de hepatocitos de rata (Invitrogen Technologies, Gaithersburg, MD, Estados Unidos) y se sometió a una reacción de transcriptasa inversa (kit de Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). El ADN resultante fue el sustrato para 40 ciclos de amplificación por PCR (Amplitaq PCR kit, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), usando cebadores directos e inversos para alinearse a los extremos 5' y 3', respectivamente, de ARNm de apolipoproteína C-III de ratón. Siguiendo a la purificación en gel del fragmento de 427 pb resultante, las reacciones de secuenciación directa e inversa de cada producto se realizaron por Retrogen (San Diego, CA, Estados Unidos). La secuencia de rata se incorpora al presente documento como SEC ID N°: 225 e incluye 121 pb adicionales en la dirección 3' desde el codón de detención de la apolipoproteína C-III con respecto a la secuencia publicada (número de acceso al GenBank NM_012501.1, que se incorpora al presente documento como SEC ID N°: 226).

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

Los compuestos se analizan para determinar su efecto sobre niveles de ARNm de apolipoproteína C-III mediante PCR cuantitativa en tiempo real tal como se describe en otros ejemplos del presente documento. Las sondas y los cebadores de apolipoproteína C-III de ratón se diseñaron para que se hibridaran con una secuencia de apolipoproteína C-III de rata usando información de secuencias publicada (número de acceso al GenBank NM_012501.1, que se incorpora al presente documento como SEC ID N°: 226). Para la apolipoproteína C-III de rata los cebadores de PCR fueron: cebador directo: GAGGGAGAGGGATCCTTGCT (SEC ID N°: 227) cebador inverso: GGACCGTCTTGAGGCTTG (SEC ID N°: 228) y la sonda PCR fue: FAM-CTGGGCTCTATGCAGGGCTACATGGA-TAMRA, SEC ID N°: 229) en la que FAM es el colorante fluorescente y TAMRA es el colorante inactivador. Para GAPDH de rata los cebadores PCR fueron: cebador directo: TGTTCTAGAGACAGCCGCATCTT (SEC ID N°: 230) cebador inverso: CACCGACCTTACCATCTTGT (SEC ID N°: 231) y la sonda PCR fue JOE-TTGTGCAGTGCCAGCCTCGTCTCA-TAMRA (SEC ID N°: 232) en la que JOE es el colorante fluorescente informador y TAMRA es el colorante inactivador.

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

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

	ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	% DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º
5	340982	Codificante	225	213	TGAACTTATCAGTGAAGTTG	0	233
10	340987	Codificante	225	238	TCAGGGCCAGACTCCCAGAG	7	234
	340988	Codificante	225	258	TTGGTGTGTTAGTTGGTCC	0	235
	340991	Codificante	225	258	TTGGTGTGTTAGTTGGTCC	0	236
15	353932	Codificante	225	10	AGAGCCACGAGGGCCACGA T	0	237
	353933	Codificante	225	20	AGAGGCCAGGAGAGCCACG A	15	238
20	353934	Codificante	225	30	CAGCTCGGGCAGAGGCCAG G	2	239
	353935	Codificante	225	40	TCTCCCTCATCAGCTCGGGC	0	240
25	353936	Codificante	225	59	GCCCAGCAGCAAGGATCCCT	73	241
	353937	Codificante	225	69	CCTGCATAGAGCCCAGCAGC	0	242
	353938	Codificante	225	79	TCCATGTAGCCCTGCATAGA	90	243
30	353940	Codificante	225	99	GGACCGTCTTGGAGGCTTGT	76	244
	353941	Codificante	225	109	AGTGCATCCTGGACCGTCTT	61	245
	353942	Codificante	225	119	CATGCTGCTTAGTGATCCT	0	246
35	353943	Codificante	225	129	CAGACTCCTGCATGCTGCTT	57	247
	353944	Codificante	225	139	ACAGCTATATCAGACTCCTG	0	248
	353945	Codificante	225	148	CTGGCCACCACAGCTATATC	0	249
40	353946	Codificante	225	169	AAGCGATTGTCCATCCAGCC	0	250
	353949	Codificante	225	195	TGCTCCAGTAGCCTTTCAGG	0	251
	353950	Codificante	225	200	GAAGTTGCTCCAGTAGCCTT	35	252
45	353951	Codificante	225	204	CAGTGAAGTTGCTCCAGTAG	0	253
	353952	Codificante	225	209	CTTATCAGTGAAGTTGCTCC	0	254
	353953	Codificante	225	217	CCAGTGAAGTTATCAGTGAA	0	255
50	353954	Codificante	225	221	GAGGCCAGTGAAGTTATCAG	0	256
	353955	Codificante	225	224	CCAGAGGCCAGTGAAGTTAT	31	257
	353956	Codificante	225	229	GACTCCCAGAGGCCAGTGAA	0	258
55	353957	Codificante	225	234	GGCCAGACTCCCAGAGGCC A	0	259
	353958	Codificante	225	247	AGTTGGTCCTCAGGGCCAGA	0	260
	353959	Codificante	225	250	GTTAGTTGGTCCTCAGGGCC	0	261
60	353960	Codificante	225	254	TGTTGTTAGTTGGTCCTCAG	0	262
	353961	Codificante	225	262	AGAGTTGGTGTGTTAGTTG	0	263

65

(continuación)

	ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	% DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º
5	353962	Codificante	225	267	GCTCAAGAGTTGGTGTGTT	0	264
	353963	Codificante	225	271	CACGGCTCAAGAGTTGGTGT	0	265
10	353964	Codón de detención	225	275	GTCTCACGGCTCAAGAGTTG	0	266
	353966	Codón de detención	225	285	GAACATGGAGGTCTCACGGC	55	267
15	353967	Codón de detención	225	289	TCTGGAACATGGAGGTCTCA	0	268
	353968	3'UTR	225	293	CACATCTGGAACATGGAGGT	0	269
20	353969	3'UTR	225	297	CAGACACATCTGGAACATGG	0	270
	353970	3'UTR	225	301	TGGCCAGACACATCTGGAAC	49	271
	353972	3'UTR	225	309	AGGATAGATGGCCAGACACA	47	272
25	353973	3'UTR	225	313	CAGCAGGATAGATGGCCAGA	0	273
	353974	3'UTR	225	317	GAGGCAGCAGGATAGATGG C	38	274
	353975	3'UTR	225	321	TTCGGAGGCAGCAGGATAGA	0	275
30	353976	3'UTR	225	325	AACCTTCGGAGGCAGCAGGA	19	276
	353977	3'UTR	225	329	GAGCAACCTTCGGAGGCAGC	88	277
	353978	3' UTR	225	333	CTTAGAGCAACCTTCGGAGG	77	278
35	353979	3'UTR	225	337	TCCCCTTAGAGCAACCTTCG	0	279
	353980	3'UTR	225	341	ACTTTCCCCTTAGAGCAACC	45	280
	353981	3'UTR	225	345	ATATACTTTCCCCTTAGAGC	28	281
40	353982	3'UTR	225	349	GAGAATATACTTTCCCCTTA	96	282
	353983	3'UTR	225	353	GCATGAGAATATACTTTCCC	69	283
	353984	3'UTR	225	357	AAAGGCATGAGAATATACTT	47	284
45	353985	3'UTR	225	361	GGATAAAGGCATGAGAATAT	0	285
	353986	3'UTR	225	365	GGAGGGATAAAGGCATGAGA	0	286
	353987	3'UTR	225	386	GCATGTTTAGGTGAGGTCTG	100	287
50	353988	3'UTR	225	390	GACAGCATGTTTAGGTGAGG	0	288
	353990	3'UTR	225	398	TTATTTGGGACAGCATGTTT	0	289
	353991	3'UTR	225	402	GCTTTTATTTGGGACAGCAT	0	290
55	353992	3'UTR	225	407	TCCCAGCTTTTATTTGGGAC	22	291

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

citidina son 5-metilcitidinas.

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

ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	SEC ID N.º
340937	Codificante	226	8	CACGATGAGGAGCATTCGGG	292
340938	Codificante	226	13	AGGGCCACGATGAGGAGCAT	293
340939	Codificante	225	6	CCACGAGGGCCACGATGAGG	294
340940	Codificante	225	11	GAGAGCCACGAGGGCCACGA	295
340941	Codificante	225	16	GCCAGGAGAGCCACGAGGGC	296
340942	Codificante	225	21	CAGAGGCCAGGAGAGCCACG	297
340943	Codificante	225	26	TCGGGCAGAGGCCAGGAGAG	298
340944	Codificante	225	31	TCAGCTCGGGCAGAGGCCAG	299
340945	Codificante	225	36	CCTCATCAGCTCGGGCAGAG	300
340946	Codificante	225	41	CTCTCCCTCATCAGCTCGGG	301
340947	Codificante	225	46	GATCCCTCTCCCTCATCAGC	302
340948	Codificante	225	51	GCAAGGATCCCTCTCCCTCA	303
340949	Codificante	225	56	CAGCAGCAAGGATCCCTCTC	304
340950	Codificante	225	61	GAGCCCAGCAGCAAGGATCC	305
340951	Codificante	225	66	GCATAGAGCCCAGCAGCAAG	306
340952	Codificante	225	71	GCCCTGCATAGAGCCCAGCA	307
340953	Codificante	225	76	ATGTAGCCCTGCATAGAGCC	308
340954	Codificante	225	81	GTTCCATGTAGCCCTGCATA	309
340955	Codificante	225	86	GGCTTGTTCCATGTAGCCCT	310
340956	Codificante	225	91	TTGGAGGCTTGTTCCATGTA	311
340957	Codificante	225	96	CCGTCTTGAGGCTTGTTCC	312
340958	Codificante	225	101	CTGGACCGTCTTGAGGCTT	313
340959	Codificante	225	106	GCATCCTGGACCGTCTTGGA	314
340960	Codificante	225	111	TTAGTGCATCCTGGACCGTC	315
340961	Codificante	225	116	GCTGCTTAGTGCATCCTGGA	316
340962	Codificante	225	121	TGCATGCTGCTTAGTGCATC	317
340963	Codificante	225	126	ACTCCTGCATGCTGCTTAGT	318
340964	Codificante	225	131	ATCAGACTCCTGCATGCTGC	319
340965	Codificante	225	136	GCTATATCAGACTCCTGCAT	320
340966	Codificante	225	141	CCACAGCTATATCAGACTCC	321
340967	Codificante	225	146	GGCCACCACAGCTATATCAG	322
340968	Codificante	226	163	CTGCTGGCCACCACAGCTAT	323
340969	Codificante	226	168	AGCCCCTGCTGGCCACCACA	324
340970	Codificante	226	173	CATCCAGCCCCTGCTGGCCA	325

(continuación)

	ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	SEC ID N.º
5	340971	Codificante	226	178	TTGTCCATCCAGCCCCTGCT	326
	340972	Codificante	226	179	ATTGTCCATCCAGCCCCTGC	327
10	340973	Codificante	225	168	AGCGATTGTCCATCCAGCCC	328
	340974	Codificante	225	173	TTTGAAGCGATTGTCCATCC	329
	340975	Codificante	225	178	AGGGATTTGAAGCGATTGTC	330
15	340976	Codificante	225	183	CTTTCAGGGATTTGAAGCGA	331
	340977	Codificante	225	188	GTAGCCTTTCAGGGATTTGA	332
	340978	Codificante	225	193	CTCCAGTAGCCTTTCAGGGA	333
20	340979	Codificante	225	198	ACTTGCTCCAGTAGCCTTTC	334
	34980	Codificante	225	203	AGTGAACCTTGCTCCAGTAGC	335
	340981	Codificante	225	208	TTATCAGTGAACCTTGCTCCA	336
25	34983	Codificante	225	218	GCCAGTGAACCTTATCAGTGA	337
	340984	Codificante	225	223	CAGAGGCCAGTGAACCTTATC	338
	340985	Codificante	225	228	ACTCCCAGAGGCCAGTGAAC	339
30	340986	Codificante	225	233	GCCAGACTCCCAGAGGCCAG	340
	340989	Codificante	225	248	TAGTTGGTCCTCAGGGCCAG	341
	340990	Codificante	225	253	GTTGTTAGTTGGTCCTCAGG	342
35	340992	Codificante	225	263	AAGAGTTGGTGTGTTAGTT	343
	340993	Codificante	225	268	GGCTCAAGAGTTGGTGTGTT	344
	340994	Codón de detención	225	272	TCACGGCTCAAGAGTTGGTG	345
40	353939	Codificante	225	89	GGAGGCTTGTTCATGTAGC	346
	353947	Codificante	225	180	TCAGGGATTTGAAGCGATTG	347
	353948	Codificante	225	190	CAGTAGCCTTTCAGGGATTT	348
45	353965	Codón de detención	225	281	ATGGAGGTCTCACGGCTCAA	349
	353971	3' UTR	225	305	TAGATGGCCAGACACATCTG	350
50	353989	3' UTR	225	394	TTGGGACAGCATGTTTAGGT	351

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

Se seleccionaron cuatro oligonucleótidos para los estudios de respuesta a la dosis adicionales. Los hepatocitos de rata primarios se trataron con 10, 50, 150 y 300 nM de ISIS 167878 (SEC ID N°: 115), ISIS 167880 (SEC ID N°: 117), ISIS 340982 (SEC ID N°: 233), o el control oligo mezclado ISIS 113529 (SEC ID N°: 222) y se midieron los niveles de ARNm 24 horas después del tratamiento con oligonucleótidos tal como se describe en otros ejemplos del presente documento. Las células no tratadas sirvieron como control con respecto al que se normalizaron los datos.

Los resultados de estos estudios se muestran en la tabla 13. Los datos se promediaron a partir de tres experimentos y se expresaron como porcentaje de inhibición con relación a los controles no tratados. Si está presente, "N.D." indica "sin datos".

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

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

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

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

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

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

35	ISIS N°	SEC ID N.º	Dosis de oligonucleótidos			
			10 nM	50 nM	150 nM	300 nM
			% de inhibición			
40	353977	277	26	10	3	2
	353978	278	46	23	8	5
45	353982	282	35	21	10	2
	353983	283	46	23	12	2
50	353987	287	38	25	12	4

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

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

Se evaluaron los efectos de la inhibición antisentido de apolipoproteína C-III en ratas. Se alimentaron ratas Sprague-Dawley macho de 6 semanas de edad (Charles River Labs, Wilmington, MA, Estados Unidos) con una dieta de roedor normal. Los animales recibieron inyecciones intraperitoneales de ISIS 340982 (SEC ID N°: 233) dos veces a la semana durante dos semanas. Un grupo de animales (n= 4) recibieron 75 mg/kg de ISIS 340982 y un grupo de animales (n= 4) recibieron 100 mg/kg de ISIS 340982. Los animales tratados con solución salina (n = 4) sirvieron como grupo control.

65 Al finalizar el periodo de tratamiento, los animales se sacrificaron y se aisló ARN del hígado. Se midió el ARNm de apolipoproteína C-III tal como se describe para otros ejemplos del presente documento. Los resultados

para cada grupo de tratamiento se promediaron y los niveles de ARNm en hígado de ratones tratados con ISIS 340982 se normalizaron con los niveles de ARNm en hígado de los ratones tratados con solución salina. El tratamiento con 75 mg/kg o 100 mg/kg de ISIS 340982 dieron como resultado una reducción del 69 % y una reducción del 84 % en hígado de ARNm de apolipoproteína C-III, respectivamente, lo que demuestra que ISIS 340982 inhibe eficazmente la expresión de ARNm diana *in vivo*.

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

Las ratas tratadas con ISIS 340782 (SEC ID N°: 233) tal como se describe en el ejemplo 35 se analizaron para determinar cambios en el peso corporal y en el peso del hígado y del bazo. Los pesos corporales se registraron al comienzo del estudio (semana 0). Siguiendo al tratamiento de dos semanas con inyecciones dos veces a la semana de solución salina o ISIS 340782 a una concentración de 75 o 100 mg/kg, los animales se sacrificaron, cuarenta y ocho horas después de la inyección cuarta y última, los animales se sacrificaron. Se registraron los pesos corporales, de hígado y de bazo a la conclusión del estudio.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

30 Los niveles de ALT o AST que son el doble que en el control salino se consideran indicativos de hepatotoxicidad. Estos datos muestran que el tratamiento con ISIS 340982 en ratas, tanto a una dosis de 75 mg/kg como de 100 mg/kg, no dio como resultado una hepatotoxicidad significativa.

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

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

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

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

65 cebador directo: CGCTAACCAGCATGCAAAG (SEC ID N°: 353)

cebador inverso: CACCGTCCATCCAGTCCC (SEC ID N°: 354) y la sonda PCR fue: FAM-CTGAGGTGGCTGTGCGGGCC-TAMRA (SEC ID N°: 355) en la que FAM es el colorante fluorescente y TAMRA es el colorante inactivador.

5 Para GAPDH de hámster, los cebadores PCR fueron:

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

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

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

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

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

ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	% DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º
20 352929	Codificante	352	5	TGCCAAGAGGGCAACAATAG	17	359
352930	Codificante	352	10	AGGAGTGCCAAGAGGGCAAC	62	360
25 352931	Codificante	352	16	GATGCCAGGAGTGCCAAGAG	50	361
352932	Codificante	352	20	GGCAGATGCCAGGAGTGCCA	51	362
352933	Codificante	352	39	CTCTACCTCATTAGCTTCGG	0	363
30 352934	Codificante	352	41	CCCTCTACCTCATTAGCTTC	47	364
352935	Codificante	352	44	GACCCCTCTACCTCATTAGC	0	365
352936	Codificante	352	49	GCAAGGACCCCTCTACCTCA	15	366
35 352937	Codificante	352	54	CAGCAGCAAGGACCCCTCTA	45	367
352938	Codificante	352	59	GAGCCCAGCAGCAAGGACCC	0	368
352939	Codificante	352	65	TGCACAGAGCCCAGCAGCAA	84	369
40 352940	Codificante	352	70	AGCCCTGCACAGAGCCCAGC	0	370
352941	Codificante	352	75	CATGTAGCCCTGCACAGAGC	0	371
352942	Codificante	352	80	TGTTCCATGTAGCCCTGCAC	49	372
45 352943	Codificante	352	85	TGGCCTGTTCCATGTAGCCC	55	373
352945	Codificante	352	95	ACCTTCTTGGTGGCCTGTTC	62	374
352946	Codificante	352	106	GCGCATCCTGGACCTTCTTG	0	375
50 352948	Codificante	352	115	TGCTGGTTAGCGCATCCTGG	0	376
352949	Codificante	352	120	TTGCATGCTGGTTAGCGCAT	3	377
352950	Codificante	352	125	GACTTTTGCATGCTGGTTAG	59	378
55 352951	Codificante	352	130	CCTCAGACTTTTGCATGCTG	72	379
352952	Codificante	352	135	AGCCACCTCAGACTTTTGCA	75	380
352953	Codificante	352	140	CGCACAGCCACCTCAGACTT	64	381
60 352955	Codificante	352	153	CCAGTCCCTGGCCCGCACAG	66	382
352956	Codificante	352	159	GTCCATCCAGTCCCTGGCCC	73	383
352957	Codificante	352	161	CCGTCCATCCAGTCCCTGGC	0	384
65 352958	Codificante	352	165	GCCACCGTCCATCCAGTCCC	0	385

(continuación)

	ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	% DE INHIBICIÓN	SEC ID N.º
5	352959	Codificante	352	170	GTGAAGCCACCGTCCATCCA	12	386
	352960	Codificante	352	174	GGAGGTGAAGCCACCGTCCA	0	387
	352961	Codificante	352	193	TGCTCCAGTAGCTTTTCAGG	59	388
10	352962	Codificante	352	200	GTAATGTGCTCCAGTAGCT	66	389
	352963	Codificante	352	205	TGTCAGTAAATGTGCTCCAG	78	390
	352965	Codificante	352	214	TGGAGACCGTGTCAAGTAAAT	38	391
15	352966	Codificante	352	217	GGCTGGAGACCGTGTCAAGTA	66	392
	352967	Codificante	352	221	CAGAGGCTGGAGACCGTGTGTC	13	393
	352968	Codificante	352	225	ATCCAGAGGCTGGAGACCG	0	394
20	352969	Codificante	352	230	GAAGAATCCCAGAGGCTGGA	54	395
	352970	Codificante	352	269	TCTCAAGGCTCAGTAGCTGG	0	396
	352971	Codificante	352	275	TAGAGGTCTCAAGGCTCAGT	70	397
25	352972	Codón de detención	352	280	GAACGTAGAGGTCTCAAGGC	61	398
	352973	Codón de detención	352	286	CATTTGGAACGTAGAGGTCT	64	399
30	352974	3' UTR	352	292	CAAGCACATTTGGAACGTAG	0	400
	352975	3' UTR	352	300	TGGACACACAAGCACATTTG	0	401
	352976	3' UTR	352	305	CAGGATGGACACACAAGCAC	43	402
35	352977	3' UTR	352	311	GGCCAGCAGGATGGACACAC	81	403
	352978	3' UTR	352	318	GCCCAGAGGCCAGCAGGATG	60	404
	352979	3' UTR	352	348	CCTTTCAAACAACCTTCAGG	56	405
40	352980	3' UTR	352	402	GGACAGCATGTTTAGGTGAC	67	406

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

55

60

65

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

	ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	SEC ID N.º
5	352944	Codificante	352	90	CTTGGTGGCCTGTTCCATGT	407
	352947	Codificante	352	110	GTTAGCGCATCCTGGACCTT	408
10	352954	Codificante	352	145	TGCCCCGCACAGCCACCTCA	409
	352964	Codificante	352	210	GACCGTGTCAGTAAATGTGC	410
	356295	Codificante	352	1	AAGAGGGCAACAATAGGAGT	411
15	356296	Codificante	352	6	GTGCCAAGAGGGCAACAATA	412
	356297	Codificante	352	15	ATGCCAGGAGTGCCAAGAGG	413
	356298	Codificante	352	25	CTTCGGGCAGATGCCAGGAG	414
20	356299	Codificante	352	31	CATTAGCTTCGGGCAGATGC	415
	356300	Codificante	352	60	AGAGCCCAGCAGCAAGGACC	416
	356301	Codificante	352	86	GTGGCCTGTTCCATGTAGCC	417
25	356302	Codificante	352	91	TCTTGGTGGCCTGTTCCATG	418
	356303	Codificante	352	96	GACCTTCTTGGTGGCCTGTT	419
	356304	Codificante	352	101	TCCTGGACCTTCTTGGTGGC	420
30	356305	Codificante	352	111	GGTTAGCGCATCCTGGACCT	421
	356306	Codificante	352	116	ATGCTGGTTAGCGCATCCTG	422
	356307	Codificante	352	121	TTTGCATGCTGGTTAGCGCA	423
35	356308	Codificante	352	126	AGACTTTTGCATGCTGGTTA	424
	356309	Codificante	352	131	ACCTCAGACTTTTGCATGCT	425
	356310	Codificante	352	136	CAGCCACCTCAGACTTTTGC	426
40	356311	Codificante	352	141	CCGCACAGCCACCTCAGACT	427
	356312	Codificante	352	146	CTGGCCCCGCACAGCCACCTC	428
	356313	Codificante	352	151	AGTCCCTGGCCCGCACAGCC	429
45	356314	Codificante	352	156	CATCCAGTCCCTGGCCCGCA	430
	356315	Codificante	352	166	AGCCACCGTCCATCCAGTCC	431
	356316	Codificante	352	171	GGTGAAGCCACCGTCCATCC	432
50	356317	Codificante	352	176	AGGGAGGTGAAGCCACCGTC	433
	356318	Codificante	352	181	TTTTCAGGGAGGTGAAGCCA	434
	356319	Codificante	352	187	AGTAGCTTTTCAGGGAGGTG	435
55	356320	Codificante	352	198	AAATGTGCTCCAGTAGCTTT	436
	356321	Codificante	352	203	TCAGTAAATGTGCTCCAGTA	437
	356322	Codificante	352	208	CCGTGTCAGTAAATGTGCTC	438
60	356323	Codificante	352	213	GGAGACCGTGTCAGTAAATG	439
	356324	Codificante	352	218	AGGCTGGAGACCGTGTCAGT	440

(continuación)

	ISIS N°	REGIÓN	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	SITIO DIANA	SECUENCIA	SEC ID N.º
5	356325	Codificante	352	223	CCCAGAGGCTGGAGACCGTG	441
	356326	Codificante	352	228	AGAATCCCAGAGGCTGGAGA	442
10	356327	Codón de detención	352	274	AGAGGTCTCAAGGCTCAGTA	443
	356328	Codón de detención	352	279	AACGTAGAGGTCTCAAGGCT	444
	356329	Codón de detención	352	284	TTTGGAACGTAGAGGTCTCA	445
15	356330	3' UTR	352	289	GCACATTTGGAACGTAGAGG	446
	356331	3' UTR	352	294	CACAAGCACATTTGGAACGT	447
20	356332	3' UTR	352	299	GGACACACAAGCACATTTGG	448
	356333	3' UTR	352	304	AGGATGGACACACAAGCACA	449
	356334	3' UTR	352	309	CCAGCAGGATGGACACACAA	450
	356335	3' UTR	352	314	AGAGGCCAGCAGGATGGACA	451
25	356336	3' UTR	352	319	GGCCCAGAGGCCAGCAGGAT	452
	356337	3' UTR	352	324	ACCCAGGCCAGAGGCCAGC	453
	356338	3' UTR	352	329	GGGCCACCCAGGCCAGAGG	454
30	356339	3' UTR	352	353	CTTCCCTTTCAAACAACCT	455
	356340	3' UTR	352	358	CAATARTTTCCCTTTCAAAC	456
35	356341	3' UTR	352	363	CATGACAATACTTTCCCTTT	457
	356342	3' UTR	352	368	GAAAACATGACAATACTTTC	458
	356343	3' UTR	352	373	GGGATGAAAACATGACAATA	459
40	356344	3' UTR	352	396	CATGTTTAGGTGACTTCTGG	460
	356345	3' UTR	352	401	GACAGCATGTTTAGGTGACT	461
	356346	3' UTR	352	406	TTTAGGACAGCATGTTTAGG	462
45	356347	3' UTR	352	411	CTTTATTTAGGACAGCATGT	463
	356348	3' UTR	352	416	TCCAGCTTTATTTAGGACAG	464

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

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

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

5	ISIS N°	SEC ID N.º	Dosis de oligonucleótidos		
			50 nM	150 nM	300 nM
			% de inhibición		
10	352939	369	46	64	82
	352952	380	59	68	60
	352962	389	84	0	22
15	352963	390	0	0	42
	352971	397	0	27	0
	352977	403	48	72	56

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

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

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

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

40	ISISNO	Región	SECUENCIA DIANA SEC ID N°	Sitio diana	SECUENCIA	SEC ID N.º
	340995	3' UTR	11	496	TCTTAT <u>CCAGCTTT</u> ATTAGG	117
45	340997	3' UTR	11	496	TCTTATCCAGCTTTATTAGG	117

LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> Isis Pharmaceuticals Inc.

<120> MODULACION DE EXPRESION DE APOLIPOPROTEINA C-III

<130> P067021EP

55 <150> US 10/418,780

<151> 2003-04-16

<160> 469

60 <210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

ES 2 666 405 T3

<223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 1
 tccgtcatcg ctctcaggg 20
 5
 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 2
 gtgcgcgcga gcccgaaatc 20
 15
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 25
 <400> 3
 atgcattctg cccccaagga 20
 <210> 4
 <211> 3958
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 30
 <220>
 <400> 4
 35
 ctactccagg ctgtgttcag ggcttggggc tgggtggaggg aggggcctga aattccagtg 60
 tgaaaggctg agatggggccc gaggcccctg gcctatgtcc aagccatttc ccctctcacc 120
 40
 agcctctccc tggggagcca gtcagctagg aaggaatgag ggctccccag gcccaccccc 180
 agttcctgag ctcatctggg ctgcagggct ggcgggacag cagcgtggac tcagtctcct 240
 45
 50
 55
 60
 65

ES 2 666 405 T3

	agggatttcc	caactctccc	gcccgcttgc	tgcatctgga	caccctgcct	caggccctca	300
	tctccactgg	tcagcaggtg	acctttgccc	agcgccttgg	gtcctcagtg	cctgctgccc	360
5	tggagatgat	ataaaacagg	tcagaaccct	cctgcctgtc	tgctcagttc	atccctagag	420
	gcagctgctc	caggtaatgc	cctctgggga	ggggaagag	gaggggagga	ggatgaagag	480
10	gggcaagagg	agctccctgc	ccagcccagc	cagcaagcct	ggagaagcac	ttgctagagc	540
	taaggaagcc	tcgagactgg	acgggtgccc	cccaccctc	atcataacct	gaagaacatg	600
	gagggccggg	aggggtgtca	cttgcccaa	gctacatagg	gggtggggct	ggaagtggct	660
15	ccaagtgcag	gttccccct	cattcttcag	gcttagggct	ggaggaagcc	ttagacagcc	720
	cagtcctacc	ccagacaggg	aaactgaggc	ctggagaggg	ccagaaatca	cccaaagaca	780
20	cacagcatgt	tggctggact	ggacggagat	cagtccagac	cgcaggtgcc	ttgatgttca	840
	gtctggtggg	ttttctgctc	catcccaccc	acctcccttt	gggcctcgat	ccctcgcccc	900
25	tcaccagtcc	cccttctgag	agcccgtatt	agcagggagc	cggcccctac	tccttctggc	960
	agaccagct	aaggttctac	cttaggggcc	acgccacctc	cccagggagg	ggtccagagg	1020
	catggggacc	tggggtgccc	ctcacaggac	acttccttgc	aggaacagag	gtgccatgca	1080
30	gccccgggta	ctccttgttg	ttgccctcct	ggcgtcctg	gcctctgccc	gtaagcactt	1140
	ggtgggactg	ggctgggggc	aggggtggagg	caacttgggg	atcccagtcc	caatgggtgg	1200
35	tcaagcagga	gcccagggct	cgtccatagg	ccgatccacc	ccactcagcc	ctgctctttc	1260
	ctcaggagct	tcagaggccg	aggatgcctc	ccttctcagc	ttcatgcagg	gctacatgaa	1320
40	gcacgccacc	aagaccgcca	aggatgcact	gagcagcgtg	caggagtccc	aggtggccca	1380
	gcagggcagg	tacaccgct	ggcctccctc	cccattcccc	ctgccagctg	cctccattcc	1440
	caccaccccc	tgccctgggtg	agatcccaac	aatggaatgg	aggtgctcca	gcctcccctg	1500
45	ggcctgtgcc	tcttcagcct	cctctttcct	cacagggcct	ttgtcaggct	gctgcgggag	1560
	agatgacaga	gttgagactg	cattcctccc	aggtccctcc	tttctcccca	gagcagtcct	1620
50	agggcgcgcc	gttttagccc	tcatttccat	tttcctttcc	tttccctttc	tttccctttc	1680
	tatttctttc	tttctttctt	tctttctttc	tttctttctt	tctttctttc	tttctttctt	1740
	tctttctttc	ctttctttct	ttctttcttt	ctttctttct	ttctttcttt	tctttctttc	1800
55	tctttctttc	tttctttttt	ctttctttcc	ctctcttctt	ttctctcttt	ctttctttctt	1860
	cttttttttt	taatggagtc	tccctctgtc	accagggctg	gagtgcagtg	gtgccatctc	1920
60	ggctcactgc	aacctccgtc	tcccgggttc	aaccattct	cctgcctcag	cctcccaagt	1980
	agctgggatt	acaggcacgc	gccaccacac	ccagctaatt	tttgtatttt	tagcagagat	2040
65	ggggtttcac	catggtggcc	aggttggctc	tgaattcctg	acctcagggg	atcctcctgc	2100

ES 2 666 405 T3

5 ctcggcctcc caaagcgctg ggattacagg catgagccac tgcgcctggc cccattttcc 2160
 ttttctgaag gtctggctag agcagtggtc ctcagccttt ttggcaccag ggaccagttt 2220
 10 tgtggtggac aatTTTTcca tgggCCagcg gggatggttt tgggatgaag ctgttccacc 2280
 tcagatcatc aggcattaga ttctcataag gagccctcca cctagatccc tggcatgtgc 2340
 agttcacaac agggttcaca ctctatgag aatgtaaggc cacttgatct gacaggaggc 2400
 15 ggagctcagg cggTattgct cactcaccca ccactcactt cgtgctgtgc agcccggctc 2460
 ctaacagtcc atggaccagt acctatctat gacttggggg ttggggaccc ctgggctagg 2520
 ggtttgcttt gggaggcccc acctgacctt attcaagccc gtgagtgtct ctgctttgtt 2580
 20 ctaagacctg gggccagtgT gagcagaagt gtgtccttcc tctcccatcc tgcccctgcc 2640
 catcagtact ctctctccc ctactccctt ctccacctca ccctgactgg cattagctgg 2700
 catagcagag gtgttcataa acattcttag tccccagaac cggctttggg gtaggtgtta 2760
 25 ttttctcact ttgcagatga gaaaattgag gctcagagcg attaggtgac ctgccccaga 2820
 tcacacaact aatcaatcct ccaatgactt tccaaatgag aggctgcctc cctctgtcct 2880
 accctgctca gagccaccag gttgtgcaac tccaggcggT gctgtttgca cagaaaacaa 2940
 30 tgacagcctt gacctttcac atctccccac cctgtcactt tgtgcctcag gcccaggggc 3000
 ataaacatct gaggtgacct ggagatggca gggtttgact tgtgctgggg ttcttgcaag 3060
 35 gatatctctt ctcccagggT ggcagctgtg ggggattcct gcctgaggTc tcagggctgt 3120
 cgtccagtgA agttgagagg gtggTgtggT cctgactggT gtcgtccagT ggggacatgg 3180
 gtgtgggtcc catggttgcc tacagaggag ttctcatgcc ctgctctgtt gcttccccctg 3240
 40 actgatttag gggctgggtg accgatggct tcagttccct gaaagactac tggagcaccg 3300
 ttaaggacaa gttctctgag ttctgggatt tggaccctga ggtcagacca acttcagccg 3360
 45 tggctgcctg agacctcaat accccaagTc cacctgccta tccatcctgc cagctccttg 3420
 ggTcctgcaa tctccagggc tgcccctgta ggttgcttaa aagggacagT attctcagTg 3480
 50 ctctcctacc ccacctcatg cctggcccc ctcaggcat gctggcctcc caataaagct 3540
 ggacaagaag ctgctatgag tgggCCgtcg caagtgtgcc atctgtgtct gggcatggga 3600
 aaggGCCgag gctgttctgt gggTgggcac tggacagact ccaggTcagg caggcatgga 3660
 55 ggccagcgct ctatccacct tctggtagct gggcagTctc tgggcctcag tttcttcatc 3720
 tctaaggtag gaatcaccct ccgtaccctg ccttccttga cagctttgtg cggaagTca 3780
 60 aacaggacaa taagtttgct gatactttga taaactgtta ggtgctgcac aacatgactt 3840
 gagTgtgtgc cccatgccag ccactatgcc tggcacttaa gttgtcatca gagttgagac 3900
 65 tgtgtgtgtt tactcaaaac tgtggagctg acctccccta tccaggccac ctagccct 3958

5
 <210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

10
 <400> 5
 tcagctcat gcagggttac at 22

15
 <210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

20
 <400> 6
 acgctgctca gtgcatcct 19

25
 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30
 <220>
 <223> Sonda de PCR

<400> 7
 aagcacgccca ccaagaccgc c 21

35
 <210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40
 <220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 8
 gaaggtgaag gtcggagtc 19

45
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50
 <220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 9
 gaagatggtg atgggattc 20

55
 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60
 <220>
 <223> Sonda de PCR

65
 <400> 10
 caagctccc gttctcagcc 20

ES 2 666 405 T3

<210> 11
 <211> 518
 <212> ADN
 <213> M. musculus
 5
 <220>
 <400> 11
 10 cctgctcagt tttatcccta gaagcagcta gctactccag gtacgtaggt gccatgcagc 60
 cccggacgct cctcactgtg gccctcttgg ctctcctggc atctgcccga gctgaagagg 120
 15 tagagggatc cttgctgctg ggctctgtgc agggctacat ggaacaagcc tccaagacgg 180
 tccaggatgc gctaagtagc gtgcaggagt ccgatatagc tgcggtggcc aggggctgga 240
 tggacaatca cttcagattc ctgaaaggct actggagcaa gtttactgac aagttcaccg 300
 20 gcttctggga ttctaaccct gaggaccaac caactccagc tattgagtcg tgagacttct 360
 gtgttgacaga tgtgcctgtt cctccatcct gctgcccccc tccaggcctg ccagggtggcc 420
 25 cctgaagggtt gctttaaggg gaaagtatgt tctcatgtct tcaccctcc ctagatctca 480
 cctaaacatg ctgtccctaa taaagctgga taagaagc 518
 30
 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 12
 tgcagggcta catgaacaa 20
 40
 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 13
 50 cggactcctg cacgctactt 20
 <210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sonda de PCR
 60 <400> 14
 ctccaagacg gtccaggatg cgc 23
 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 666 405 T3

<220>
 <223> Cebador de PCR

 5 <400> 15
 ggcaaattca acggcacagt 20

 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR
 15 <400> 16
 gggctctcgct cctggaagat 20

 <210> 17
 <211> 27
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sonda de PCR
 25 <400> 17
 aaggccgaga atgggaagct tgtcatc 27

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

 <220>
 <221> CDS
 <222> (47)...(346)
 35 <400> 18

 40 tgctcagttc atccctagag gcagctgctc caggaacaga ggtgccatgc agccccgggt 60
 actccttggt gttgccctcc tggcgctcct ggcctctgcc cgagcttcag aggccgagga 120
 45 tgcctccctt ctgagcttca tgcaggggta catgaagcac gccaccaaga ccgccaagga 180
 tgcactgagc agcgtgcagg agtcccaggt ggcccagcag gccaggggct gggtgaccga 240
 tggcttcagt tccctgaaag actactggag caccgttaag gacaagttct ctgagttctg 300
 50 ggatttggac cctgaggtca gaccaacttc agccgtggct gcctgagacc tcaatacccc 360
 aagtccacct gcctatccat cctgcgagct ccttgggtcc tgcaatctcc agggctgccc 420
 55 ctgtagggtg cttaaaaggg acagtattct cagtgctctc ctaccccacc tcatgcctgg 480
 cccccctcca ggcattgctgg cctcccaata aagctggaca agaagctgct atg 533

 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 65

<400> 19
 ctggagcagc tgcctctagg 20

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

10 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 20
 ccctgcatga agctgagaag 20

15 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 21

25 gtgcttcag taaccctgca 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 22
 tggcctgctg ggccacctgg 20

35 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

45 <400> 23
 tgctccagta gtcttcagg 20

 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 24
 tgacctcagg gtccaaatcc 20

55 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

65 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 25
 ctctagggat gaactgagca 20

5
 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 26
 cagctgcctc taggatgaa 20

15
 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 27
 ttctggagc agctgcctct 20

25
 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 28
 acctctgttc ctggagcagc 20

35
 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

45
 <400> 29
 atggcacctc tgttctgga 20

50
 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 30
 gggctgcatg gcacctctgt 20

60
 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 31
 ggcaacaaca aggagtaccc 20

 5 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 32
 ggagggcaac aacaaggagt 20

 15 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 33
 agctcgggca gaggccagga 20

 25 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 34
 tctgaagctc gggcagagc 20

 35 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 45 <400> 35
 cggcctctga agctcgggca 20

 50 <210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 36
 catcctcggc ctctgaagct 20

 60 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 65 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 37
 gggaggcatc ctcggcctct 20
 5
 <210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 38
 gagaaggag gcatcctcgg 20
 15
 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 39
 gctgagaagg gagcatcct 20
 25
 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 40
 tgcatgaagc tgagaaggga 20
 35
 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 45
 <400> 41
 gcgtgcttca tgtaaccctg 20
 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 55
 <400> 42
 ttggtggcgt gctcatgta 20
 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 65

<400> 43
 gcatccttgg cggcttgg 20

5 <210> 44
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 44
 ctcagtcat ccttggcgg 20

15 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 45
 tgctcagtgc atccttggcg 20

25 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 46
 ctctgcacg ctgctcagt 20

35 <210> 47
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

45 <400> 47
 gactcctgca cgctgctcag 20

<210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 48
 gccacctggg actcctgcac 20

55 <210> 49
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

65 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 49
 gccctggcc tgctgggcca 20
 5
 <210> 50
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 50
 agcccctggc ctgctgggcc 20
 15
 <210> 51
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 51
 gaagccatcg gtcacccagc 20
 25
 <210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 52
 ctgaagccat cggcaccaca 20
 35
 <210> 53
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 45
 <400> 53
 tttcagggaa ctgaagccat 20
 <210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 55
 <400> 54
 cagtagtctt tcaggaact 20
 <210> 55
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 65

<400> 55
 aacgggtgctc cagtagtctt 20

5 <210> 56
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 56
 ccttaacggt gctccagtag 20

15 <210> 57
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 57
 gaactgtcc ttaacggtgc 20

25 <210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 58
 ctgagagaac ttgtccttaa 20

35 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

45 <400> 59
 agaactcaga gaactgtcc 20

50 <210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 60
 atcccagaac tcagagaact 20

60 <210> 61
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 61
 cagggtccaa atcccagaac 20

5 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 62
 ttggtctgac ctcagggtcc 20

15 <210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 63
 gttggtctga cctcagggtc 20

25 <210> 64
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 64
 gctgaagttg gtctgacctc 20

35 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

45 <400> 65
 cagccacggc tgaagttggt 20

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

50 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 66
 caggcagcca cggctgaagt 20

55 <210> 67
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

65 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 67
 attgaggctc caggcagcca 20

5 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 68
 tggataggca ggtggacttg 20

15 <210> 69
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 69
 ctgcgaggat ggataggcag 20

25 <210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 70
 aggagctcgc aggatggata 20

35 <210> 71
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

45 <400> 71
 gaccaagga gctcgagga 20

50 <210> 72
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 72
 tgcaggaccc aaggagctcg 20

60 <210> 73
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 73
tggagattgc aggaccaag 20

5 <210> 74
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 74
agccctggag attgcaggac 20

15 <210> 75
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 75
ggcagccctg gagattgcag 20

25 <210> 76
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 76
cctttaagc aacctacagg 20

35 <210> 77
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

45 <400> 77
ctgtccctt taagcaacct 20

50 <210> 78
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 78
agaatactgt ccctttaag 20

60 <210> 79
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 79
 cactgagaat actgtccctt 20
 5
 <210> 80
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 80
 taggagagca ctgagaatac 20
 15
 <210> 81
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 81
 gggtaggaga gactgagaa 20
 25
 <210> 82
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 82
 agccagcat gcctggagg 20
 35
 <210> 83
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 83
 ttggaggcc agcatgcctg 20
 45
 <210> 84
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 84
 agctttattg ggaggccagc 20
 55
 <210> 85
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 65

<400> 85
 tgtccagctt tattgggagg 20

5 <210> 86
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 86
 ctgtccagc ttattggga 20

15 <210> 87
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 87
 agcttctgt ccagcttat 20

25 <210> 88
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 88
 catagcagct tctgtccag 20

35 <210> 89
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 89
 acctggagca gctgcctcta 20

45 <210> 90
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 90
 agggcattac ctggagcagc 20

55 <210> 91
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

65 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 91
 acctctgttc ctgcaaggaa 20

 5 <210> 92
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 92
 aagtgcttac gggcagaggc 20

 15 <210> 93
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 93
 gcgggtgtac ctggcctgct 20

 25 <210> 94
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 94
 aaccctgttg tgaactgcac 20

 35 <210> 95
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 45 <400> 95
 agtgagcaat accgcctgag 20

 <210> 96
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 96
 cgggctgaa ttaggtcagg 20

 55 <210> 97
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 65 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 97
 tagggataaa actgagcagg 20

 5 <210> 98
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 98
 ctggagtagc tagctgcttc 20

 15 <210> 99
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 99
 gctgcatggc acctacgtac 20

 25 <210> 100
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 100
 ccacagtgag gagcgtccgg 20

 35 <210> 101
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 45 <400> 101
 ggcagatgcc aggagagcca 20

 <210> 102
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 102
 ctacctcttc agctcgggca 20

 55 <210> 103
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 65 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 103
 cagcagcaag gatccctcta 20

 5 <210> 104
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 104
 gcacagagcc cagcagcaag 20

 15 <210> 105
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 105
 ccctggccac cgcagctata 20

 25 <210> 106
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 106
 atctgaagtg attgtccatc 20

 35 <210> 107
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 45 <400> 107
 agtagccttt caggaatctg 20

 <210> 108
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 108
 ctgtcagta aacttgctcc 20

 55 <210> 109
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 65 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 109
 gaagccggtg aactgtcag 20

5 <210> 110
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 110
 gaatcccaga agccggtgaa 20

20 <210> 111
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

30 <400> 111
 ggttagaatc ccagaagccg 20

35 <210> 112
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

45 <400> 112
 tggagttggt tggctctcag 20

50 <210> 113
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

60 <400> 113
 tcacgactca atagctggag 20

65 <210> 114
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

70 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

75 <400> 114
 cccttaaagc aaccttcagg 20

80 <210> 115
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

85 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 115
 agacatgaga acatacttc 20

 5 <210> 116
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 116
 catgtttagg tgagatctag 20

 15 <210> 117
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 117
 tcttatccag cttattagg 20

 25 <210> 118
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

 30 <220>

 <400> 118
 ccuagaggca gcugcuccag 20

 35 <210> 119
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

 40 <220>

 <400> 119
 cuucucagcu ucaugcaggg 20

 45 <210> 120
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

 50 <220>

 <400> 120
 ugcagguua caugaagcac 20

 55 <210> 121
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

 60 <220>
 <400> 121
 ccagguggcc cagcaggcca 20

 65 <210> 122
 <211> 20

ES 2 666 405 T3

<212> ADN
<213> H. sapiens

5 <220>

<400> 122
ccugaaagac uacuggagca 20

10 <210> 123
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

15 <220>

<400> 123
ugcucaguuc aucccuagag 20

20 <210> 124
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

25 <220>

<400> 124
agaggcagcu gcuccaggaa 20

30 <210> 125
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

35 <220>

<400> 125
gcugcuccag gaacagaggu 20

40 <210> 126
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

45 <220>

<400> 126
uccaggaaca gaggugccau 20

50 <210> 127
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

55 <220>

<400> 127
acagaggugc caugcagccc 20

60 <210> 128
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

65 <220>

<400> 128

5 ggguacuccu uguuguugcc 20
 <210> 129
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>

10 <400> 129
 acuccuuguu guugcccucc 20
 <210> 130
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>

15 <400> 130
 uccuggccuc ugcccgagcu 20
 <210> 131
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>

20 <400> 131
 gccucugccc gagcuucaga 20
 <210> 132
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>

25 <400> 132
 agcuucagag gccgaggaug 20
 <210> 133
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>

30 <400> 133
 agaggccgag gaugccuccc 20
 <210> 134
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>

35 <400> 134
 ccgaggauhc cucccuucuc 20
 <210> 135
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

ES 2 666 405 T3

<220>
5 <400> 135
aggaugccuc ccuucucagc 20

<210> 136
<211> 20
<212> ADN
10 <213> H. sapiens

<220>
15 <400> 136
ucccuuca gcuucaugca 20

<210> 137
<211> 20
<212> ADN
20 <213> H. sapiens

<220>
25 <400> 137
caggguuaca ugaagcacgc 20

<210> 138
<211> 20
<212> ADN
30 <213> H. sapiens

<220>
35 <400> 138
uacaugaagc acgccaccaa 20

<210> 139
<211> 20
<212> ADN
40 <213> H. sapiens

<220>
45 <400> 139
accaagaccg ccaaggaugc 20

<210> 140
<211> 20
<212> ADN
50 <213> H. sapiens

<220>
55 <400> 140
accgccaagg augcacugag 20

<210> 141
<211> 20
<212> ADN
60 <213> H. sapiens

<220>
65 <400> 141
cgccaaggau gcacugagca 20

5
<210> 142
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
<400> 142
cacugagcag cgugcaggag 20

10
<210> 143
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
<400> 143
cugagcagcg ugcaggaguc 20

20
<210> 144
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
<400> 144
gugcaggagu cccagguggc 20

30
<210> 145
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
<400> 145
uggcccagca ggccaggggc 20

40
<210> 146
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
<400> 146
ggcccagcag gccaggggcu 20

50
<210> 147
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
<400> 147
gcugggugac cgauggcuuc 20

60
<210> 148
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens
<220>

65

ES 2 666 405 T3

<400> 148
ugggugaccg auggcuucag 20

5 <210> 149
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

10 <220>

<400> 149
auggcuucag uucccugaaa 20

15 <210> 150
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

20 <220>

<400> 150
aagacuacug gagcaccguu 20

25 <210> 151
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

30 <220>

<400> 151
cuacuggagc accguuaagg 20

35 <210> 152
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

40 <220>

<400> 152
gcaccguuaa ggacaaguuc 20

45 <210> 153
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

50 <220>

<400> 153
uuaggacaa guucucugag 20

55 <210> 154
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

60 <220>

<400> 154
ggacaaguuc ucugaguucu 20

65 <210> 155

<211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 5 <220>
 <400> 155
 guucugggau uggacccug 20
 10 <210> 156
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 15 <220>
 <400> 156
 ggaccugag gucagaccaa 20
 20 <210> 157
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 25 <220>
 <400> 157
 gaccugagg ucagaccaac 20
 30 <210> 158
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 35 <220>
 <400> 158
 gaggucagac caacuucagc 20
 40 <210> 159
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 45 <220>
 <400> 159
 accaacuuca gccguggcug 20
 50 <210> 160
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 55 <220>
 <400> 160
 acuucagccg uggcugccug 20
 60 <210> 161
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 65 <220>

ES 2 666 405 T3

<400> 161
uggcugccug agaccucaau 20

5 <210> 162
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

10 <220>

<400> 162
caaguccacc ugccuaucca 20

15 <210> 163
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

20 <220>

<400> 163
cugccuaucc auccugcgag 20

25 <210> 164
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

30 <220>

<400> 164
uauccauccu gcgagcuccu 20

35 <210> 165
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

40 <220>

<400> 165
uccugcgagc uccuuggguc 20

45 <210> 166
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

50 <220>

<400> 166
cgagcuccuu ggguccugca 20

55 <210> 167
<211> 20
<212> ADN
<213> H. sapiens

60 <220>

<400> 167
cuuggguccu gcaaucucca 20

65 <210> 168
<211> 20
<212> ADN

<213> H. sapiens
 <220>
 5 <400> 168
 guccugcaau cuccagggcu 20
 <210> 169
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>
 15 <400> 169
 cugcaaucuc cagggcugcc 20
 <210> 170
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>
 25 <400> 170
 ccuguagguu gcuuaaaagg 20
 <210> 171
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>
 35 <400> 171
 agguugcuua aaaggacag 20
 <210> 172
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>
 45 <400> 172
 cuuaaaaggg acaguauucu 20
 <210> 173
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>
 55 <400> 173
 aaggacagu auucucagug 20
 <210> 174
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>
 65 <400> 174

ES 2 666 405 T3

guauucucag ugcucuccua 20
<210> 175
<211> 20
5 <212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
10 <400> 175
uucucagugc ucuccuacc 20
<210> 176
<211> 20
15 <212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
20 <400> 176
cccuccaggc augcuggccu 20
<210> 177
<211> 20
25 <212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
30 <400> 177
caggcaugcu ggccucccaa 20
<210> 178
<211> 20
35 <212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
40 <400> 178
gcuggccucc caauaaagcu 20
<210> 179
<211> 20
45 <212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
50 <400> 179
ccucccaua aagcuggaca 20
<210> 180
<211> 20
55 <212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
60 <400> 180
ucccauaaaa gcuggacaag 20
<210> 181
<211> 20
65 <212> ADN
<213> H. sapiens

ES 2 666 405 T3

<220>

5 <400> 181
auaaagcugg acaagaagcu 20

<210> 182
<211> 20
<212> ADN
10 <213> H. sapiens

<220>

15 <400> 182
cuggacaaga agcugcuaug 20

<210> 183
<211> 20
<212> ADN
20 <213> H. sapiens

<220>

25 <400> 183
uagaggcagc ugcuccaggu 20

<210> 184
<211> 20
<212> ADN
30 <213> H. sapiens

<220>

35 <400> 184
gcugcuccag gaaugcccu 20

<210> 185
<211> 20
<212> ADN
40 <213> H. sapiens

<220>

45 <400> 185
uuccuugcag gaacagaggu 20

<210> 186
<211> 20
<212> ADN
50 <213> H. sapiens

<220>

55 <400> 186
gccucugccc guaagcacuu 20

<210> 187
<211> 20
<212> ADN
60 <213> H. sapiens

<220>

65 <400> 187
agcaggccag guacaccgc 20

5 <210> 188
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>
 <400> 188
 gugcaguuca caacaggguu 20
 10 <210> 189
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 15 <220>
 <400> 189
 cucagcggu auugcucacu 20
 20 <210> 190
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 25 <220>
 <400> 190
 ccugaccuaa uucaagcccg 20
 30 <210> 191
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus
 35 <220>
 <400> 191
 ccugcucagu uuuauccua 20
 40 <210> 192
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus
 45 <220>
 <400> 192
 guacguaggu gccaugcagc 20
 50 <210> 193
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus
 55 <220>
 <400> 193
 ccggacgcuc cucacugugg 20
 60 <210> 194
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus
 65 <220>

<400> 194
 uggcucuccu ggcaucugcc 20
 5 <210> 195
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus
 10 <220>
 <400> 195
 ugcccgagcu gaagagguag 20
 15 <210> 196
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus
 20 <220>
 <400> 196
 uagagggauc cuugcugcug 20
 25 <210> 197
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus
 30 <220>
 <400> 197
 cuugcugcug ggcucugugc 20
 35 <210> 198
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus
 40 <220>
 <400> 198
 uauagcugcg guggccaggg 20
 45 <210> 199
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus
 50 <220>
 <400> 199
 cagauuccug aaagguacu 20
 55 <210> 200
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus
 60 <220>
 <400> 200
 ggagcaaguu uacugacaag 20
 65 <210> 201
 <211> 20

<212> ADN
 <213> M. musculus

 <220>
 5
 <400> 201
 cugacaaguu caccggcuuc 20

 <210> 202
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus
 10

 <220>
 15
 <400> 202
 cggcuucugg gauucuaacc 20

 <210> 203
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus
 20

 <220>
 25
 <400> 203
 cugaggacca accaacucca 20

 <210> 204
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus
 30

 <220>
 35
 <400> 204
 cuccagcuau ugagucguga 20

 <210> 205
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus
 40

 <220>
 45
 <400> 205
 ccugaagguu gcuuaagg 20

 <210> 206
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus
 50

 <220>
 55
 <400> 206
 gaaaguaugu ucucaugucu 20

 <210> 207
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> M. musculus
 60

 <220>
 65
 <400> 207

ES 2 666 405 T3

cuagaucuca ccuaaacaug 20
<210> 208
<211> 20
5 <212> ADN
<213> M. musculus
<220>
10 <400> 208
ccuaauaaag cuggauaaga 20
<210> 209
<211> 20
15 <212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
20 <400> 209
gcugcauggc accucuguuc 20
<210> 210
<211> 20
25 <212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
30 <400> 210
ggcagaggc caggagcgcca 20
<210> 211
<211> 20
35 <212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
40 <400> 211
cugaagcucg ggcagaggcc 20
<210> 212
<211> 20
45 <212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
50 <400> 212
uccucggccu cugaagcucg 20
<210> 213
<211> 20
55 <212> ADN
<213> H. sapiens
<220>
60 <400> 213
ucuuggggc gugcucaug 20
<210> 214
<211> 20
65 <212> ADN
<213> H. sapiens

ES 2 666 405 T3

<220>
5 <400> 214
gcucagugca uccuuggcgg 20

<210> 215
<211> 20
<212> ADN
10 <213> H. sapiens

<220>
15 <400> 215
ccugcacgcu gcucagugca 20

<210> 216
<211> 20
<212> ADN
20 <213> H. sapiens

<220>
25 <400> 216
acugaagcca ucggucaccc 20

<210> 217
<211> 20
<212> ADN
30 <213> H. sapiens

<220>
35 <400> 217
cagaacucag agaacuuguc 20

<210> 218
<211> 20
<212> ADN
40 <213> H. sapiens

<220>
45 <400> 218
gaaguugguc ugaccucagg 20

<210> 219
<211> 20
<212> ADN
50 <213> H. sapiens

<220>
55 <400> 219
cccuggagau ugcaggaccc 20

<210> 220
<211> 20
<212> ADN
60 <213> H. sapiens

<220>
65 <400> 220
gggcagcccu ggagauugca 20

ES 2 666 405 T3

<210> 221
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 5
 <220>
 <400> 221
 cccuuuuuaa gcaaccuacag 20
 10
 <210> 222
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 <400> 222
 20
 ctctactgt gctgtggaca 20
 <210> 223
 <211> 479
 <212> ADN
 <213> M. fascicularis
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 53, 63
 <223> n = A,T,C o G
 30
 <400> 223
 35
 ttcattcccta gaggcagctg ctccaggaac agaggcgcca tgcagccccg ggntactcct 60
 tgnttgctgc cctgctgtca ctctggcct ctgccagtag cttcagaggc cgaggacacc 120
 tcccttcttg gcattcatgc agggctacat gcagcatgcc accaagaccg ccaaggatgc 180
 40
 actgaccagc gtccaggagt cccaggtggc ccagcaggcc agaggctggg tgaccgatgg 240
 cttcagttcc ctgaaagact actggagcac cgtaaggac aagttatctg ggttctggga 300
 45
 tttgaaccct gaggcctaac ccaactctggc tgaggctgcc tgagacctca ataccctcaag 360
 tccacctgcc tgtccatcct gccagctcct tgggtcctgc agcctccagg gctgcccctg 420
 50
 taggttgctt aaaagggaca gtattctcag tgcctccta ccgcacctca tgctggcct 479
 <210> 224
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 <400> 224
 60
 ggcagccctg gaggctgcag 20
 <210> 225
 <211> 427
 <212> ADN
 <213> R. norvegicus
 65

ES 2 666 405 T3

<400> 225
aagctcctca tcgtggccct cgtggctctc ctggcctctg cccgagctga tgagggagag 60
5 ggatccttgc tgctgggctc tatgcagggc tacatggaac aagcctccaa gacgggtccag 120
gatgcaactaa gcagcatgca ggagtctgat atagctgtgg tggccagggg ctggatggac 180
10 aatcgcttca aatccctgaa aggctactgg agcaagttca ctgataagtt cactggcctc 240
tgggagtctg gccctgagga ccaactaaca acaccaactc ttgagccgtg agacctccat 300
15 gttccagatg tgtctggcca tctatcctgc tgcctccgaa ggttgctcta aggggaaagt 360
atattctcat gcctttatcc ctccccagac ctcacctaaa catgctgtcc caaataaaag 420
ctgggaa 427
20 <210> 226
<211> 306
<212> ADN
<213> R. norvegicus
25 <400> 226
atgcagcccc gaatgctcct catcgtggcc ctcgtggctc tcctggcctc tgccccagct 60
30 gatgagggag agggatcctt gctgctgggc tctatgcagg gctacatgga acaagcctcc 120
aagacgggtcc aggatgcact aagcagcatg caggagtctg atatagctgt ggtggccagc 180
35 aggggctgga tggacaatcg cttcaaatcc ctgaaaggct actggagcaa gttcactgat 240
aagttcactg gcctctggga gtctggcctt gaggaccaac taacaacacc aactcttgag 300
ccgtga 306
40 <210> 227
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
45 <220>
<223> Cebador de PCR
50 <400> 227
gagggagagg gatccttgct 20
55 <210> 228
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
60 <220>
<223> Cebador de PCR
65 <400> 228
ggaccgtctt ggaggcttg 19
<210> 229
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sonda de PCR

 5 <400> 229
 ctgggctcta tgcagggcta catgga 26

 <210> 230
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 15 <400> 230
 tgttctagag acagccgcat ctt 23

 <210> 231
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 25 <400> 231
 caccgacctt caccatcttg t 21

 <210> 232
 <211> 24
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sonda de PCR

 35 <400> 232
 ttgtgcagtg ccagcctcgt ctca 24

 <210> 233
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 45 <400> 233
 tgaacttatc agtgaacttg 20

 <210> 234
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 55 <400> 234
 tcagggccag actcccagag 20

 <210> 235
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 5 <400> 235
 ttggtgtgt tagttgtcc 20

 <210> 236
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 15 <400> 236
 ttggtgtgt tagttgtcc 20

 <210> 237
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 25 <400> 237
 agagccacga gggccacgat 20

 <210> 238
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 35 <400> 238
 agaggccagg agagccacga 20

 <210> 239
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 45 <400> 239
 cagctcgggc agaggccagg 20

 <210> 240
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 55 <400> 240
 tctccctcat cagctcgggc 20

 <210> 241
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 65 <400> 240
 tctccctcat cagctcgggc 20

 <210> 241
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 5 <400> 241
 gccagcagc aaggatcct 20

 <210> 242
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 15 <400> 242
 cctgcataga gccagcagc 20

 <210> 243
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 25 <400> 243
 tccatgtgc cctgcataga 20

 <210> 244
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 35 <400> 244
 ggaccgtctt ggaggctgt 20

 <210> 245
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 245
 agtgcacctt ggaccgtctt 20

 50 <210> 246
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 246 20
 catgctgctt agtgcacctt 20

 60 <210> 247
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 5 <400> 247 20
 cagactcctg catgctgctt 20

 <210> 248
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 15 <400> 248 20
 acagctatat cagactcctg 20

 <210> 249
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 25 <400> 249 20
 ctggccacca cagctatatc 20

 <210> 250
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 35 <400> 250 20
 aagcgattgt ccatccagcc 20

 <210> 251
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 251 20
 tgctccagta gccttcagg 20

 50 <210> 252
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 252
 gaacttgctc cagtagcctt 20

 60 <210> 253
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

5 <400> 253
 cagtgaactt gctccagtag 20

<210> 254
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

15 <400> 254
 cttatcagtg aacttgctcc 20

<210> 255
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

25 <400> 255
 ccagtgaact tatcagtgaa 20

<210> 256
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

35 <400> 256
 gaggccagtg aacttatcag 20

<210> 257
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 257
 ccagaggcca gtgaacttat 20

50 <210> 258
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 258
 gactcccaga ggccagtgaa 20

60 <210> 259
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 5 <400> 259
 ggccagactc ccagaggcca 20

 <210> 260
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 15 <400> 260
 agttggtcct cagggccaga 20

 <210> 261
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 25 <400> 261
 gttagttggt cctcagggcc 20

 <210> 262
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 35 <400> 262
 tgttgtagt tggctctcag 20

 <210> 263
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 263 20
 50 agagttggtg ttgtagttg 20

 <210> 264
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 264 20
 60 gctcaagagt tgggtgtgt 20

 <210> 265
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 5 <400> 265 20
 cacggctcaa gagttggtgt 20

 <210> 266
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 15 <400> 266 20
 gtctcacggc tcaagagttg 20

 <210> 267
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 25 <400> 267 20
 gaacatggag gtctcacggc 20

 <210> 268
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 35 <400> 268 20
 tctggaacat ggaggtctca 20

 <210> 269
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 269
 cacatctgga acatggaggt 20

 <210> 270
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 270
 cagacacatc tggaacatgg 20

 <210> 271
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 270
 cagacacatc tggaacatgg 20

 <210> 271
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

5 <400> 271
 tggccagaca catctggaac 20

<210> 272
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

15 <400> 272
 aggatagatg gccagacaca 20

<210> 273
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

25 <400> 273
 cagcaggata gatggccaga 20

<210> 274
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

35 <400> 274
 gaggcagcag gatagatggc 20

<210> 275
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 275
 ttcggaggca gcaggataga 20

50 <210> 276
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Compuesto antisentido

<400> 276
 aaccttcgga ggcagcagga 20

60 <210> 277
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 5 <400> 277
 gagcaacctt cggaggcagc 20

 <210> 278
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 15 <400> 278
 cttagagcaa ccttcggagg 20

 <210> 279
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 25 <400> 279
 tccccttaga gcaaccttcg 20

 <210> 280
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 35 <400> 280 20
 acttcccct tagagcaacc 20

 <210> 281
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 45 <400> 281 20
 atatacttc cccttagagc 20

 50 <210> 282
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 282 20
 60 gagaatatac ttcccctta 20

 <210> 283
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 5 <400> 283 20
 gcatgagaat atactttccc 20

 <210> 284
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 15 <400> 284 20
 aaagggatga gaatatactt 20

 <210> 285
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 25 <400> 285 20
 ggataaaggc atgagaatat 20

 <210> 286
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 35 <400> 286
 ggagggataa aggcatagaga 20

 <210> 287
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 45 <400> 287
 gcatgttag gtgaggtctg 20

 50 <210> 288
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 288
 60 gacagcatgt ttaggtgagg 20

 <210> 289
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 5 <400> 289
 ttattggga cagcatgttt 20

 <210> 290
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 15 <400> 290
 gcttttattt gggacagcat 20

 <210> 291
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 25 <400> 291
 tcccagcttt tatttgggac 20

 <210> 292
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 35 <400> 292
 cacgatgagg agcattcggg 20

 <210> 293
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 45 <400> 293
 agggccacga tgaggagcat 20

 <210> 294
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 55 <400> 294
 ccacgagggc cacgatgagg 20

 <210> 295
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 5 <400> 295
 gagagccacg agggccacga 20

 <210> 296
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 15 <400> 296
 gccaggagag ccacgagggc 20

 <210> 297
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 25 <400> 297 20
 cagaggccag gagagccacg 20

 <210> 298
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 35 <400> 298 20
 tcgggcagag gccaggagag 20

 <210> 299
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 45 <400> 299 20
 tcagctcggg cagagggccag 20

 <210> 300
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 55 <400> 300 20
 cctcatcagc tcgggcagag 20

 <210> 301
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 5 <400> 301 20
 ctctccctca tcagctcggg 20

 <210> 302
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 15 <400> 302 20
 gatccctctc cctcatcagc 20

 <210> 303
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 25 <400> 303
 gcaaggatcc ctctccctca 20

 <210> 304
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 35 <400> 304
 cagcagcaag gatccctctc 20

 <210> 305
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 45 <400> 305
 gagcccagca gcaaggatcc 20

 <210> 306
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 55 <400> 306
 gcatagagcc cagcagcaag 20

 <210> 307
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 65

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 5 <400> 307
 gccctgcata gagcccagca 20

 <210> 308
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 15 <400> 308
 atgtagccct gcatagagcc 20

 <210> 309
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 25 <400> 309
 gttccatgta gccctgcata 20

 <210> 310
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 35 <400> 310
 ggctgttcc atgtagccct 20

 <210> 311
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 45 <400> 311
 ttggaggctt gttccatgta 20

 <210> 312
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 55 <400> 312
 ccgtcttga ggctgttcc 20

 <210> 313
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 5 <400> 313
 ctggaccgctc ttggaggctt 20

 <210> 314
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 15 <400> 314 20
 gcatcctgga ccgtcttggga 20

 <210> 315
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 25 <400> 315 20
 ttagtgcatc ctggaccgctc 20

 <210> 316
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 35 <400> 316 20
 gctgcttagt gcatcctgga 20

 <210> 317
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 317 20
 50 tgcatgctgc ttagtgcatc 20

 <210> 318
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 318 20
 60 actcctgcat gctgcttagt 20

 <210> 319
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 5 <400> 319 20
 atcagactcc tgcattgctgc 20

 <210> 320
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 15 <400> 320
 gctatatcag actcctgcat 20

 <210> 321
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 25 <400> 321
 ccacagctat atcagactcc 20

 <210> 322
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 35 <400> 322
 ggccaccaca gctatatcag 20

 <210> 323
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 45 <400> 323
 ctgctggcca ccacagctat 20

 <210> 324
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 55 <400> 324
 agcccctgct ggccaccaca 20

 <210> 325
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 65

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 5 <400> 325
 catccagccc ctgctggcca 20

 <210> 326
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 15 <400> 326
 ttgtccatcc agcccctgct 20

 <210> 327
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 25 <400> 327
 attgtccatc cagcccctgc 20

 <210> 328
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 35 <400> 328
 agcgattgct catccagccc 20

 <210> 329
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 45 <400> 329
 tttgaagcga ttgtccatcc 20

 <210> 330
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 55 <400> 330
 agggatttga agcgattgct 20

 <210> 331
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 65 <400> 330
 agggatttga agcgattgct 20

 <210> 331
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 5 <400> 331 20
 ctttcagga ttgaagcga 20

 <210> 332
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 15 <400> 332 20
 gtagccttc agggattga 20

 <210> 333
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 25 <400> 333 20
 ctccagtagc ctttcagga 20

 <210> 334
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 35 <400> 334 20
 acttgctcca gtagccttc 20

 <210> 335
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 45 <400> 335 20
 agtgaacttg ctccagtagc 20

 <210> 336
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 55 <400> 336 20
 ttatcagtga acttgctcca 20

 <210> 337
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 65

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 5 <400> 337
 gccagtgaac ttatcagtga 20

 <210> 338
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 15 <400> 338
 cagaggccag tgaacttacc 20

 <210> 339
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 25 <400> 339
 actcccagag gccagtgaac 20

 <210> 340
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 35 <400> 340
 gccagactcc cagaggccag 20

 <210> 341
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 45 <400> 341
 tagttgtcc tcagggccag 20

 50 <210> 342
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 342
 60 gttgttagtt ggtcctcagg 20

 <210> 343
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto antisentido

 5 <400> 343
 aagagttggt gttgtagtt 20

 <210> 344
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 15 <400> 344
 ggctcaagag ttggtgtgt 20

 <210> 345
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 25 <400> 345
 tcacggctca agagttggtg 20

 <210> 346
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 35 <400> 346
 ggaggcttgt tccatgtagc 20

 <210> 347
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 45 <400> 347
 tcagggattt gaagcgattg 20

 <210> 348
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 55 <400> 348
 cagtagcctt tcagggattt 20

 <210> 349
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 666 405 T3

<220>
 <223> Compuesto antisentido

5 <400> 349
 atggaggctct cacggctcaa 20

10 <210> 350
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

20 <400> 350
 tagatggcca gacacatctg 20

25 <210> 351
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Compuesto antisentido

35 <400> 351
 ttgggacagc atgttaggt 20

40 <210> 352
 <211> 435
 <212> ADN
 <213> M. auratus

45 <400> 352
 actcctattg ttgccctctt ggcaactcctg gcatctgccc gaagctaatag aggttagaggg 60
 gtccttgctg ctgggctctg tgcagggcta catggaacag gccaccaaga aggtccagga 120
 40 tgcgctaacc agcatgcaaa agtctgaggt ggctgtgctg gccagggact ggatggacgg 180
 tggcttcacc tccctgaaaa gctactggag cacatttact gacacggtct ccagcctctg 240
 45 ggattcttcc cccaaggccc taccagcccc agctactgag ccttgagacc tctacgttcc 300
 aaatgtgctt gtgtgtccat cctgctggcc tctgggctg ggtggcccct gaaggttgtt 360
 50 tgaaagggaa agtattgtca tgttttcatc cctccccaga agtcacctaa acatgctgtc 420
 ctaaataaag ctgga 435

55 <210> 353
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cebador de PCR

65 <400> 353
 cgctaaccag catgcaaaag 20

<210> 354
 <211> 18

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 354
 caccgtccat ccagtccc 18

 10 <210> 355
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Sonda de PCR

 <400> 355
 ctgaggtggc tgtgcgggcc 20
 20
 <210> 356
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 356
 ccagcctcgc tccgg 15
 30
 <210> 357
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 357
 ccaatacggc caaatccg 18
 40
 <210> 358
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Sonda de PCR

 <400> 358
 acgcaatggt gaaggtcggc g 21
 50
 <210> 359
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 359
 tgccaagagg gcaacaatag 20
 60
 <210> 360
 <211> 20
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 360
 aggagtgccca agagggcaac 20

 10 <210> 361
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 361
 gatgccagga gtgccaagag 20
 20
 <210> 362
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 362
 ggcagatgcc aggagtgccca 20
 30
 <210> 363
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 363
 ctctacctca ttagcttcgg 20
 40
 <210> 364
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 364
 ccctctacct cattagcttc 20
 50
 <210> 365
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 365
 gaccctcta cctcattagc 20
 60
 <210> 366
 <211> 20
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 366
 gcaaggaccc ctctacctca 20

 10 <210> 367
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 367
 cagcagcaag gaccctcta 20
 20
 <210> 368
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 368
 gagcccagca gcaaggaccc 20
 30
 <210> 369
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 369
 tgcacagagc ccagcagcaa 20
 40
 <210> 370
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 370 20
 agccctgcac agagcccagc 20
 50
 <210> 371
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 371 20
 catgtagccc tgcacagagc 20
 60
 <210> 372
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 372 20
 tgtccatgt agccctgcac 20

 10 <210> 373
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 373 20
 tggcctgttc catgtagccc 20
 20
 <210> 374
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 374 20
 accttctgg tggcctgttc 20
 30
 <210> 375
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 375 20
 gcgcatcctg gaccttctg 20
 40
 <210> 376
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 376
 tgctggttag cgcacacctg 20
 50
 <210> 377
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 377
 ttgcatgctg gttagcgcac 20
 60
 <210> 378
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 378
 gacttttgca tgctggtag 20

 10 <210> 379
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 379
 cctcagactt ttgcatgctg 20
 20
 <210> 380
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 380
 agccacctca gacttttgca 20
 30
 <210> 381
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 381
 cgcacagcca cctcagactt 20
 40
 <210> 382
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 50
 <400> 382
 ccagtcctg gcccgcacag 20

 <210> 383
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 60
 <400> 383
 gtccatccag tcctggccc 20

 <210> 384
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 384
 ccgtccatcc agtccctggc 20

 10 <210> 385
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 385
 gccaccgtcc atccagtccc 20
 20
 <210> 386
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 386
 gtgaagccac cgtccatcca 20
 30
 <210> 387
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 387 20
 ggaggtgaag ccaccgtcca 20
 40
 <210> 388
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 388 20
 tgctccagta gcttttcagg 20
 50
 <210> 389
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 389 20
 gtaaagtgc tccagtagct 20
 60
 <210> 390
 <211> 20
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 390 20
 tgcagtaaa tggctccag 20

 10 <210> 391
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 391 20
 tggagaccgt gtcagtaaat 20
 20
 <210> 392
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 392 20
 ggctggagac cgtgcagta 20
 30
 <210> 393
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 393
 cagaggctgg agaccgtgc 20
 40
 <210> 394
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 394
 atcccagagg ctggagaccg 20
 50
 <210> 395
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 395
 gaagaatccc agaggctgga 20
 60
 <210> 396
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 396
 tctcaaggct cagtagctgg 20

 10 <210> 397
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 397
 tagaggtctc aaggctcagt 20
 20
 <210> 398
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 398
 gaacgtagag gtctcaaggc 20
 30
 <210> 399
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 399
 catttgaac gtagaggct 20
 40
 <210> 400
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 50
 <400> 400
 caagcacatt tgaacgtag 20

 <210> 401
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 60
 <400> 401
 tggacacaca agcacattg 20

 <210> 402
 <211> 20
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 402
 caggatggac acacaagcac 20

 10 <210> 403
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 403
 ggccagcagg atggacacac 20
 20
 <210> 404
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 404 20
 gccagaggc cagcaggatg 20
 30
 <210> 405
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 405 20
 ctttcaaac aaccttcagg 20
 40
 <210> 406
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 406 20
 ggacagcatg tttaggtagc 20
 50
 <210> 407
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 407 20
 cttggtggcc tgttccatgt 20
 60
 <210> 408
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 408 20
 gttagcgcat cctggacctt 20

 10 <210> 409
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 409 20
 tggcccgcac agccacctca 20
 20
 <210> 410
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 410
 gaccgtgtca gtaaagtgtc 20
 30
 <210> 411
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 411
 aagagggcaa caataggagt 20
 40
 <210> 412
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 412
 gtgccaagag ggcaacaata 20
 50
 <210> 413
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 413
 atgccaggag tgccaagagg 20
 60
 <210> 414
 <211> 20
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 414
 cttcgggcag atgccaggag 20

 10 <210> 415
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 415
 cattagcttc gggcagatgc 20
 20
 <210> 416
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 416
 agagcccagc agcaaggacc 20
 30
 <210> 417
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 417
 gtggcctggt ccatgtagcc 20
 40
 <210> 418
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 50
 <400> 418
 tcttggtggc ctgtccatg 20

 <210> 419
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 60
 <400> 419
 gaccttctg gtggcctggt 20

 <210> 420
 <211> 20
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 420
 tcctggacct tcttggtggc 20

 10 <210> 421
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 421 20
 ggtagcgca tcctggacct 20
 20
 <210> 422
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 422 20
 atgctggta gcgcatcctg 20
 30
 <210> 423
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 423 20
 ttgcatgct ggtagcgca 20
 40
 <210> 424
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 424 20
 agactttgc atgctggta 20
 50
 <210> 425
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 425 20
 acctcagact ttgcatgct 20
 60
 <210> 426
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 426 20
 cagccacctc agactttgc 20

 10 <210> 427
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 427
 ccgcacagcc acctcagact 20
 20
 <210> 428
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 428
 ctggcccgca cagccacctc 20
 30
 <210> 429
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 429
 agtccctggc ccgcacagcc 20
 40
 <210> 430
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 430
 catccagtcc ctggcccgca 20
 50
 <210> 431
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 431
 agccaccgtc catccagtcc 20
 60
 <210> 432
 <211> 20
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 432
 ggtgaagcca ccgccatcc 20

 10 <210> 433
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 433
 agggaggatga agccaccgtc 20
 20
 <210> 434
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 434
 ttttcagga ggtgaagcca 20
 30
 <210> 435
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 435
 agtagctttt caggaggatg 20
 40
 <210> 436
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 50
 <400> 436
 aaatgtgctc cagtagcttt 20

 <210> 437
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 60
 <400> 437
 tcagtaaagtg tgctccagta 20

 <210> 438
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 438 20
 ccgtgtcagt aaatgtgctc 20

 10 <210> 439
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 439 20
 ggagaccgtg tcagtaaag 20
 20
 <210> 440
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 440 20
 aggctggaga ccgtgtcagt 20
 30
 <210> 441
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 441 20
 cccagaggct ggagaccgtg 20
 40
 <210> 442
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 442 20
 agaatcccag aggctggaga 20
 50
 <210> 443
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 443 20
 agaggctca aggctcagta 20
 60
 <210> 444
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 444
 aacgtagagg tctcaaggct 20

 10 <210> 445
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 445
 ttggaacgt agaggctca 20
 20
 <210> 446
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 446
 gcacattgg aacgtagagg 20
 30
 <210> 447
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 447
 cacaagcaca ttggaacgt 20
 40
 <210> 448
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 448
 ggacacacaa gcacattgg 20
 50
 <210> 449
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 449
 aggatggaca cacaagcaca 20
 60
 65 <210> 450

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 <400> 450
 ccagcaggat ggacacacaa 20
 10 <210> 451
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 <400> 451
 20 agaggccagc aggatggaca 20
 <210> 452
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 30 <400> 452
 ggcccagagg ccagcaggat 20
 <210> 453
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 40 <400> 453
 acccaggccc agaggccagc 20
 <210> 454
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 50 <400> 454
 gggccacca ggcccagagg 20
 <210> 455
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 <400> 455 20
 60 cttcccttt caaacacct 20
 65 <210> 456

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 <400> 456 20
 caatacttcc cctttcaaac 20
 10 <210> 457
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 <400> 457 20
 20 catgacaata cttcccttt 20
 <210> 458
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 30 <400> 458 20
 gaaaacatga caatacttcc 20
 <210> 459
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 40 <400> 459 20
 gggatgaaaa catgacaata 20
 <210> 460
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 50 <400> 460 20
 catgtttagg tgacttctgg 20
 <210> 461
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Compuesto antisentido
 60 <400> 461
 gacagcatgt ttaggtgact 20
 65 <210> 462

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 462
 tttaggacag catgtttagg 20
 10 <210> 463
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 463
 ctttatttag gacagcatgt 20
 20 <210> 464
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Compuesto antisentido

 <400> 464
 tccagcttta tttaggacag 20
 30 <210> 465
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 40 <400> 465
 cgagaggcgg acgggaccg 19

 <210> 466
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 50 <400> 466
 cgagaggcgg acgggaccgt t 21

 <210> 467
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido del complemento
 60 <400> 467
 ttgtctccg cctgccctgg c 21
 65 <210> 468

ES 2 666 405 T3

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido del complemento

10 <400> 468
 gctctccgcc tgcctggc 19

<210> 469
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

15 <400> 469

20 Met Gln Pro Arg Val Leu Leu Val Val Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ser Ala Arg Ala Ser Glu Ala Glu Asp Ala Ser Leu Leu Ser Phe Met
 20 25 30

25 Gln Gly Tyr Met Lys His Ala Thr Lys Thr Ala Lys Asp Ala Leu Ser
 35 40 45

Ser Val Gln Glu Ser Gln Val Ala Gln Gln Ala Arg Gly Trp Val Thr
 50 55 60

30 Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val Lys Asp Lys
 65 70 75 80

35 Phe Ser Glu Phe Trp Asp Leu Asp Pro Glu Val Arg Pro Thr Ser Ala
 85 90 95

Val Ala Ala

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un compuesto de 15 a 30 bases nitrogenadas de longitud dirigidas a:

- 5 (a) un intrón;
 (b) una unión intrón-exón; o
 (c) una unión exón-intrón

10 de una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III, en el que dicho compuesto hibrida específicamente con dicha molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III e inhibe la expresión de la apolipoproteína C-III, en el que dicho compuesto es al menos un 90% complementario a dicha molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III, para su uso en terapia.

15 2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto es un oligonucleótido antisentido.

20 3. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el compuesto tiene una secuencia que es al menos un 90% complementaria a la molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III humana.

4. El compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el compuesto tiene una secuencia que es al menos un 95% o es 100% complementaria a la molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III humana.

25 5. El compuesto para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicha molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína C-III humana que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 18.

30 6. El compuesto para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que tiene al menos una unión entre nucleósidos, resto de azúcar o base nitrogenada modificada.

7. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, que tiene al menos un resto de azúcar 2'-O-metoxietílico, unión entre nucleósidos de fosforotioato o 5-metilcitosina.

35 8. El compuesto para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho compuesto es un oligonucleótido antisentido quimérico.

40 9. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho oligonucleótido quimérico es de 20 nucleótidos de longitud, comprendiendo diez 2'-desoxinucleótidos flanqueados en cada lado por cinco nucleótidos 2'-metoxietílicos, en el que los enlaces entre nucleósidos son fosforotioato y todos los restos de citosina son 5-metilcitosinas.

45 10. El compuesto para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, para su uso en el tratamiento de un animal que tiene una enfermedad o afección asociada con la apolipoproteína C-III en un animal, en el que:

- 50 (i) la enfermedad o afección implica metabolismo de lípidos anormal;
 (ii) la enfermedad o afección implica metabolismo de colesterol anormal;
 (iii) la enfermedad o afección es aterosclerosis;
 (iv) la enfermedad o afección una afección metabólica anormal;
 (v) la enfermedad o afección es hiperlipidemia;
 (vi) la enfermedad o afección es hipertrigliceridemia;
 (vii) la enfermedad o afección es diabetes;
 (viii) la enfermedad o afección es obesidad; o
 (ix) la enfermedad o afección es enfermedad cardiovascular.

55 11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en terapia.

60

65