

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 721**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61P 3/08 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 7/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2012 PCT/US2012/056249**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13043817**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2012 E 12834215 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2758533**

54 Título: **Modulación antisentido de la expresión de GCGR**

30 Prioridad:

20.09.2011 US 201161537007 P

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

25.06.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FREIER, SUSAN M. y
BHANOT, SANJAY**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 673 721 T3

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

Modulación antisentido de la expresión de GCGR**DESCRIPCIÓN****5 Campo**

En el presente documento se proporcionan compuestos y composiciones para reducir la expresión del ARNm y la proteína del GCGR en un animal. Dichos compuestos y composiciones son útiles, por ejemplo, para tratar, prevenir, retrasar o mejorar enfermedades asociadas con trastornos metabólicos, particularmente trastornos asociados con la diabetes.

Antecedentes

La insulina y el glucagón son dos hormonas pancreáticas que intervienen en la regulación de la homeostasis y el metabolismo de la glucosa. El glucagón se secreta a partir de las células α de los islotes pancreáticos y regula la homeostasis de la glucosa a través de la modulación de la producción de glucosa hepática (Quesada y col., *J. Endocrinol.* 2008. 199: 5–19). La función principal del glucagón es contrarrestar las acciones de la insulina.

La alteración de la regulación del metabolismo de la glucosa puede deberse a una secreción y/o acción defectuosa de la insulina o a una alteración de la supresión del glucagón posprandial (Shah y col., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 1999. 277: E283–E290). Se ha demostrado que la inhibición de la secreción de glucagón posprandial en sujetos diabéticos reduce sustancialmente la glucosa en sangre, lo que sugiere que el glucagón contribuye significativamente a la hiperglucemia observada en sujetos con diabetes mellitus de tipo 2 (Shah y col., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000. 85: 4053–4059).

La diabetes tipo 2 se caracteriza por la alteración de la secreción y/o acción de la insulina, y muchos sujetos también exhiben niveles inapropiados de glucagón circulante en el estado de ayuno y posprandial. Un aumento en la relación glucagón/insulina es, probablemente, un determinante importante de la hiperglucemia observada en pacientes con diabetes de tipo 2 (Baron y col., *Diabetes.* 1987. 36: 274–283). La falta de supresión de la secreción de glucagón posprandial en sujetos con DMT2 también desempeña un papel importante en la patogenia de la hiperglucemia posprandial (Henkel y col., *Metabolism.* 2005. 54: 1168–1173).

El glucagón ejerce su acción sobre los tejidos diana mediante la activación de su receptor, GCGR. El receptor del glucagón es una proteína de 62 kDa que es un miembro de la familia de receptores acoplados a la proteína G de clase B (Brubaker y col., *Recept. Channels.* 2002. 8: 179–88). La activación del GCGR conduce a la transducción de señal por las proteínas G ($G_{s\alpha}$ y G_q), mediante el cual $G_{s\alpha}$ activa la adenilato ciclasa, que causa la producción de AMPc, lo que da como resultado un aumento de los niveles de proteína quinasa A. La señalización del GCGR en el hígado da como resultado un aumento de la producción de glucosa hepática por inducción de la glucogenolisis y la gluconeogénesis junto con inhibición de la glucogénesis (Jiang y Zhang. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003. 284: E671–E678). El GCGR también se expresa en tejidos extrahepáticos, que incluyen corazón, músculo liso intestinal, riñón, cerebro y tejido adiposo (Hansen y col., *Peptides.* 1995. 16: 1163–1166).

La inhibición antisentido del GCGR proporciona una ventaja única sobre los inhibidores tradicionales de molécula pequeña en que los inhibidores antisentido no dependen de la unión competitiva del compuesto a la proteína e inhiben la actividad directamente al reducir la expresión del GCGR. Una patente de Estados Unidos representativa que enseña inhibidores antisentido del GCGR incluye la patente de Estados Unidos n.º 7.750.142. La tecnología antisentido está emergiendo como un medio eficaz para reducir la expresión de ciertos productos génicos y, por lo tanto, puede resultar especialmente útil en una serie de aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y de investigación para la modulación del GCGR.

El documento WO 01/77384 describe la detección de polimorfismos de un solo nucleótido y metilaciones de citosina.

El documento US 2007/031843 describe un grupo de oligonucleótidos reguladores bacterianos y asociados a bacterias.

El documento WO 2007/134014 describe compuestos y procedimientos para modular la expresión de GCGR.

Los documentos WO 2007/035771, WO 2004/096996 y US 2007/238690 describen la modulación de la expresión del receptor de glucagón.

Actualmente hay una falta de opciones aceptables para tratar trastornos metabólicos. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar compuestos y composiciones para usar en el tratamiento de tales enfermedades y trastornos. La presente invención se refiere al descubrimiento de nuevos inhibidores altamente potentes de la expresión génica de GCGR.

Sumario

La invención proporciona un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado monocatenario que consiste en la secuencia de bases nucleotídicas de la SEQ ID NO: 11, en la que el oligonucleótido comprende:

- 5 un segmento separador que consiste en diez desoxinucleósidos unidos;
 un segmento del ala en 5' que consiste en tres nucleósidos unidos;
 un segmento del ala en 3' que consiste en cuatro nucleósidos unidos;

10 en el que el segmento separador está situado inmediatamente adyacente a y entre el segmento del ala 5' y el segmento del ala 3', en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado 2'-O-metoxietilo, en el que cada enlace internucleosídico es un enlace de dicho oligonucleótido modificado es un enlace fosforotioato y en el que cada resto de citosina de dicho oligonucleótido modificado es una 5-metilcitosina.

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

La invención también proporciona un compuesto de la invención o una composición de la invención para su uso en terapia.

20 La invención también proporciona un compuesto de la invención o una composición de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad metabólica en un ser humano, opcionalmente en el que la enfermedad metabólica es diabetes.

25 En el presente documento se desvelan procedimientos, compuestos y composiciones para modular la expresión de GCGR y tratar, prevenir, retrasar o mejorar enfermedades asociadas con trastornos metabólicos, particularmente trastornos asociados con diabetes y/o un síntoma de los mismos.

Descripción detallada

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

40 Los títulos de las secciones usadas en el presente documento son sólo para propósitos de organización y no deben interpretarse como una limitación del objeto descrito.

Definiciones

45 A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura usada en relación con la química analítica, la química orgánica sintética y la química medicinal y farmacéutica descritas en el presente documento y los procedimientos y técnicas de las mismas descritos en el presente documento son los bien conocidos y usados habitualmente en la técnica. Se pueden usar técnicas estándar para síntesis química y análisis químico.

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

50 "2'-O-metoxietilo" (también 2'-MOE y 2'-O (CH₂)₂-OCH₃) se refiere a una modificación de O-metoxi-etilo de la posición 2' de un anillo de furosilo. Un azúcar modificado 2'-O-metoxietilo es un azúcar modificado.

"Nucleótido 2'-O-metoxietilo" significa un nucleótido que comprende un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo.

55 "Sitio diana en 3'" se refiere al nucleótido de un ácido nucleico diana que es complementario al nucleótido más en 3' de un compuesto antisentido concreto.

"Sitio diana en 5'" se refiere al nucleótido de un ácido nucleico diana que es complementario al nucleótido más en 5' de un compuesto antisentido concreto.

60 "5-metilcitosina" significa una citosina modificada con un grupo metilo unido a la posición 5'. Una 5-metilcitosina es una base nucleotídica modificada.

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

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

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

Adiposidad" u "Obesidad" se refiere al estado de estar obeso o a una cantidad excesivamente alta de grasa corporal o tejido adiposo en relación con la masa corporal magra. La cantidad de grasa corporal incluye la preocupación por la distribución de grasa en todo el cuerpo y el tamaño y la masa de los depósitos de tejido adiposo. La distribución de la grasa corporal se puede estimar mediante medidas de los pliegues cutáneos, las relaciones de la circunferencia cintura-cadera o técnicas tales como obtención de imágenes por ultrasonidos, tomografía computarizada o resonancia magnética. De acuerdo con el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, las personas con un índice de masa corporal (IMC) de 30 o más se consideran obesos. El término "Obesidad", tal como se usa en el presente documento, incluye afecciones en las que existe un aumento en la grasa corporal más allá de los requisitos físicos como resultado de la acumulación excesiva de tejido adiposo en el cuerpo. El término "obesidad" incluye, aunque sin limitaciones, las siguientes afecciones: obesidad de inicio en el adulto; obesidad alimentaria; obesidad endógena o inflamatoria; obesidad endocrina; obesidad familiar; obesidad hiperinsulinar; obesidad hiperplásica-hipertrófica; obesidad hipogonadal; obesidad hipotiroidea; obesidad de por vida; obesidad mórbida y obesidad exógena.

"Administrado de forma concomitante" se refiere a la administración conjunta de dos agentes de cualquier manera en la que los efectos farmacológicos de ambos se manifiesten en el paciente al mismo tiempo. La administración concomitante no requiere que ambos agentes se administren en una única composición farmacéutica, en la misma forma de dosificación, o por la misma vía de administración. Los efectos de ambos agentes no necesitan manifestarse al mismo tiempo. Los efectos solo necesitan superponerse durante un período de tiempo y no necesitan ser coextensos,

"Administrar" significa proporcionar un agente a un animal e incluye, entre otros, la administración por un profesional médico y la autoadministración.

"Agente" significa una sustancia activa que puede proporcionar un beneficio terapéutico cuando se administra a un animal. "Primer agente" significa un compuesto terapéutico proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, un primer agente puede ser un oligonucleótido antisentido dirigido a GCGR. "Segundo agente" significa un segundo compuesto terapéutico descrito en el presente documento (por ejemplo, un segundo oligonucleótido antisentido dirigido al GCGR) y/o un compuesto terapéutico no GCGR.

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

"Animal" se refiere a un animal humano o no humano, incluidos, entre otros, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y primates no humanos, incluidos, entre otros, monos y chimpancés.

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

"Compuesto antisentido" significa un compuesto oligomérico que es capaz de sufrir hibridación con un ácido nucleico diana a través de enlaces de hidrógeno.

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

"Oligonucleótido antisentido" significa un oligonucleótido monocatenario que tiene una secuencia de bases nucleotídicas que permite la hibridación a una región o segmento correspondiente de un ácido nucleico diana.

"Azúcar bicíclico" significa un anillo de furosilo modificado por el puente de dos átomos en el anillo no geminal. Un azúcar bicíclico es un azúcar modificado.

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

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

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

"Compuesto antisentido quimérico" significa un compuesto antisentido que tiene al menos dos regiones químicamente distintas.

"Coadministración" significa la administración de dos o más agentes a un individuo. Los dos o más agentes pueden estar en una única composición farmacéutica o pueden estar en composiciones farmacéuticas distintas. Cada uno de los dos o más agentes se puede administrar a través de las mismas vías de administración u otras diferentes. La coadministración abarca la administración en paralelo o secuencial.

El "colesterol" es una molécula de esteroide que se encuentra en las membranas celulares de todos los tejidos animales. El colesterol debe ser transportado en el plasma sanguíneo de un animal por las lipoproteínas, incluidas lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). El "colesterol plasmático" se refiere a la suma del

colesterol esterificado y/o no esterificado en las lipoproteínas (VDL, IDL, LDL, HDL) presente en el plasma o suero.

"Complementariedad" significa la capacidad de apareamiento entre bases nucleotídicas de un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico.

5 "Bases nucleotídicas contiguas" significa bases nucleotídicas inmediatamente adyacentes entre sí.

"Desoxirribonucleótido" quiere decir un nucleótido que tiene un hidrógeno en la posición 2' de la porción azúcar del nucleótido. Los desoxirribonucleótidos pueden estar modificados con cualquiera de diversos sustituyentes.

10 "Diabetes mellitus" o "diabetes" es un síndrome caracterizado por un metabolismo desordenado y niveles anormalmente altos de azúcar en la sangre (hiperglucemia) como resultado de niveles insuficientes de insulina o sensibilidad reducida a la insulina. Los síntomas característicos son producción excesiva de orina (poliuria) debido a niveles altos de glucosa en sangre, sed excesiva y aumento de la ingesta de líquidos (polidipsia) que intentan compensar el aumento de la micción, visión borrosa debido a los altos niveles de glucosa en la papila ocular, pérdida de peso inexplicable y letargo.

15 "Dislipidemia diabética" o "diabetes de tipo 2 con dislipidemia" significa una afección caracterizada por diabetes de tipo 2, niveles reducidos de HDL-C, niveles elevados de triglicéridos elevados y niveles elevados de las pequeñas LDL densas.

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

20 "Dislipidemia" se refiere a un trastorno del metabolismo de los lípidos y/o las lipoproteínas, incluyendo la sobreproducción o deficiencia de lípidos y/o lipoproteínas. Las dislipidemias pueden manifestarse por elevación de lípidos, tales como colesterol y triglicéridos, así como lipoproteínas, tales como colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL).

25 "Dosis" significa una cantidad especificada de un agente farmacéutico proporcionada en una sola administración, o en un período de tiempo específico. En ciertas realizaciones, una dosis se puede administrar en uno, dos o más bolos, comprimidos o inyecciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones en las que se desea la administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen no acomodado fácilmente por una única inyección, por lo tanto, se pueden usar dos o más inyecciones para alcanzar la dosis deseada. En ciertas realizaciones, el agente farmacéutico se administra por infusión durante un período prolongado de tiempo o continuamente. Las dosis se pueden indicar como la cantidad de agente farmacéutico por hora, día, semana o mes.

30 "Cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" significan la cantidad de agente farmacéutico activo suficiente para efectuar un resultado fisiológico deseado en un individuo que necesita el agente. La cantidad efectiva puede variar entre individuos dependiendo de la salud y la condición física del individuo a tratar, el grupo taxonómico de los individuos a tratar, la formulación de la composición, la evaluación de la afección médica del individuo y otros factores relevantes.

35 "Completamente complementario" o "100% complementario" significa que cada base nucleotídica de una secuencia de bases nucleotídicas de un primer ácido nucleico tiene una base nucleotídica complementaria en una segunda secuencia de bases nucleotídicas de un segundo ácido nucleico. En ciertas realizaciones, un primer ácido nucleico es un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana es un segundo ácido nucleico.

40 "Gapmero" significa un compuesto antisentido quimérico en el que una región interna que tiene una pluralidad de nucleósidos que soportan la escisión de ARNasa H está situada entre regiones externas que tienen uno o más nucleósidos, en el que los nucleósidos que comprenden la región interna son químicamente distintos del nucleósido o nucleósidos que comprenden las regiones externas. La región interna se puede denominar "segmento separador" y las regiones externas se pueden denominar "segmentos del ala".

45 "Receptor del glucagón" o "GCGR" significa cualquier ácido nucleico o proteína del GCGR. "Expresión del GCGR" significa el nivel de ARNm transcrito del gen que codifica el GCGR o el nivel de proteína traducida del ARNm. La expresión del GCGR puede determinarse por procedimientos conocidos en la técnica, tales como una transferencia Northern o Western.

50 "Ácido nucleico del GCGR" significa cualquier ácido nucleico que codifica el GCGR. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ácido nucleico de GCGR incluye, una secuencia de ADN que codifica el GCGR, una secuencia de ARN transcrita a partir de ADN que codifica el GCGR (incluyendo ADN genómico que comprende intrones y exones) y una secuencia de ARNm que codifica GCGR. "ARNm de GCDR" significa un ARNm que codifica una proteína de GCGR.

55 "Glucosa" es un monosacárido utilizado por las células como fuente de energía e intermediario inflamatorio.

"Glucosa plasmática" se refiere a la glucosa presente en el plasma.

"Hibridación" significa la reunión de moléculas de ácido nucleico complementarias. En ciertas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico complementarias incluyen un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana.

60 "Hiperlipidemia" o "hiperlipemia" es una afección caracterizada por niveles elevados de lípidos séricos o lípidos circulantes (en plasma). Esta afección se manifiesta por una concentración anormalmente alta de grasas. Las fracciones de lípidos en la sangre circulante son colesterol, lipoproteínas de baja densidad, lipoproteínas de muy baja densidad y triglicéridos.

"Hipertrigliceridemia" significa una afección caracterizada por niveles elevados de triglicéridos.

65 "Identificar" o "seleccionar un animal con una afección metabólica" significa identificar o seleccionar a un sujeto al que se ha diagnosticado una enfermedad metabólica o un trastorno metabólico; o, identificar o seleccionar un sujeto que tenga cualquier síntoma de una enfermedad metabólica, incluyendo, pero sin limitaciones, síndrome

- metabólico, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hipertensión, resistencia aumentada a la insulina, sensibilidad a la insulina disminuida, peso corporal y/o grasa corporal por encima de lo normal o cualquier combinación de los mismos. Dicha identificación puede lograrse mediante cualquier procedimiento, incluyendo, pero sin limitaciones, pruebas o evaluaciones clínicas estándar, tales como la medición de la glucosa en sangre (en plasma) o en suero, la medición de triglicéridos en suero o circulantes (plasma), la medición de la presión arterial, la medición de la grasa corporal, la medición del peso corporal y similares.
- 5 "Inmediatamente adyacente" significa que no hay elementos intermedios entre los elementos inmediatamente adyacentes.
- "Individuo" o "sujeto" o "animal" significa un animal humano o no humano seleccionado para tratamiento o
- 10 terapia.
- "Inhibir la expresión o actividad" se refiere a una reducción o bloqueo de la expresión o actividad de un ARN o proteína y no necesariamente indica una eliminación total de la expresión o actividad.
- La "resistencia a la insulina" se define como la afección en la cual las cantidades normales de insulina son inadecuadas para producir una respuesta normal a la insulina de las células grasas, musculares y hepáticas. La
- 15 resistencia a la insulina en las células grasas da como resultado la hidrólisis de los triglicéridos almacenados, que eleva los ácidos grasos libres en el plasma sanguíneo. La resistencia a la insulina en el músculo reduce la captación de glucosa, mientras que la resistencia a la insulina en el hígado reduce el almacenamiento de glucosa y ambos efectos sirven para elevar la glucosa en sangre. Los altos niveles plasmáticos de insulina y glucosa debido a la resistencia a la insulina a menudo conducen al síndrome metabólico y a diabetes de tipo 2.
- 20 La "sensibilidad a la insulina" es una medida de la eficacia con que un individuo procesa la glucosa. Un individuo con alta sensibilidad a la insulina procesa la glucosa de forma eficaz, mientras que un individuo con baja sensibilidad a la insulina no procesa la glucosa de manera eficaz.
- Enlace internucleosídico" se refiere al enlace químico entre nucleósidos.
- "Administración intravenosa" significa administración en una vena.
- 25 "Nucleósidos unidos" significa nucleósidos adyacentes que están unidos entre sí.
- "Terapia hipolipemiente" o "agente reductor de lípidos" significa un régimen terapéutico proporcionado a un sujeto para reducir uno o más lípidos en un sujeto. En ciertas realizaciones, se proporciona una terapia hipolipemiente para reducir uno o más de ApoB, colesterol total, LDL-C, VLDL-C, IDL-C, no-HDL-C, triglicéridos, partículas de LDL pequeñas densas y Lp (a) en un sujeto. Los ejemplos de terapia hipolipemiente incluyen
- 30 estatinas, fibratos e inhibidores de MTP.
- "Factores principales de riesgo" se refiere a factores que contribuyen a un alto riesgo de una enfermedad o afección concreta. En ciertas realizaciones, los factores principales de riesgo de cardiopatía coronaria incluyen, entre otros, tabaquismo, hipertensión, niveles bajos de HDL-C, antecedentes familiares de cardiopatía coronaria, la edad y otros factores desvelados en el presente documento.
- 35 "Enfermedad metabólica" o "trastorno metabólico" se refiere a una afección caracterizada por una alteración o interrupción de la función metabólica. "Metabólica/o" y "metabolismo" son términos bien conocidos en la técnica y generalmente incluyen toda la gama de procesos bioquímicos que se producen dentro de un organismo vivo. Enfermedades o trastornos metabólicos incluyen, entre otros, obesidad, diabetes, hiperglucemia, prediabetes, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), síndrome metabólico, resistencia a la insulina, dislipidemia diabética o hipertrigliceridemia o una combinación de los mismos.
- 40 "Síndrome metabólico" significa una afección caracterizada por una combinación de factores de riesgo cardiovascular lipídicos y no lipídicos de origen metabólico. En ciertas realizaciones, el síndrome metabólico se identifica por la presencia de cualquiera de los 3 factores siguientes: circunferencia de la cintura mayor de 102 cm en varones o mayor de 88 cm en mujeres; triglicéridos séricos de al menos 150 mg/dl; HDL-C menor de 40
- 45 mg/dl en varones o menos de 50 mg/dl en mujeres; presión arterial de al menos 130/85 mmHg; y glucosa en ayunas de al menos 110 mg/dl. Estos determinantes se pueden medir fácilmente en la práctica clínica (JAMA, 2001, 285: 2486–2497).
- "Apareamiento erróneo" o "base nucleotídica no complementaria" se refiere al caso en el que una base nucleotídica de un primer ácido nucleico no es capaz de aparearse con la base nucleotídica correspondiente de un segundo ácido nucleico diana.
- 50 "Dislipidemia mixta" significa una afección caracterizada por niveles elevados de colesterol y niveles elevados de triglicéridos.
- "Enlace internucleosídico modificado" se refiere a una sustitución o cualquier cambio de un enlace internucleosídico de origen natural (es decir, un enlace internucleosídico fosfodiéster).
- 55 "Base nucleotídica modificada" se refiere a cualquier base nucleotídica que no sea adenina, citosina, guanina, timidina o uracilo. Una "base nucleotídica no modificada" significa las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U).
- Un "nucleósido modificado" significa un nucleósido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado o una base nucleotídica modificada.
- 60 "Nucleótido modificado" significa un nucleótido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado, un enlace internucleosídico modificado o una base nucleotídica modificada. Un "nucleósido modificado" significa un nucleótido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado o una base nucleotídica modificada.
- "Oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido que comprende al menos un nucleótido modificado.
- "Azúcar modificado" se refiere a una sustitución o cambio de un azúcar natural.
- 65 "Motivo" significa el patrón de regiones químicamente distintas en un compuesto antisentido.
- "Enlace internucleosídico que se produce de forma natural" significa un enlace fosfodiéster de 3'a 5'.

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

"Enfermedad del hígado graso no alcohólico ("NAFLD") se refiere a una afección caracterizada por la inflamación grasa del hígado que no se debe a un abuso del consumo de alcohol (por ejemplo, consumo de alcohol de más de 20 g/día). En ciertas realizaciones, la NAFLD está relacionada con la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico. La NAFLD abarca un espectro de enfermedades que van desde la simple acumulación de triglicéridos en los hepatocitos (esteatosis hepática) hasta la esteatosis hepática con inflamación (esteatohepatitis), fibrosis y cirrosis.

"Esteatohepatitis no alcohólica" (NASH)" se produce a partir de la progresión de NAFLD más allá del depósito de triglicéridos. Para el desarrollo de NASH se requiere un "segundo desencadenante" capaz de inducir necrosis, inflamación y fibrosis. Los candidatos para el segundo desencadenante se pueden agrupar en amplias categorías: factores que causan un aumento en el estrés oxidativo y factores que promueven la expresión de citocinas proinflamatorias.

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

"Base nucleotídica" significa un resto heterocíclico capaz de aparearse con una base de otro ácido nucleico.

"Secuencia de bases nucleotídicas" significa el orden de las bases nucleotídicas contiguas independientemente de cualquier modificación de azúcares, enlaces o bases nucleotídicas.

"Nucleósido" significa una base nucleotídica unida a un azúcar.

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

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

"Compuesto oligomérico" u "oligómero" se refiere a una estructura polimérica que comprende dos o más subestructuras y que es capaz de hibridar con una región de una molécula de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleósidos. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos quiméricos.

"Oligonucleótido" significa un polímero de nucleósidos unidos cada uno de los cuales puede ser modificado o no modificado, uno independiente del otro.

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

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

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

"Composición farmacéutica" significa una mezcla de sustancias adecuadas para administrar a un individuo. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender agentes farmacéuticos y una solución acuosa estéril.

"Vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un medio o diluyente que no interfiere con la estructura del oligonucleótido. Ciertos de dichos vehículos permiten formular las composiciones farmacéuticas en forma de, por ejemplo, comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y pastillas para ingestión por un sujeto. Por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser una solución acuosa estéril.

"Derivado farmacéuticamente aceptable" abarca sales, conjugados, profármacos o isómeros farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en el presente documento.

"Sales farmacéuticamente aceptables" significa sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de compuestos antisentido, es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del oligonucleótido precursor y no imparten efectos toxicológicos indeseados a los mismos.

"Enlace de fosforotioato" significa un enlace entre nucleósidos en el enlace fosfodiéster se modifica reemplazando uno de los átomos de oxígeno que no forman un puente por un átomo de azufre. Un enlace fosforotioato es un enlace internucleosídico modificado.

"Porción" significa un número definido de bases nucleotídicas contiguas (es decir, unidas) de un ácido nucleico. En ciertas realizaciones, una porción es un número definido de bases nucleotídicas contiguas de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, una porción es un número definido de bases nucleotídicas contiguas de un compuesto antisentido.

"Prevenir" se refiere a retrasar o prevenir el inicio o desarrollo de una enfermedad, trastorno o afección durante un período de tiempo de minutos a indefinidamente. Prevenir también significa reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección.

"Profármaco" significa un agente terapéutico que se prepara en forma inactiva que se convierte en una forma activa dentro del cuerpo o las células del mismo por acción de enzimas endógenas u otros productos químicos y/o condiciones.

"Efectos secundarios" significa respuestas fisiológicas atribuibles a un tratamiento diferente a los efectos deseados. En ciertas realizaciones, los efectos secundarios incluyen reacciones en el sitio de la inyección, anomalías en las pruebas de función hepática, anomalías en la función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anomalías en el sistema nervioso central, miopatías y malestar general. Por ejemplo, incrementos en los niveles de aminotransferasas en suero pueden indicar toxicidad hepática o anomalías en la función hepática. Por ejemplo, incrementos en los niveles de bilirrubina pueden indicar toxicidad hepática o anomalías en la función hepática.

"Oligonucleótido monocatenario" significa un oligonucleótido que no está hibridado con una cadena complementaria.

"Específicamente hibridable" se refiere a un compuesto antisentido que tiene un grado suficiente de complementariedad entre un oligonucleótido antisentido y un ácido nucleico diana para inducir un efecto deseado, mientras que exhibe efectos mínimos o nulos sobre ácidos nucleicos no diana en condiciones en las que se desea unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo y tratamientos terapéuticos.

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

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

"De dirección" o "dirigido" significa el proceso de diseño y selección de un compuesto antisentido que se hibridará específicamente con un ácido nucleico diana e inducirá un efecto deseado.

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

"Segmento diana" significa la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico diana al que se dirige un compuesto antisentido. El "sitio diana en 5'" se refiere al nucleótido más en 5' de un segmento diana. El "sitio diana en 3'" se refiere al nucleótido más en 3' de un segmento diana.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un agente que proporciona un beneficio terapéutico a un individuo.

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

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

"Diabetes de tipo 2" (también conocida como "diabetes mellitus de tipo 2" o "diabetes mellitus, tipo 2", anteriormente llamada "diabetes mellitus de tipo 2", "diabetes no insulino dependiente (DMNID)", "diabetes relacionada con la obesidad" o "diabetes de inicio en el adulto ") es un trastorno metabólico que se caracteriza principalmente por resistencia a la insulina, deficiencia relativa de insulina e hiperglucemia.

"Tratar" se refiere a administrar una composición farmacéutica a un animal para efectuar una alteración o mejora de una enfermedad, trastorno o afección.

"Nucleótido no modificado" significa un nucleótido compuesto por bases nucleotídicas naturales, restos de azúcar y enlaces internucleosídicos. En ciertas realizaciones, un nucleótido no modificado es un nucleótido de ARN (es decir, β -D-ribonucleósidos) o un nucleótido de ADN (es decir, β -D-desoxirribonucleósidos).

Ciertas realizaciones

Ciertas realizaciones de la divulgación son compuestos y composiciones para inhibir la expresión de GCGR.

Ciertas realizaciones divulgan compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del GCGR. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico del GCGR es cualquiera de las secuencias indicadas en el número de acceso en GENBANK NM_000160.3 (incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 1) o número de acceso en GENBANK: NW_926918.1 truncado desde los nucleótidos 16865000 a 16885000 (incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 2). En ciertas realizaciones, el GCGR tiene la secuencia del mono rhesus como se expone en la SEQ ID NO: 3.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones desvelados en el presente documento comprenden un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos que tienen una secuencia de bases nucleotídicas complementarias a una porción de igual longitud de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones desvelados en el presente documento consisten en de 12 a 30 nucleósidos unidos y tienen una secuencia de bases nucleotídicas que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 bases nucleotídicas contiguas de cualquiera de las SEQ ID NO: 4-115.

En la invención, el compuesto o composición es o comprende ISIS NO: 449884.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones proporcionados en el presente documento comprenden una sal del oligonucleótido modificado.

5 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones proporcionados en el presente documento comprenden además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 En ciertas realizaciones de la divulgación, los siguientes compuestos antisentido están dirigidos a una región de la SEQ ID NO 2, un ácido nucleico que codifica el GCGR humano y que demuestran al menos un 90 % de inhibición de una secuencia del gen del GCGR: NO ISIS: 449823, 398457, 449883, 449884, 449885, 449894, 449895, 449906, 398486, 449917, 449938, 449945, 448806, 450061, 449951, 398504, 449952, 449953, 449954, 448817, 449955, 449958, 449960, 448819, 448848, 450074, 449859, 459157, 459010, 459087, 459086, 459083, 459082, 459158, 436140, 398503, 398507, 304535, 304538, 304539, 436141 y 436164.

15 En ciertas realizaciones de la divulgación, los siguientes compuestos antisentido están dirigidos a una región de la SEQ ID NO 2, un ácido nucleico que codifica el GCGR humano y que demuestran al menos un 90 % de inhibición de una secuencia del gen del GCGR: NO ISIS: 398457, 449883, 398486, 448806, 448817, 448819, 459010, 459087, 459086, 398507, 304535 y 304538.

20 En ciertas realizaciones de la divulgación, los siguientes compuestos antisentido están dirigidos a una región de la SEQ ID NO 2, a un ácido nucleico que codifica el GCGR humano y demuestran un valor de CI_{50} de menos de 0,2 μ M: NO ISIS: 304538, 398457, 398486, 398504, 398506, 398507, 448730, 448802, 448819, 448848, 448850, 448890, 449884, 459010, 459011, 459040, 459076, 459082, 459083, 459157 y 459158.

25 En ciertas realizaciones de la divulgación, los siguientes compuestos antisentido están dirigidos a una región de la SEQ ID NO 2, a un ácido nucleico que codifica el GCGR humano y demuestran un valor de CI_{50} de menos de 0,1 μ M: NO ISIS: 398457, 398507, 448819, 448848, 448850, 459010, 459011, 459083, 459157 y 459158.

30 En ciertas realizaciones de la divulgación, las secuencias de bases nucleotídicas enumeradas en las siguientes SEQ ID NO muestran al menos un 90 % de inhibición de un ácido nucleico del GCGR: 5, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 19, 24, 26, 38, 42, 43, 44, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 57, 58, 62, 67, 76, 85, 86, 91, 92, 93, 95, 96, 102, 107, 109, 111, 112, 113, 114 y 115.

35 En ciertas realizaciones de la divulgación, las secuencias de bases nucleotídicas enumeradas en las siguientes SEQ ID NO muestran al menos un 95 % de inhibición de un ácido nucleico del GCGR: 9, 10, 24, 43, 52, 58, 86, 91, 92, 109, 111 y 112.

40 En ciertas realizaciones de la divulgación, los compuestos proporcionados en el presente documento tienen un potencial terapéutico mayor que los NO, ISIS: 315163, 325568 y 310457 (desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 7.399.853 y la solicitud de patente publicada de Estados Unidos n.º US2007-0087987). En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados en el presente documento tienen una mejor inhibición *in vivo* con respecto a los NO. ISIS: 315163, 325568 y 310457. En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados en el presente documento tienen un perfil de tolerabilidad mejor que los NO. ISIS: 315163, 325568 y 310457.

45 En ciertas realizaciones, el compuesto proporcionado en el presente documento consiste en un oligonucleótido modificado monocatenario.

50 En ciertas realizaciones, al menos un enlace internucleosídico del oligonucleótido modificado es un enlace internucleosídico modificado. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico fosforotioato.

En ciertas realizaciones, al menos un nucleósido de dicho oligonucleótido modificado comprende una base nucleotídica modificada. En ciertas realizaciones, la base nucleotídica modificada es una 5-metilcitosina.

55 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado comprende: a) un segmento separador que consiste en desoxinucleósidos unidos; b) un segmento de ala en 5' que consiste en nucleósidos unidos; y c) un segmento de ala en 3' que consiste en nucleósidos unidos. El segmento separador está situado entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3' y cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado.

60 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste en 17 nucleósidos unidos, en el que el segmento separador consiste en diez desoxinucleósidos unidos, el segmento de ala 5' consiste en tres nucleósidos unidos, el segmento de ala 3' consiste en cuatro nucleósidos unidos, cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada citosina es una 5-metilcitosina.

65 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones desvelados en el presente documento comprenden un oligonucleótido modificado que consiste en 17 nucleósidos unidos que tienen una secuencia de bases nucleotídicas

que comprende al menos 16 bases nucleotídicas contiguas de SEQ ID NO: 11, en la que el oligonucleótido modificado comprende: a) un segmento separador que consiste en diez desoxinucleósidos unidos; b) un segmento de ala en 5' que consiste en cuatro nucleósidos unidos; y c) un segmento de ala en 3' que consiste en cuatro nucleósidos unidos. El segmento separador está situado inmediatamente adyacente a y entre el segmento del ala 5' y el segmento del ala 3', en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada resto de citosina es una 5-metilcitosina.

Ciertas realizaciones de la divulgación son compuestos y composiciones para inhibir la expresión de GCGR.

10 Ciertas realizaciones de la divulgación son procedimientos para reducir la expresión de GCGR en un animal que comprende administrar al animal un compuesto como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 17 nucleósidos unidos de longitud dirigido al GCGR.

15 Ciertas realizaciones de la divulgación son procedimientos para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad metabólica en un animal que comprende administrar al animal un compuesto como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 17 nucleósidos unidos de longitud dirigido al GCGR. Ejemplos de enfermedades o trastornos metabólicos incluyen, entre otros, diabetes, hiperglucemia, prediabetes, obesidad, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), síndrome metabólico, resistencia a la insulina, dislipidemia diabética o hipertrigliceridemia o una combinación de los mismos.

25 Ciertas realizaciones de la divulgación son procedimientos para prevenir, mejorar o tratar la obesidad en un animal que comprende administrar al animal un compuesto como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 17 nucleósidos unidos de longitud dirigido al GCGR. En ciertas realizaciones, el compuesto o composición comprende el compuesto de ISIS NO: 449884.

30 Ciertas realizaciones de la divulgación son procedimientos para prevenir, mejorar o tratar la diabetes en un animal que comprende administrar al animal un compuesto como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 17 nucleósidos unidos de longitud dirigido al GCGR. En ciertas realizaciones, el compuesto o composición comprende el compuesto de ISIS NO: 449884.

35 Ciertas realizaciones de la divulgación son procedimientos para reducir el peso corporal en un animal que comprende administrar al animal un compuesto como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 12 a 30 nucleósidos unidos de longitud dirigido al GCGR. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 17 nucleósidos unidos de longitud dirigido al GCGR. En ciertas realizaciones, la reducción del peso corporal en un animal previene, mejora o trata una enfermedad metabólica. En ciertas realizaciones, la reducción del peso corporal en un animal previene, mejora o trata la diabetes. En ciertas realizaciones, la reducción del peso corporal en un animal previene, mejora o trata la obesidad. En ciertas realizaciones, la reducción del peso corporal en un animal previene, mejora o trata el síndrome metabólico. En ciertas realizaciones, la reducción del peso corporal en un animal previene, mejora o trata la resistencia a la insulina. En ciertas realizaciones, la reducción del peso corporal en un animal previene, mejora o trata la hiperglucemia. En ciertas realizaciones, la reducción del peso corporal en un animal previene, mejora o trata la NAFLD. En ciertas realizaciones, la reducción del peso corporal en un animal previene, mejora o trata la dislipidemia diabética. En ciertas realizaciones, los niveles de glucosa se reducen en al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %.

50 Ciertas realizaciones de la divulgación son procedimientos para reducir los niveles de glucosa en un animal que comprende administrar al animal un compuesto como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 17 nucleósidos unidos de longitud dirigido al GCGR. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, mejora o trata una enfermedad metabólica. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, mejora o trata la diabetes. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, mejora o trata la obesidad. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, mejora o trata el síndrome metabólico. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, mejora o trata la resistencia a la insulina. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, mejora o trata la hiperglucemia. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, mejora o trata la NAFLD. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, mejora o trata la dislipidemia diabética. En ciertas realizaciones, el nivel de glucosa se reducen en al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %.

65 En ciertas realizaciones, el GCGR tiene la secuencia humana, tal como se expone en cualquiera de los números de acceso en GENBANK: número de acceso en GENBANK NM_000160.3 (incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 1) o número de acceso en GENBANK: NW_926918.1 truncado desde los nucleótidos 16865000 a

16885000 (incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 2). En ciertas realizaciones, el GCGR tiene la secuencia del mono rhesus como se expone en la SEQ ID NO: 3.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones proporcionados en el presente documento comprenden una sal de los mismos además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 17 a 35 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nucleotídicas que comprende al menos 17 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de bases nucleotídicas citadas en la SEQ ID NO: 11 o una sal de las mismas y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Ciertas realizaciones de la divulgación son procedimientos para tratar un animal con una enfermedad o afección relacionada con el GCGR, que comprenden: a) identificar dicho animal con una enfermedad o afección relacionada con el GCGR, y b) administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 12 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nucleotídicas al menos un 90% complementaria de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3 as medido sobre la totalidad de dicho oligonucleótido modificado. En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto administrado al animal trata o reduce la enfermedad o afección relacionada con el GCGR, o un síntoma de la misma, en el animal. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección relacionada con el GCGR es obesidad. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección relacionada con el GCGR es diabetes.

Ciertas realizaciones de la divulgación son procedimientos para tratar un animal con una enfermedad o afección relacionada con el GCGR, que comprenden: a) identificar dicho animal con una enfermedad o afección relacionada con el GCGR, y b) administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 17 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nucleotídicas al menos un 100 % complementaria de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3 as medido sobre la totalidad de dicho oligonucleótido modificado. En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto administrado al animal trata o reduce la enfermedad o afección relacionada con el GCGR, o un síntoma de la misma, en el animal. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección relacionada con el GCGR es obesidad. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección relacionada con el GCGR es diabetes.

Ciertas realizaciones de la divulgación son procedimientos para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad metabólica. En ciertas realizaciones, la enfermedad metabólica es obesidad, diabetes, hiperglucemia, prediabetes, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), síndrome metabólico, resistencia a la insulina, dislipidemia diabética o hipertrigliceridemia o una combinación de los mismos.

Ciertas realizaciones de la divulgación son procedimientos que comprenden administrar a un animal un compuesto como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende administrar a un animal un oligonucleótido modificado que consiste en de 17 a 35 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada entre las secuencias de bases nucleotídicas citadas en la SEQ ID NO: 11.

En ciertas realizaciones, el animal es un ser humano.

En ciertas realizaciones, la administración previene, trata, mejora o ralentiza la progresión de una enfermedad metabólica como se describe en el presente documento.

En ciertas realizaciones, la administración previene, trata, mejora o ralentiza la progresión de la obesidad como se describe en el presente documento.

En ciertas realizaciones, la administración previene, trata, mejora o ralentiza la progresión de la diabetes como se describe en el presente documento.

En ciertas realizaciones, el compuesto se coadministra con un segundo agente.

En ciertas realizaciones, el compuesto y el segundo agente se administran de forma concomitante.

En determinadas realizaciones, la administración es administración parenteral.

Ciertas realizaciones de la divulgación son procedimientos para reducir la expresión de ARNm o proteína del GCGR en un animal que comprende administrar al animal un compuesto o composición como se describe en el presente documento para reducir la expresión de ARNm o proteína del GCGR en el animal. En ciertas realizaciones, el animal es un ser humano. En ciertas realizaciones, la reducción de la expresión de ARNm o proteína del GCGR previene, trata, mejora o ralentiza la progresión de la enfermedad metabólica. En ciertas realizaciones, la afección o enfermedad metabólica es diabetes. En ciertas realizaciones, la afección o enfermedad metabólica es obesidad.

Ciertas realizaciones de la divulgación son procedimientos para tratar a un ser humano con una enfermedad metabólica que comprenden identificar al ser humano con la enfermedad y administrar al ser humano una cantidad

5 terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el tratamiento reduce un síntoma seleccionado del grupo que consiste en síndrome metabólico, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hipertensión, aumento de los niveles de glucosa, aumento de la resistencia a la insulina, disminución de la sensibilidad a la insulina, peso corporal por encima de lo normal y/o grasa corporal por encima de lo normal o cualquier combinación de los mismos.

10 Ciertas realizaciones de la divulgación son procedimientos para tratar a un ser humano con obesidad que comprenden identificar al ser humano con la enfermedad y administrar al ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el tratamiento reduce un síntoma seleccionado del grupo que consiste en síndrome metabólico, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hipertensión, aumento de los niveles de glucosa, aumento de la resistencia a la insulina, disminución de la sensibilidad a la insulina, peso corporal por encima de lo normal y/o grasa corporal por encima de lo normal o cualquier combinación de los mismos.

15 Ciertas realizaciones de la divulgación son procedimientos para tratar a un ser humano con diabetes que comprenden identificar al ser humano con la enfermedad y administrar al ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el tratamiento reduce un síntoma seleccionado del grupo que consiste en síndrome metabólico, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hipertensión, aumento de los niveles de glucosa, aumento de la resistencia a la insulina, disminución de la sensibilidad a la insulina, peso corporal por encima de lo normal y/o grasa corporal por encima de lo normal o cualquier combinación de los mismos.

20 Se divulga adicionalmente un procedimiento para reducir o prevenir la enfermedad metabólica que comprende administrar a un ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz humana de un compuesto o composición tal como se describe en el presente documento, reduciendo o previniendo de este modo la enfermedad metabólica.

30 Se divulga adicionalmente un procedimiento para reducir o prevenir la obesidad que comprende administrar a un ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz humana de un compuesto o composición tal como se describe en el presente documento, reduciendo o previniendo de este modo la diabetes.

Se divulga adicionalmente un procedimiento para reducir o prevenir la diabetes que comprende administrar a un ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz humana de un compuesto o composición tal como se describe en el presente documento, reduciendo o previniendo de este modo la diabetes.

35 Se desvela adicionalmente un procedimiento para mejorar un síntoma de enfermedad metabólica, que comprende administrar a un ser humano que lo necesite un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 17 a 35 nucleósidos unidos, en el que dicho oligonucleótido modificado hibrida específicamente con la SEQ ID NO: 1, 2 o 3, mejorando de este modo un síntoma de enfermedad metabólica en el ser humano.

40 También se desvela un procedimiento para mejorar un síntoma de diabetes, que comprende administrar a un ser humano que lo necesite un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 17 a 35 nucleósidos unidos, en el que dicho oligonucleótido modificado hibrida específicamente con la SEQ ID NO: 1, 2 o 3, mejorando de este modo un síntoma de diabetes en el ser humano.

45 Se desvela adicionalmente un procedimiento para mejorar un síntoma de enfermedad metabólica, que comprende administrar a un ser humano que lo necesite un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 17 nucleósidos unidos, en el que dicho oligonucleótido modificado hibrida específicamente con la SEQ ID NO: 1, 2 o 3, mejorando de este modo un síntoma de enfermedad metabólica en el ser humano.

50 Se desvela adicionalmente un procedimiento para mejorar un síntoma de diabetes, que comprende administrar a un ser humano que lo necesite un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 17 nucleósidos unidos, en el que dicho oligonucleótido modificado hibrida específicamente con la SEQ ID NO: 1, 2 o 3, mejorando de este modo un síntoma de diabetes en el ser humano.

55 Se desvela adicionalmente un procedimiento para reducir la velocidad de progresión de un síntoma asociado con enfermedad metabólica, que comprende administrar a un ser humano que lo necesite un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 17 nucleósidos unidos, en el que dicho oligonucleótido modificado hibrida específicamente con la SEQ ID NO: 1, 2 o 3, reduciendo de este modo la velocidad de progresión de un síntoma de enfermedad metabólica en el ser humano.

60 Se desvela adicionalmente un procedimiento para reducir la velocidad de progresión de un síntoma asociado con diabetes, que comprende administrar a un ser humano que lo necesite un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 17 nucleósidos unidos, en el que dicho oligonucleótido modificado hibrida específicamente con la SEQ ID NO: 1, 2 o 3, reduciendo de este modo la velocidad de progresión de un síntoma de diabetes en el ser humano.

65

También se desvelan procedimientos y compuestos para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora de la enfermedad metabólica.

5 También se desvelan procedimientos y compuestos para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora de la obesidad.

También se desvelan procedimientos y compuestos para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora de la diabetes.

10 También se desvelan procedimientos y compuestos para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora del síndrome metabólico.

15 Ciertas realizaciones proporcionan el uso de un compuesto como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar, mejorar o prevenir la enfermedad metabólica.

Ciertas realizaciones proporcionan el uso de un compuesto como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar, mejorar o prevenir la obesidad.

20 Ciertas realizaciones proporcionan el uso de un compuesto como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar, mejorar o prevenir la diabetes.

Ciertas realizaciones proporcionan el uso de un compuesto como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar, mejorar o prevenir el síndrome metabólico.

25 Ciertas realizaciones proporcionan un compuesto como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de la enfermedad metabólica como se describe en el presente documento mediante terapia de combinación con un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento. Los agentes o terapias pueden coadministrarse o administrarse de forma concomitante.

30 Ciertas realizaciones proporcionan un compuesto como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de la diabetes como se describe en el presente documento mediante terapia de combinación con un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento. Los agentes o terapias pueden coadministrarse o administrarse de forma concomitante.

35 Ciertas realizaciones proporcionan el uso de un compuesto como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora de la enfermedad metabólica como se describe en el presente documento mediante terapia de combinación con un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento. Los agentes o terapias pueden coadministrarse o administrarse de forma concomitante.

40 Ciertas realizaciones proporcionan el uso de un compuesto como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora de la obesidad como se describe en el presente documento mediante terapia de combinación con un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento. Los agentes o terapias pueden coadministrarse o administrarse de forma concomitante.

45 Ciertas realizaciones proporcionan el uso de un compuesto como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora de la diabetes como se describe en el presente documento mediante terapia de combinación con un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento. Los agentes o terapias pueden coadministrarse o administrarse de forma concomitante.

50 Ciertas realizaciones proporcionan el uso de un compuesto como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora de la diabetes como se describe en el presente documento mediante terapia de combinación con un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento. Los agentes o terapias pueden coadministrarse o administrarse de forma concomitante.

55 Ciertas realizaciones proporcionan el uso de un compuesto como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora de la enfermedad metabólica como se describe en el presente documento en un paciente al que se administra después un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento.

60 Ciertas realizaciones proporcionan el uso de un compuesto como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora de la obesidad como se describe en el presente documento en un paciente al que se administra después un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento.

65

Ciertas realizaciones proporcionan el uso de un compuesto como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora de la diabetes como se describe en el presente documento en un paciente al que se administra después un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento.

5 Ciertas realizaciones proporcionan el uso de un compuesto como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora del síndrome metabólico como se describe en el presente documento en un paciente al que se administra después un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento.

10 En el presente documento se divulga un kit para tratar, prevenir o mejorar la enfermedad metabólica como se describe en la presente, en donde el kit comprende:

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

En el presente documento se divulga un kit para tratar, prevenir o mejorar la diabetes como se describe en la presente, en donde el kit comprende:

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

25 Un kit como se describe en el presente documento puede incluir además instrucciones para usar el kit para tratar, prevenir o mejorar la enfermedad metabólica como se describe en el presente documento mediante terapia de combinación como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, la enfermedad metabólica es la obesidad. En ciertas realizaciones, la enfermedad metabólica es diabetes.

Compuestos antisentido

30 Los compuestos oligoméricos incluyen, entre otros, oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos, compuestos antisentido, oligonucleótidos antisentido y ARNip. Un compuesto oligomérico puede ser "antisentido" de un ácido nucleico diana, lo que significa que es capaz de sufrir hibridación con un ácido nucleico diana mediante enlaces de hidrógeno.

35 En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de bases nucleotídicas que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complementario inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana al que está dirigido. En ciertas de estas realizaciones, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de bases nucleotídicas que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complementario inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana al que está dirigido.

40 En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de GCGR tiene una longitud de 10 a 30 nucleótidos. En otras palabras, tales compuestos antisentido tienen de 10 a 30 bases nucleotídicas unidas. En otras realizaciones, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado que consiste en de 8 a 80, de 10 a 50, de 15 a 30, de 18 a 21, de 20 a 80, de 20 a 35, de 20 a 30, de 20 a 29, de 20 a 28, de 20 a 27, de 20 a 26, de 20 a 25, de 20 a 24, de 20 a 23, de 20 a 22, de 20 a 21 o 20 base nucleotídicas unidas. En ciertas de tales realizaciones, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 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 nucleotídicas de longitud, o un intervalo definido por cualquiera de los dos valores anteriores.

55 Es posible aumentar o disminuir la longitud de un compuesto antisentido, tal como un oligonucleótido antisentido, y/o introducir bases apareadas erróneamente sin eliminar la actividad. Por ejemplo, en Woolf y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992), se analizó una serie de oligonucleótidos antisentido de 13-25 bases nucleotídicas de longitud su capacidad para inducir la escisión de un ARN diana en un modelo de inyección de oocitos. Los oligonucleótidos antisentido de 25 bases nucleotídicas de longitud con 8 u 11 apareamientos erróneos de bases cerca de los extremos de los oligonucleótidos antisentido fueron capaces de dirigir la escisión específica del ARNm diana, aunque en menor medida que los oligonucleótidos antisentido que no contenían apareamientos erróneos. De un modo similar, se consiguió una escisión específica de la diana usando oligonucleótidos antisentido de 13 bases nucleotídicas, incluidos aquéllos con 1 o 3 apareamientos erróneos.

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

65

5 Maher y Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358,1988) analizaron en una serie de oligonucleótidos antisentido de 14 bases nucleotídicas en tándem y oligonucleótidos antisentido de 28 y 42 bases nucleotídicas compuestos por la secuencia de dos o tres de los oligonucleótidos antisentido en tándem, respectivamente, su capacidad para detener la traducción de DHFR humano en un ensayo de reticulocitos de conejo. Cada uno de los tres oligonucleótidos antisentido de 14 bases nucleotídicas pudo inhibir la traducción, aunque a un nivel más modesto que los oligonucleótidos antisentido de 28 o 42 bases nucleotídicas.

Motivos de compuestos antisentido

10 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del GCGR tienen subunidades químicamente modificadas dispuestas en patrones, o motivos, para conferir a los compuestos antisentido propiedades tales como potenciación de la actividad inhibitoria, afinidad de unión incrementada por un ácido nucleico diana o resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*.

15 Los compuestos antisentido quiméricos normalmente contienen al menos una región modificada de modo que confieren un incremento de la resistencia a la degradación por nucleasas, incremento de la captación celular y/o incremento de la afinidad de unión por el ácido nucleico diana y/o una actividad inhibitoria incrementada. Una segunda región de un compuesto antisentido quimérico puede servir opcionalmente como sustrato para la endonucleasa ARNasa H celular, que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN.

20 Los compuestos antisentido que tienen un motivo gapmero se consideran compuestos antisentido quiméricos. En un gapmero, una región interna que tiene una pluralidad de nucleótidos que soporta la escisión de ARNasaH se coloca entre regiones externas que tienen una pluralidad de nucleótidos que son químicamente distintos de los nucleósidos de la región interna. En el caso de un oligonucleótido antisentido que tiene un motivo gapmero, el segmento separador generalmente sirve como sustrato para la escisión con endonucleasa, mientras que los segmentos de ala comprenden nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, las regiones de un gapmero se diferencian por los tipos de restos de azúcar que comprenden cada región distinta. Los tipos de restos de azúcar que se usan para diferenciar las regiones de un gapmero pueden, en algunas realizaciones, incluir β -D-ribonucleósidos, β -D-desoxirribonucleósidos, nucleósidos modificados en 2' (tales nucleósidos modificados en 2' pueden incluir 2'-MOE y 2'-O-CH₃, entre otros), y los nucleósidos modificados con azúcar bicíclico (tales nucleósidos modificados con azúcar bicíclico pueden incluir los que tienen un etilo restringido). En ciertas realizaciones, las alas pueden incluir varios restos de azúcar modificados, incluyendo, por ejemplo, 2'-MOE y etilo restringido. En ciertas realizaciones, las alas pueden incluir varios restos de azúcar modificados y no modificados. En ciertas realizaciones, las alas pueden incluir diversas combinaciones de nucleósidos 2'-MOE, nucleósidos de etilo restringidos y 2'-desoxinucleósidos.

35 Cada región distinta puede comprender restos azúcar uniformes, variantes o restos de azúcar alternos. El motivo de ala-separador-ala se describe con frecuencia como "X-Y-Z", en el que "X" representa la longitud de la región del ala en 5', "Y" representa la longitud de la región separadora y "Z" representa la longitud de la región del ala en 3'. "X" y "Z" pueden comprender restos de azúcar uniformes, variantes o alternos. En ciertas realizaciones, "X" e "Y" pueden incluir uno o más 2'-desoxinucleósidos. "Y" puede comprender 2'-desoxinucleósidos. Como se usa en el presente documento, un gapmero descrito como "X-Y-Z" tiene una configuración tal que el hueco se coloca inmediatamente adyacente a cada uno del ala en 5' y el ala en 3'. Por lo tanto, no existen nucleótidos intermedios entre el ala en 5' y el hueco, o el hueco y el ala en 3'. Cualquiera de los compuestos antisentido descritos en el presente documento puede tener un motivo de gapmero. En ciertas realizaciones, "X" y "Z" son iguales, en otras realizaciones son diferentes. En ciertas realizaciones, "Y" está entre 8 y 15 nucleótidos. X, Y o Z pueden ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o más nucleósidos.

Ácidos nucleicos diana, regiones diana y secuencias de nucleótidos

50 En ciertas realizaciones, el ácido nucleico del GCGR es cualquiera de las secuencias indicadas en el número de acceso en GENBANK NM_000160.3 (incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 1), número de acceso en GENBANK NW_926918.1 truncado de los nucleótidos 16865000 a 16885000, (incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 2); y la secuencia del mono rhesus como se expone en la SEQ ID NO: 3.

55 Se entiende que la secuencia indicada en cada SEQ ID NO en los Ejemplos contenidos en el presente documento es independiente de cualquier modificación de un resto azúcar, un enlace internucleosídico o una base nucleotídica. Como tales, los compuestos antisentido definidos por una SEQ ID NO pueden comprender, de forma independiente, una o más modificaciones en un resto azúcar, un enlace internucleosídico o una base nucleotídica. Los compuestos antisentido descritos por el número Isis (n.º Isis) indican una combinación de secuencia de bases nucleotídicas y motivo.

60 En ciertas realizaciones, una región diana es una región estructuralmente definida del ácido nucleico diana. Por ejemplo, una región diana puede abarcar una 3' UTR, una 5' UTR, un exón, un intrón, una unión exón/intrón, una región codificadora, una región de inicio de la traducción, una región de terminación de la traducción u otra región de ácido nucleico definida. Las regiones estructuralmente definidas para el GCGR pueden obtenerse por número de acceso de bases de datos de secuencias, tales como NCBI. En ciertas realizaciones, una región diana puede

abarcando la secuencia desde un sitio diana en 5' de un segmento diana dentro de la región diana hasta un sitio diana en 3' de otro segmento diana dentro de la misma región diana.

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

10 Una región diana puede contener uno o más segmentos diana. Múltiples segmentos diana dentro de una región diana pueden estar superpuestos. Como alternativa, pueden no superponerse. En ciertas realizaciones, los segmentos diana dentro de una región diana están separados en no más de aproximadamente 300 nucleótidos. En ciertas realizaciones, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por un número de nucleótidos que es, es aproximadamente, no es más que, no es más que aproximadamente, 250, 200, 150, 100, 90,
15 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 o 10 nucleótidos en el ácido nucleico diana, o es un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores precedentes. En ciertas realizaciones, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por no más de, o no más de aproximadamente, 5 nucleótidos en el ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, los segmentos diana son contiguos. Se contemplan las regiones diana definidas por un intervalo que tiene un ácido nucleico de partida que es cualquiera de los sitios diana en 5' o los sitios diana en 3' enumerados en el
20 presente documento.

Se pueden encontrar segmentos diana adecuados dentro de una UTR 5', una región de codificación, una 3' UTR, un intrón, un exón o una unión exón/intrón. Los segmentos diana que contienen un codón de iniciación o un codón de terminación también son segmentos diana adecuados. Un segmento diana adecuado puede excluir específicamente una cierta región definida estructuralmente, tal como el codón de iniciación o el codón de terminación.
25

La determinación de segmentos diana adecuados puede incluir una comparación de la secuencia de un ácido nucleico diana con otras secuencias en todo el genoma. Por ejemplo, el algoritmo BLAST puede usarse para identificar regiones de similitud entre diferentes ácidos nucleicos. Esta comparación puede evitar la selección de secuencias de compuestos antisentido que pueden hibridar de una manera no específica con secuencias distintas de un ácido nucleico diana seleccionado (es decir, secuencias no diana o fuera de la diana).
30

Puede haber variación en la actividad (por ejemplo, como se define por el porcentaje de reducción de los niveles de ácido nucleico diana) de los compuestos antisentido dentro de una región diana activa. En ciertas realizaciones, las reducciones en los niveles de ARNm del GCGR son indicativas de la inhibición de la expresión del GCGR. Las reducciones en los niveles de una proteína del GCGR también son indicativas de la inhibición de la expresión del ARNm diana. Además, los cambios fenotípicos son indicativos de la inhibición de la expresión del GCGR. En ciertas realizaciones, niveles de glucosa reducidos, niveles de lípidos reducidos y peso corporal reducido pueden ser indicativos de la inhibición de la expresión de GCGR. En ciertas realizaciones, la mejora de los síntomas asociados con la enfermedad metabólica puede ser indicativa de la inhibición de la expresión de GCGR. En ciertas realizaciones, la mejora de los síntomas asociados con la diabetes puede ser indicativa de la inhibición de la expresión de GCGR. En ciertas realizaciones, la reducción de la resistencia a la insulina es indicativa de la inhibición de la expresión de GCGR. En ciertas realizaciones, la reducción de biomarcadores de diabetes es indicativa de la inhibición de la expresión de GCGR.
35
40
45

Hibridación

En algunas realizaciones, la hibridación se produce entre un compuesto antisentido descrito en el presente documento y un ácido nucleico del GCGR. El mecanismo más común de hibridación implica enlaces de hidrógeno (por ejemplo, enlaces de Watson-Crick, Hoogsteen o enlaces de hidrógeno invertidos de Hoogsteen) entre bases nucleotídicas complementarias de las moléculas de ácido nucleico.
50

La hibridación se puede producir en diferentes condiciones. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y están determinadas por la naturaleza y la composición de las moléculas de ácido nucleico a hibridar.
55

Los procedimientos para determinar si una secuencia es específicamente hibridable con un ácido nucleico diana son bien conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento son específicamente hibridables con un ácido nucleico del GCGR.
60

Complementariedad

Un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana son complementarios entre sí cuando un número suficiente de bases nucleotídicas del compuesto antisentido puede unirse por hidrógeno con las bases nucleotídicas correspondientes del ácido nucleico diana, de modo que se producirá un efecto deseado (por ejemplo, inhibición antisentido de un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico del GCGR).
65

Un compuesto antisentido puede hibridarse sobre uno o más segmentos de un ácido nucleico del GCGR de manera que los segmentos intermedios o adyacentes no están implicados en el acontecimiento de hibridación (por ejemplo, una estructura de bucle, apareamiento erróneo o estructura en horquilla).

5 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido descritos en el presente documento, o una porción específica de los mismos, son, o son al menos, 70 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % complementarios de un ácido nucleico del GCGR, una región diana, segmento diana, o una porción especificada de los mismos. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con un ácido nucleico diana puede determinarse usando procedimientos rutinarios.

10 El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana se puede determinar rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineación local básica) y 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, identidad de secuencia o complementariedad, puede determinarse mediante, por ejemplo, el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), utilizando la configuración predeterminada, que utiliza la algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482 489).

15 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido descritos en el presente documento, o partes específicas de los mismos, son completamente complementarios (es decir, 100 % complementarios) de un ácido nucleico diana, o una parte específica de los mismos.

20 La ubicación de una base nucleotídica no complementaria puede estar en el extremo 5' o en el extremo 3' del compuesto antisentido. Como alternativa, la base nucleotídica o bases nucleotídicas no complementarias puede estar en una posición interna del compuesto antisentido. Cuando dos o más bases nucleotídicas no complementarias están presentes, pueden ser contiguas (es decir, unidas) o no contiguas.

25 Los compuestos antisentido desvelados en el presente documento también incluyen aquellos que son complementarios a una porción de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 8 bases nucleotídicas de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 12 bases nucleotídicas de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 13 bases nucleotídicas de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 14 bases nucleotídicas de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 15 bases nucleotídicas de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 16 bases nucleotídicas de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 17 bases nucleotídicas de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 18 bases nucleotídicas de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 19 bases nucleotídicas de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 20 bases nucleotídicas de un segmento diana. También se contemplan compuestos antisentido que son complementarios a al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más porciones de base nucleotídica de un segmento diana, o un intervalo definido por cualquiera de estos dos valores.

Identidad

30 Los compuestos antisentido desvelados en el presente documento también pueden tener un porcentaje de identidad definido para una secuencia de nucleótidos en particular, SEQ ID NO, o compuesto representado por un número Isis específico, o una porción del mismo. Como se usa en el presente documento, un compuesto antisentido es idéntico a la secuencia desvelada en el presente documento si tiene la misma capacidad de apareamiento de bases nucleotídicas. Por ejemplo, un ARN que contiene uracilo en lugar de timidina en una secuencia de ADN desvelada se consideraría idéntico a la secuencia de ADN, ya que tanto el uracilo como la timidina se aparean con adenina. Se contemplan versiones acortadas y alargadas de los compuestos antisentido descritos en el presente documento, así como también compuestos que tienen bases no idénticas en relación con los compuestos antisentido desvelados en el presente documento. Las bases no idénticas pueden estar adyacentes o dispersas por el oligonucleótido por todo el compuesto antisentido. El porcentaje de identidad de un compuesto antisentido se calcula de acuerdo con el número de bases que tienen idéntico apareamiento de bases con respecto a la secuencia con la que se está comparando.

35 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido, o porciones de los mismos, son al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticos de uno o más de los compuestos antisentido o las SEQ ID NOs, o una porción de los mismos, desvelados en el presente documento.

65 *Modificaciones*

Las modificaciones de los compuestos antisentido abarcan sustituciones o cambios en los enlaces internucleosídicos, restos de azúcar o bases nucleotídicas. Los compuestos antisentido modificados a menudo se prefieren sobre las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular
 5 potenciada, afinidad potenciada por el diana de ácido nucleico, estabilidad aumentada en presencia de nucleasas o actividad inhibidora incrementada.

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

Enlaces internucleosídicos modificados

15 enlace internucleosídico de origen natural de ARN y ADN es un enlace fosfodiéster 3' a 5'. Los compuestos antisentido que tienen uno o más enlaces internucleosídicos modificados, es decir, no naturales se seleccionan a menudo sobre compuestos antisentido que tienen enlaces internucleosídicos naturales debido a las propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por ácidos nucleicos diana y aumento de la afinidad estabilidad en presencia de nucleasas.

20 Los oligonucleótidos que tienen enlaces internucleosídicos modificados incluyen enlaces internucleosídicos que retienen un átomo de fósforo así como enlaces internucleosídicos que no tienen un átomo de fósforo. Enlaces internucleosídicos representativos que contienen fósforo incluyen, entre otros, fosforodiesteres, fosforotriésteres, metilfosfonatos, fosforoamidato y fosforotioatos. Los procedimientos de preparación de enlaces que contienen
 25 fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del GCGR comprenden uno o más enlaces internucleosídicos modificados. En ciertas realizaciones, los enlaces internucleosídicos modificados son
 30 enlaces fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico de un compuesto antisentido es un enlace internucleosídico fosforotioato.

Restos de azúcar modificados

35 Los compuestos antisentido desvelados en el presente documento pueden contener, opcionalmente, uno o más nucleósidos en los que el grupo azúcar ha sido modificado. Dichos nucleósidos modificados con azúcar pueden impartir estabilidad de nucleasa potenciada, afinidad de unión aumentada o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, los nucleósidos comprenden restos de anillo de ribofuranosa modificados químicamente. Los ejemplos de anillos de ribofuranosa modificados químicamente
 40 incluyen sin limitación, la adición de grupos sustituyentes (incluyendo grupos sustituyentes 5' y 2', puente de átomos del anillo no geminales para formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA), reemplazo del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S, N (R) o C (R1) (R) 2 (R = H, alquilo C₁-C₁₂ o un grupo protector) y combinaciones de los mismos. Ejemplos de azúcares químicamente modificados incluyen nucleósido 2'-F-5'-metilo sustituido (véase la solicitud internacional de PCT WO 2008/101157, publicada el 21/08/08 para otros nucleósidos 5',2'-bis sustituidos desvelados), sustitución del átomo de oxígeno del anillo de ribosilo por S con sustitución adicional en la posición 2'
 45 (véase la solicitud de patente de Estados Unidos publicada US2005-0130923, publicada el 16 de junio de 2005) o, como alternativa, sustitución en 5' de un BNA (véase la solicitud de patente internacional PCT WO 2007/134181, publicada el 22/11/07, en la que el LNA está sustituido con, por ejemplo, un grupo 5'-metilo o un grupo 5'-vinilo).

50 Los ejemplos de nucleósidos que tienen restos de azúcar modificados incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden grupos sustituyentes 5'-vinilo, 5'-metilo (R o S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃ y 2'-O(CH₂)₂OCH₃ grupos sustituyentes. El sustituyente en la posición 2' también se puede seleccionar de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C₁-C₁₀, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), y O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), en las que cada R_m y R_n es, de forma independiente, H o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido.

55 Como se usa en el presente documento, "nucleósidos bicíclicos" se refiere a nucleósidos modificados que comprenden un resto de azúcar bicíclico. Los ejemplos de nucleósidos bicíclicos incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo ribosilo 4' y 2'. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido desvelados en el presente documento incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos en los que el puente comprende un nucleósido bicíclico de 4' a 2'. Los ejemplos de dichos nucleósidos bicíclicos de 4' a 2' incluyen, pero
 60 no están limitados a, una de las fórmulas: 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' y 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2', y análogos del mismo (véase la patente de Estados Unidos 7.399,845, presentada el 15 de julio de 2008); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2', y análogos del mismo (véase la solicitud internacional de PCT publicada WO2009/006478, publicada el 8 de enero de 2009); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2', y análogos del mismo (véase la solicitud internacional de PCT publicada WO2008/150729, publicada el 11 de diciembre de 2008); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (véase la patente de Estados Unidos publicada US2004/0171570, publicada el 2 de septiembre de 2004); 4'-CH₂-N(R)-O-2', en la que R es H, alquilo C₁-C₁₂ o un grupo protector (véase la patente de Estados Unidos 7.427,672,

presentada el 23 de septiembre de 2008); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (véase, Chattopadhyaya, y col., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); y 4'-CH₂-C(=CH₂)-2', y análogos del mismo (véase la solicitud internacional de PCT publicada WO 2008/154401, publicada el 8 de diciembre de 2008). Véase también, por ejemplo: Singh y col., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin y col., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; documento WO 94/14226; documento WO 2005/021570; Singh y col., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava y col., J. Am. Chem. Soc., 129(26) 8362-8379 (Jul. 4, 2007); Elayadi y col., Curr. Opin. Inven. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch y col., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; Orum y col., Curr. Opin. Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; las patentes de Estados Unidos U.S. 6.670.461, 7.053.207, 6.268.490, 6.770.748, 6.794.499, 7.034.133, 6.525.191, 7.399.845; las solicitudes internacionales de PCT publicadas WO 2004/106356, WO 94/14226, WO 2005/021570, y WO 2007/134181; la publicación de patente de Estados Unidos n.º US2004/0171570, US2007/0287831 y US2008/0039618; y las patentes de Estados Unidos con n.º de serie 12/129.154, 60/989.574, 61/026.995, 61/026.998, 61/056.564, 61/086.231, 61/097.787 y 61/099.844; y las solicitudes internacionales de PCT N.º PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154 y PCT/US2008/068922. Cada uno de los nucleósidos bicíclicos anteriores puede prepararse de modo que tengan una o más configuraciones estereoquímicas del azúcar, incluyendo, por ejemplo, α-L-ribofuranosa y β-D-ribofuranosa (véase la solicitud internacional PCT PCT/DK98/00393, publicada el 25 de marzo de 1999 como el documento WO 99/14226).

En ciertas realizaciones, los restos de azúcares bicíclicos de nucleósidos de BNA incluyen, pero no se limitan a, compuestos que tienen al menos un puente entre la posición 4' y la posición 2' del resto de azúcar de pentofuranosilo en el que tales puentes comprenden independientemente 1 o de 2 a 4 grupos unidos seleccionados independientemente de

$-\text{C}(\text{R}_a)(\text{R}_b)]_n-$, $-\text{C}(\text{R}_a)=\text{C}(\text{R}_b)-$, $-\text{C}(\text{R}_a)=\text{N}-$, $-\text{C}(=\text{NR}_a)-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{S})-$, $-\text{O}-$, $-\text{Si}(\text{R}_a)_2-$, $-\text{S}(=\text{O})_x-$, and $-\text{N}(\text{R}_a)-$;

en la que:

x es 0, 1 o 2;;

n es 3, 1, 2 o 4;

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

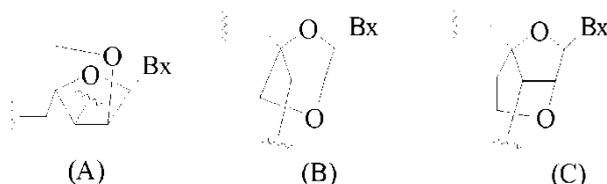
35 y cada J₁ y J₂ es, de forma independiente, H, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, arilo C₅-C₂₀, arilo C₅-C₂₀ sustituido, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido,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

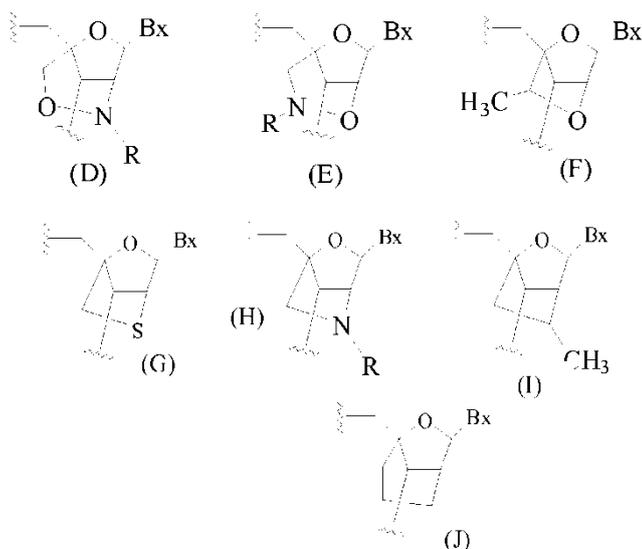
40 En ciertas realizaciones, el puente de un resto de azúcar bicíclico es $-\text{C}(\text{R}_a)(\text{R}_b)]_n-$, $-\text{C}(\text{R}_a)(\text{R}_b)]_n-\text{O}-$, $-\text{C}(\text{R}_a\text{R}_b)-\text{N}(\text{R})-\text{O}-$ o $-\text{C}(\text{R}_a\text{R}_b)-\text{O}-\text{N}(\text{R})-$. En ciertas realizaciones, el puente es 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-O-N(R)-2' y 4'-CH₂-N(R)-O-2', en el que cada R es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C₁-C₁₂.

45 En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos se definen adicionalmente por la configuración isomérica. Por ejemplo, un nucleósido que comprende un puente 4'-2' 'metileno-oxi', puede estar en la configuración α-L o en la configuración β-D. Anteriormente, los alfa-L-metilenoxi(4'-CH₂-O-2') BNA se incorporaron en oligonucleótidos antisentido, que mostraron una actividad antisentido (Frieden y col., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372).

50 En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos incluyen, pero no se limitan a, (A) α-L-Metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, (B) β-D-Metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, (C) Etilenoxi (4' - (CH₂)₂-O-2') BNA, (D) Aminooxi (4'-CH₂-O-N (R) -2') BNA, (E) Oxiamino (4'-CH₂-N (R) -O-2') BNA, (F) Metilo (metilenoxi) (4'-CH (CH₃) -O-2') BNA, (G) metilen-tio (4'-CH₂-S-2') BNA, (H) metilen-amino (4'-CH₂-N (R) -2') BNA, (I) metilcarbocíclico (4'-CH₂-CH (CH₃) -2') BNA, y (J) propileno carbocíclico (4' - (CH₂)₃-2') BNA como se representa a continuación.

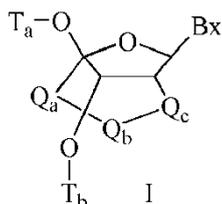
55





5 en el que Bx es el resto de base y R es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C₁-C₁₂.

En ciertas realizaciones, el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula I:



10 en la que:

Bx es un resto base heterocíclica;

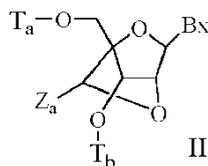
-Q_a-Q_b-Q_c- es -CH₂-N(R_c)-CH₂-, -C(=O)-N(R_c)-CH₂-, -CH₂-O-N(R_c)-, -CH₂-N(R_c)-O- o -N(R_c)-O-CH₂;

15 R_c es alquilo C₁-C₁₂ o un grupo protector de amino; y

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

En ciertas realizaciones, el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula II:

20



en la que:

25 Bx es un resto base heterocíclica;

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

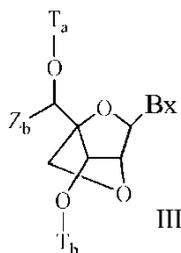
Z_a es alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆ sustituido, acilo, acilo sustituido o amida sustituida, tior o tior sustituido.

30

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

35

En ciertas realizaciones, el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III:

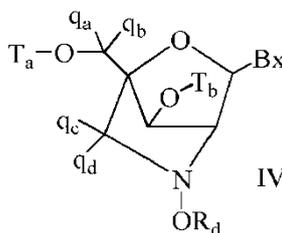


en la que:

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

10

En ciertas realizaciones, el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV:

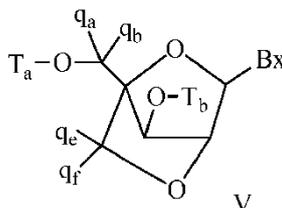


15 en la que:

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

25

En ciertas realizaciones, el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V:



en la que:

30

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

40

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

También se han preparado análogos de metileno(4'-CH₂-O-2') BNA, metileno(4'-CH₂-O-2') BNA y 2'-tio-BNA (véase Kumar y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222). También se ha descrito la preparación de análogos nucleosídicos bloqueados que comprenden dúplex de oligodesoxirribonucleótidos como sustratos para las

5

6

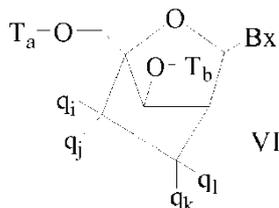
7

8

9

10

En ciertas realizaciones, el nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula VI:



en la que:

15

Bx es un resto base heterocíclica;

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

20

cada q_i, q_j, q_k y q_l es, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido C₁-C₁₂, OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO₂J_j, NJ_jJ_k, N₃, CN, C(=O)OJ_j, C(=O)NJ_jJ_k, C(=O)J_j, O-C(=O)NJ_jJ_k, N(H)C(=NH)NJ_jJ_k, N(H)C(=O)NJ_jJ_k o N(H)C(=S)NJ_jJ_k; y

25

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

26

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

30

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

35

Como se usa en el presente documento, "nucleósidos monocíclicos" se refiere a nucleósidos que comprenden restos de azúcar modificados que no son restos de azúcar bicíclicos. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar, o análogo de resto de azúcar, de un nucleósido se puede modificar o sustituir en cualquier posición.

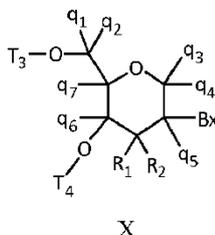
40

Como se usa en el presente documento, "azúcar modificado en 2'" significa un azúcar de furanosilo modificado en la posición 2'. En ciertas realizaciones, tales modificaciones incluyen sustituyentes seleccionados entre: un haluro, que incluye, pero no se limita a, alcoxi sustituido y no sustituido, tioalquilo sustituido y no sustituido, aminoalquilo sustituido y no sustituido, alquilo sustituido y no sustituido, alilo sustituido y no sustituido y alquino sustituido y no sustituido. En ciertas realizaciones, las modificaciones en 2' se seleccionan de sustituyentes que incluyen, pero no se limitan a: O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, OCH₂C(=O)N(H)CH₃ y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, en las que n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros grupos sustituyentes en 2' también se pueden seleccionar entre: alquilo C₁-C₁₂; alquilo sustituido; alqueno; alquino; alcarilo; aralquilo; O-alcarilo u O-aralquilo; SH; SCH₃; OCN; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo reportero; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas; y un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un compuesto antisentido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. En ciertas realizaciones, los nucleósidos modificados comprenden una cadena lateral 2'-MOE (véase, por ejemplo, Baker y col., J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000). Tal sustitución 2'-MOE se ha descrito como que tiene una afinidad de unión mejorada en comparación con los nucleósidos no modificados y con otros nucleósidos modificados, tales como 2'-O-metilo, O-propilo, y O-aminopropilo. También se ha demostrado que los oligonucleótidos que tienen el sustituyente 2'-MOE son inhibidores antisentido de la expresión génica con características prometedoras para su uso *in vivo* (véase, por ejemplo, Martin, P., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann y col., Chimia, 1996, 50, 168-176; Altmann y col., Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637; y Altmann y col., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926).

55

- Como se usa en el presente documento, un "nucleósido de tetrahidropirano modificado" o "nucleósido de THP modificado" significa un nucleósido que tiene un "azúcar" de tetrahidropirano de seis miembros sustituido en el residuo de pentofuranosilo en nucleósidos normales (un sustituto de azúcar). Los nucleósidos de THP modificado incluyen, pero no se limitan a, lo que se denomina en la técnica ácido nucleico de hexitol (HNA), ácido nucleico de anitol (ANA), ácido nucleico de manitol (MNA) (véase Leumann, C.J. Bioorg. & Med. Chem. (2002) 10:841–854), fluoro HNA (F–HNA), o aquellos compuestos que tienen Fórmula X:

Fórmula X:



- 10 en la que independientemente para cada uno de dichos al menos un análogo de nucleósido de tetrahidropirano de Fórmula X:

Bx es un resto base heterocíclica;

- 15 T₃ y T₄ son cada uno, independientemente, un grupo de unión internucleosídico que une el análogo de nucleósido de tetrahidropirano al compuesto antisentido o uno de T₃ y T₄ es un grupo de unión internucleosídico que une el análogo de nucleósido de tetrahidropirano con el compuesto antisentido y el otro de T₃ y T₄ es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido, o un grupo terminal 5' o 3';

- q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ son cada uno independientemente, H, alquilo C₁–C₆, alquilo C₁–C₆ sustituido, alqueno C₂–C₆, alqueno C₂–C₆ sustituido, alquino C₂–C₆, o alquino C₂–C₆ sustituido; y

- 20 uno de R₁ y R₂ es hidrógeno y el otro se selecciona de halógeno, alcoxil sustituido o no sustituido, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂, y CN, en el que X es O, S, o NJ₁, y cada uno J₁, J₂, y J₃ es, independientemente, H o alquilo C₁–C₆.

- 25 En ciertas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos de THP modificados de Fórmula X en la que q_m, q_n, q_p, q_r, q_s, q_t, y q_u son cada uno H. En ciertas realizaciones, al menos uno de q_m, q_n, q_p, q_r, q_s, q_t, y q_u es diferente de H. En ciertas realizaciones, al menos uno de q_m, q_n, q_p, q_r, q_s, q_t y q_u es metilo. En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos de THP de Fórmula X en la que R₁ y R₂ es F. En ciertas realizaciones, R₁ es flúor y R₂ es H, R₁ es metoxi y R₂ es H y R₁ es metoxietoxi y R₂ es H.

- 30 Como se usa en el presente documento, "2'-modificado" o "2'-sustituido" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un sustituyente en la posición 2' distinta de H u OH. Los nucleósidos modificados en 2' incluyen, pero sin limitaciones, nucleósidos bicíclicos en los que el puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de azúcar conecta el carbono 2' y otro carbono del anillo de azúcar y los nucleósidos con sustituyentes 2' que no forman puentes, tales como alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C₁–C₁₀, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃,
35 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), o O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), en las que cada R_m y R_n es, de forma independiente, H o alquilo C₁–C₁₀ sustituido o no sustituido. Los nucleósidos modificados en 2' pueden comprender además otras modificaciones, por ejemplo, en otras posiciones del azúcar y/o en la base nucleotídica.

- 40 También se conocen en la técnica muchos otros sistemas de anillo sustituto de azúcar biciclo y triciclo que pueden usarse para modificar nucleósidos para la incorporación en compuestos antisentido (véase, por ejemplo, el artículo de revisión: Leumann, J. C, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, 10, 841–854).

Dichos sistemas de anillos pueden sufrir varias sustituciones adicionales para mejorar la actividad.

- 45 Los procedimientos para las preparaciones de los azúcares modificados son bien conocidos para los expertos en la técnica.

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

- 50 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido comprenden uno o más nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar modificado es 2'-MOE. En ciertas realizaciones, los nucleótidos modificados con 2'-MOE están dispuestos en un motivo gámero.

- 55 *Bases nucleotídicas modificadas*

Las modificaciones o sustituciones de bases nucleotídicas (o bases) son estructuralmente distinguibles, aunque funcionalmente intercambiables, de las bases nucleotídicas naturales o sintéticas no modificadas. Las bases nucleotídicas naturales y modificadas son capaces de participar en enlaces de hidrógeno. Tales modificaciones de bases nucleotídicas pueden impartir estabilidad de nucleasa, afinidad de unión aumentada o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos antisentido. Las bases nucleotídicas modificadas incluyen bases nucleotídicas sintéticas y naturales tales como, por ejemplo, 5-metilcitosina (5-me-C). Ciertas sustituciones de bases nucleotídicas, que incluyen sustituciones de 5-metilcitosina, son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de un compuesto antisentido por un ácido nucleico diana. Por ejemplo, se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad dúplex del ácido nucleico en 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. y Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, **1993**, pág. 276–278).

Las bases nucleotídicas no modificadas adicionales incluyen 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2 -tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinilo (-C≡C-CH₃) uracilo y citosina y otros derivados alquínílicos de bases de pirimidina, 6-azo-uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8- hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros 5-sustituidos uracilos y citosinas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-aminoadenina, 8- azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

Los restos de bases heterocíclicas también pueden incluir aquellos en los que la base de purina o pirimidina se reemplaza con otros heterociclos, por ejemplo 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Las bases nucleotídicas que son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos antisentido incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, que incluyen 2 aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico del GCGR comprenden una o más bases nucleotídicas modificadas. En ciertas realizaciones, la base nucleotídica modificada es una 5-metilcitosina. En ciertas realizaciones, cada citosina es una 5-metilcitosina.

Composiciones y procedimientos para formular composiciones farmacéuticas

Los oligonucleótidos antisentido pueden mezclarse con sustancias activas o inertes farmacéuticamente aceptables para la preparación de composiciones farmacéuticas o formulaciones. Las composiciones y procedimientos para la formulación de composiciones farmacéuticas dependen de una serie de criterios, que incluyen, pero no se limitan a, la vía de administración, la extensión de la enfermedad o la dosis a administrar.

Un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico del GCGR se puede utilizar en composiciones farmacéuticas combinando el compuesto antisentido con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye solución salina tamponada con fosfato (PBS). PBS es un diluyente adecuado para usar en composiciones que se administran por vía parenteral. Por consiguiente, en una realización, se emplea en los procedimientos descritos en el presente documento una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico del GCGR y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, el diluyente farmacéuticamente aceptable es PBS. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos antisentido abarcan cualquier sal, éster o sales de dichos ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro oligonucleótido que, tras la administración a un animal, incluido un ser humano, puede proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o un residuo del mismo. De acuerdo con esto, por ejemplo, la divulgación también se extiende a sales farmacéuticamente aceptables de compuestos antisentido, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos, y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero sin limitación, sales de sodio y potasio.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en el presente documentos e pueden preparar por procedimientos bien conocidos en la técnica. Para una revisión de las sales farmacéuticamente aceptables, véase Stahl y Wermuth, *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use* (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002). Las sales de sodio de los oligonucleótidos antisentido son útiles y bien aceptadas para administración terapéutica a seres humanos. Por consiguiente, en una realización, los compuestos descritos en el presente documento están en forma de una sal de sodio.

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

Compuestos antisentido conjugados

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

Los compuestos antisentido también pueden modificarse para que tengan uno o más grupos estabilizadores que están generalmente unidos a uno o a ambos extremos de compuestos antisentido para potenciar propiedades tales como, por ejemplo, estabilidad de nucleasas. Incluidas en los grupos estabilizadores se encuentran las estructuras de caperuza. Estas modificaciones terminales protegen el compuesto antisentido que tiene ácido nucleico terminal de la degradación por exonucleasa, y pueden ayudar a la administración y/o localización dentro de una célula. La caperuza puede estar presente en el extremo 5'(5'-caperuza), o en el extremo 3' (3'-caperuza), o puede estar presente en ambos extremos. Las estructuras de caperuza son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, caperuzas desoxiabásicas invertidas. Adicionalmente, los grupos estabilizadores 3'y 5' que pueden usarse para cubrir uno o ambos extremos de un compuesto antisentido para impartir estabilidad a la nucleasa incluyen los desvelados en el documento WO 03/004602 publicado el 16 de enero de 2003.

20 *Cultivo celular y tratamiento con compuestos antisentido*

Los efectos de los compuestos antisentido sobre el nivel, la actividad o la expresión de los ácidos nucleicos del GCGR pueden probarse *in vitro* en diversos tipos de células. Los tipos de células utilizadas para tales análisis están disponibles en proveedores comerciales (por ejemplo, la Colección americana de cultivos tipo, Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, Carolina del Norte; Clonetics Corporation, Walkersville, MD) y las células se cultivan de acuerdo con las instrucciones del proveedor utilizando reactivos disponibles en el mercado (por ejemplo, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Los tipos de células ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, células HepG2 y hepatocitos primarios.

30 *Prueba in vitro de oligonucleótidos antisentido*

En el presente documento se divulgan procedimientos para el tratamiento de células con oligonucleótidos antisentido, que se pueden modificar de forma apropiada para el tratamiento con otros compuestos antisentido

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

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

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

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

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

Las células se tratan con oligonucleótidos antisentido por procedimientos de rutina. Las células se recogen típicamente 16-24 horas después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido, momento en el que se miden los niveles de ARN o proteína de los ácidos nucleicos diana mediante procedimientos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento. En general, cuando los tratamientos se realizan en múltiples repeticiones, los datos se presentan como el promedio de los tratamientos duplicados.

La concentración del oligonucleótido antisentido usado varía de una línea celular a otra línea celular. Los procedimientos para determinar la concentración óptima de oligonucleótidos antisentido para una línea celular particular son bien conocidos en la técnica. Los oligonucleótidos antisentido se usan típicamente a concentraciones que varían de 1 nM a 300 nM cuando se transfectan con LIPOFECTAMINE2000®, Lipofectin o Cytfectin. Los

oligonucleótidos antisentido se usan a concentraciones más altas que varían de 625 a 20,000 nM cuando se transfectan usando electroporación.

Aislamiento de ARN

5 El análisis del ARN se puede realizar sobre ARN celular total o poli(A) + ARNm. Los procedimientos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. El ARN se prepara usando procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, usando el reactivo TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con los protocolos recomendados por el fabricante.

10 *Análisis de la inhibición de niveles o expresión diana*

La inhibición de los niveles o la expresión de un ácido nucleico del GCGR se pueden analizar de varias maneras conocidas en la técnica. Por ejemplo, los niveles de ácido nucleico diana se pueden cuantificar mediante, por ejemplo, análisis de transferencia de tipo Northern, reacción en cadena de la polimerasa competitiva (PCR) o PCR cuantitativa en tiempo real. El análisis del ARN se puede realizar sobre ARN celular total o poli(A) + ARNm. Los procedimientos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. El análisis de transferencia de tipo Northern también es una rutina en la técnica. La PCR cuantitativa en tiempo real se puede llevar a cabo convenientemente usando el sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7600, 7700 o 7900 disponible comercialmente, disponible en PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y utilizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

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

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

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

35 Las cantidades diana de genes (o ARN) obtenidas por PCR en tiempo real se normalizan usando el nivel de expresión de un gen cuya expresión es constante, tal como ciclofilina A, o cuantificando EL ARN total utilizando RIBOGREEN® (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA). La expresión de de ciclofilina A SE cuantifica mediante PCR en tiempo real realizada simultáneamente con la diana, multiplexando o por separado. El ARN total se cuantifica usando reactivo de cuantificación de ARN RRIBOGREEN® (Invitrogen, Inc. Eugene, OR) Los procedimientos de cuantificación de ARN por RIBOGREEN® se enseñan en Jones, L.J., y col., (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368–374). Se usa un instrumento CYTOFLUOR® 4000 (PE Applied Biosystems) para medir la fluorescencia de RIBOGREEN®.

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

Análisis de los niveles de proteína

50 La inhibición antisentido de ácidos nucleicos del GCGR puede evaluarse midiendo los niveles de proteína del GCGR. Los niveles de proteína del GCGR pueden evaluarse o cuantificarse de diversas formas bien conocidas en la técnica, tales como inmunoprecipitación, análisis de transferencia de tipo Western (inmunotransferencia), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayos cuantitativos de proteínas, ensayos de actividad de proteínas (para ejemplo, ensayos de actividad de caspasa), inmunohistoquímica, inmunocitoquímica o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Los anticuerpos dirigidos a un diana pueden identificarse y obtenerse a partir de diversas fuentes, tales como el catálogo de anticuerpos MSRS (Aerie Corporation, Birmingham, MI) o pueden prepararse por procedimientos convencionales de generación de anticuerpos monoclonales o policlonales bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos útiles para la detección de GCGR de ser humano y de rata están disponibles comercialmente.

Pruebas in vivo de compuestos antisentido

65 Los compuestos antisentido, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, se prueban en animales para evaluar su capacidad para inhibir la expresión del GCGR y producir cambios fenotípicos. Las pruebas se pueden realizar en animales normales o en modelos experimentales de enfermedades. Para la administración a animales, los

oligonucleótidos antisentido se formulan en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato. La administración incluye vías de administración parenteral. Después de un período de tratamiento con oligonucleótidos antisentido, se aísla el ARN del tejido y se miden los cambios en la expresión del ácido nucleico del GCGR. También se miden los cambios en los niveles de la proteína GCGR.

5

Ciertas indicaciones

En ciertas realizaciones, en el presente documento se divulgan procedimientos de tratar a un individuo, que comprende administrar una o más composiciones farmacéuticas como se describe en la presente invención. En ciertas realizaciones, el individuo tiene una enfermedad metabólica relacionada.

10

Como se muestra en los ejemplos a continuación, los compuestos dirigidos al GCGR, como se describe en el presente documento, han demostrado reducir la gravedad de los síntomas fisiológicos de enfermedades metabólicas relacionadas, incluyendo síndrome metabólico, diabetes mellitus, resistencia a la insulina, dislipidemia diabética, hipertrigliceridemia, obesidad y aumento de peso. En algunos de los experimentos, los compuestos redujeron los niveles de glucosa en sangre, *por ejemplo*, los animales continuaron experimentando síntomas, pero los síntomas fueron menos graves en comparación con los animales no tratados. En otros experimentos, sin embargo, los compuestos parecen reducir los síntomas de la diabetes; por ejemplo, los animales tratados durante un período de tiempo más largo experimentaron síntomas menos graves que aquellos a los que se administraron los compuestos durante un período de tiempo más corto. En otros experimentos, sin embargo, los compuestos parecen inhibir el aumento de peso; por ejemplo, los animales tratados durante un período de tiempo más largo experimentaron síntomas menos graves que aquellos a los que se administraron los compuestos durante un período de tiempo más corto. En otros experimentos, sin embargo, los compuestos parecen inhibir la hipertrigliceridemia; por ejemplo, los animales tratados durante un período de tiempo más largo experimentaron signos y/o síntomas menos graves que aquellos a los que se administraron los compuestos durante un período de tiempo más corto. La capacidad de los compuestos ilustrados como ejemplo a continuación para restaurar la función, por lo tanto, demuestra que los síntomas de la enfermedad pueden revertirse mediante el tratamiento con un compuesto como se describe en el presente documento.

15

20

25

30

35

40

La diabetes mellitus se caracteriza por numerosos signos y/o síntomas físicos y fisiológicos. Cualquier síntoma conocido por un experto en la técnica que se asocia con la diabetes de tipo 2 se puede mejorar o modificar de otro modo tal como se ha establecido anteriormente en los procedimientos descritos anteriormente. En ciertas realizaciones, el síntoma o signo es un síntoma o signo físico, tal como aumento de los niveles de glucosa, aumento de peso, micción frecuente, sed inusual, hambre extrema, fatiga extrema, visión borrosa, infecciones frecuentes, hormigueo o entumecimiento en las extremidades, sequedad y picazón en la piel, pérdida de peso, llagas de cicatrización lenta y encías hinchadas. En ciertas realizaciones, el síntoma o signo es un síntoma o signo fisiológico seleccionado del grupo que consiste en aumento de la resistencia a la insulina, aumento de los niveles de glucosa, aumento de la masa grasa, disminución de la tasa metabólica, disminución del aclaramiento de glucosa, disminución de la tolerancia a la glucosa, disminución de la sensibilidad a la insulina, disminución de la sensibilidad a la insulina hepática, aumento del tamaño y peso del tejido adiposo, aumento de la grasa corporal y aumento del peso corporal.

45

50

55

En ciertas realizaciones, el síntoma o signo físico es un aumento de los niveles de glucosa. En ciertas realizaciones, el signo o síntoma es aumento de peso. En ciertas realizaciones, el síntoma es micción frecuente. En ciertas realizaciones, el síntoma es sed inusual. En ciertas realizaciones, el síntoma es hambre extrema. En ciertas realizaciones, el síntoma es fatiga extrema. En ciertas realizaciones, el síntoma es visión borrosa. En ciertas realizaciones, el síntoma es infecciones frecuentes. En ciertas realizaciones, el síntoma es hormigueo o entumecimiento en las extremidades. En ciertas realizaciones, el síntoma es piel seca y con picor. En ciertas realizaciones, el signo o síntoma es pérdida de peso. En ciertas realizaciones, el síntoma son llagas de cicatrización lenta. En ciertas realizaciones, el síntoma es inflamación de las encías. En ciertas realizaciones, el signo o síntoma es resistencia a la insulina aumentada. En ciertas realizaciones, el síntoma o signo es un aumento de los niveles de glucosa. En ciertas realizaciones, el síntoma o signo es aumento de la masa grasa. En ciertas realizaciones, el síntoma o signo es una tasa metabólica disminuida. En ciertas realizaciones, el síntoma o signo es disminución del aclaramiento de glucosa. En ciertas realizaciones, el síntoma o signo es disminución de la tolerancia a la glucosa. En ciertas realizaciones, el síntoma o signo es disminución de la sensibilidad a la insulina. En ciertas realizaciones, el síntoma o signo es disminución de la sensibilidad a la insulina hepática. En ciertas realizaciones, el síntoma o signo es aumento del tamaño y peso del tejido adiposo. En ciertas realizaciones, el signo o síntoma es aumento de la grasa corporal. En ciertas realizaciones, el signo o síntoma es aumento del peso corporal.

60

En ciertas realizaciones, se divulgan procedimientos de tratar a un individuo, que comprende administrar una o más composiciones farmacéuticas como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el individuo tiene una enfermedad metabólica relacionada.

65

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

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto antisentido dirigido al GCGR se usan para la preparación de un medicamento para tratar un paciente que padece una enfermedad metabólica relacionada o es susceptible a sufrirla.

- 5 En ciertas realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento incluyen administrar un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que tiene una porción de bases nucleotídicas contiguas como se describe en el presente documento de una secuencia citada en la SEQ ID NO: 11 (ISIS 449884).

Ciertas terapias de combinación

- 10

En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se administran conjuntamente con uno o más agentes farmacéuticos distintos. En ciertas realizaciones, dichos uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar la misma enfermedad, trastorno o afección distinta a la de las una o más composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. En ciertas realizaciones, dichos uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar un efecto secundario indeseado de las una o más composiciones farmacéuticas como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, uno o más composiciones farmacéuticas se administran conjuntamente con otro agente farmacéutico para tratar un efecto indeseado de dicho otro agente farmacéutico. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas se administran conjuntamente con otro agente farmacéutico para producir un efecto combinado. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas se administran conjuntamente con otro agente farmacéutico para producir un efecto sinérgico.

- 25 En ciertas realizaciones, un primer agente y uno o más segundos agentes se administran al mismo tiempo. En ciertas realizaciones, el primer agente y uno o más segundos agentes se administran a tiempos diferentes. En ciertas realizaciones, el primer agente y uno o más segundos agentes se preparan juntos en una única formulación farmacéutica. En ciertas realizaciones, el primer agente y uno o más segundos agentes se preparan por separado.

- 30 En ciertas realizaciones, el segundo compuesto se administra antes de la administración de una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En ciertas realizaciones, el segundo compuesto se administra después de la administración de una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En ciertas realizaciones, el segundo compuesto se administra al mismo tiempo que una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En ciertas realizaciones, la dosis de un segundo compuesto coadministrado es la misma que la dosis que se administraría si el segundo compuesto se administrara solo. En ciertas realizaciones, la dosis de un segundo compuesto coadministrado es menor que la dosis que se administraría si el segundo compuesto se administrara solo. En ciertas realizaciones, la dosis de un segundo compuesto coadministrado es mayor que la dosis que se administraría si el segundo compuesto se administrara solo.

- 40 En ciertas realizaciones, la administración conjunta de un segundo compuesto potencia el efecto de un primer compuesto, de manera que la administración conjunta de los compuestos da como resultado un efecto que es mayor que el efecto de administrar el primer compuesto solo. En ciertas realizaciones, la administración conjunta da como resultado efectos que son aditivos de los efectos de los compuestos cuando se administran solos. En ciertas realizaciones, la administración conjunta da como resultado efectos que son supraaditivos de los efectos de los compuestos cuando se administran solos. En ciertas realizaciones, el primer compuesto es un compuesto antisentido. En ciertas realizaciones, el segundo compuesto es un compuesto antisentido.

- 50 En ciertas realizaciones, los segundos agentes incluyen, pero sin limitación, un agente hipoglucemiante. El agente hipoglucemiante puede incluir, pero sin limitaciones, un cambio de estilo de vida terapéutico, agonista de PPAR, un inhibidor de la dipeptidil peptidasa (IV), un análogo de GLP-1, insulina o un análogo de insulina, un secretagogo de insulina, un inhibidor de SGLT2, un análogo de amilina humana, una biguanida, un inhibidor de alfa-glucosidasa o una combinación de los mismos. El agente hipoglucemiante puede incluir, pero sin limitación, metformina, sulfonilurea, rosiglitazona, meglitinida, tiazolidindiona, inhibidor de alfa-glucosidasa o una combinación de los mismos. La sulfonilurea puede ser acetohexamida, clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, glimepirida, una glipizida, una gliburida o una gliclazida. La meglitinida puede ser nateglinida o repaglinida. La tiazolidindiona puede ser pioglitazona o rosiglitazona. La alfa-glucosidasa puede ser acarbosa o miglitol.

- 60 En algunas realizaciones, la terapéutica hipoglucemiante es un análogo de GLP-1. En algunas realizaciones, el análogo de GLP-1 es exendina-4 o liraglutida.

- En otras realizaciones, la terapéutica hipoglucemiante es una sulfonilurea. En algunas realizaciones, la sulfonilurea es acetohexamida, clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, glimepirida, una glipizida, una gliburida o una gliclazida.

- 65 En algunas realizaciones, el fármaco hipoglucemiante es una biguanida. En algunas realizaciones, la biguanida es metformina y en algunas realizaciones los niveles de glucosa se disminuyen sin incremento de la acidosis láctica en comparación con la acidosis láctica observada tras el tratamiento con metformina sola.

En algunas realizaciones, el fármaco hipoglucemiante es una meglitinida. En algunas realizaciones, la meglitinida es nateglinida o repaglinida.

5 En algunas realizaciones, el fármaco hipoglucemiante es tiazolidindiona. En algunas realizaciones, la tiazolidindiona es pioglitazona, rosiglitazona o troglitazona. En algunas realizaciones, los niveles de glucosa en sangre se disminuyen sin mayor ganancia de peso que la observada con el tratamiento con rosiglitazona sola.

10 En algunas realizaciones, el fármaco hipoglucemiante es un inhibidor de la alfa-glucosidasa. En algunas realizaciones, el inhibidor de la alfa-glucosidasa es acarbosa o miglitol.

En una cierta realización, un agente hipoglucemiante coadministrado es ISIS 113715.

15 En una cierta realización, la terapia hipoglucemiante es un cambio terapéutico del estilo de vida.

En ciertas realizaciones, los segundos agentes incluyen, pero sin limitación, agentes hipolipemiantes. El agente hipolipemiante puede incluir, entre otros, atorvastatina, simvastatina, rosuvastatina y ezetimiba. En ciertas de dichas realizaciones, el agente hipolipemiante se administra antes de la administración de una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En ciertas de dichas realizaciones, el agente hipolipemiante se administra después de la administración de una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En ciertas de dichas realizaciones, el agente hipolipemiante se administra al mismo tiempo que la composición farmacéutica descrita en el presente documento. En ciertas de dichas realizaciones, la dosis de un agente hipolipemiante coadministrado es la misma que la dosis que se administraría si el agente hipolipemiante se administrara solo. En ciertas de dichas realizaciones, la dosis de un agente hipolipemiante coadministrado es menor que la dosis que se administraría si el agente hipolipemiante se administrara solo. En ciertas de dichas realizaciones, la dosis de un agente hipolipemiante coadministrado es mayor que la dosis que se administraría si el agente hipolipemiante se administrara solo.

30 En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un inhibidor de la HMG-CoA reductasa. En ciertas de dichas realizaciones, el inhibidor de la HMG-CoA reductasa es una estatina. En ciertas de dichas realizaciones, la estatina se selecciona de atorvastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina y rosuvastatina.

35 En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un inhibidor de la absorción de colesterol. En ciertas de dichas realizaciones, el inhibidor de la absorción de colesterol es ezetimiba.

En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un inhibidor de la HMG-CoA reductasa formulado conjuntamente con un inhibidor de la absorción de colesterol. En ciertas de dichas realizaciones, el agente hipolipemiante formulado conjuntamente es ezetimiba/simvastatina.

40 En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un inhibidor de la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal.

En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un oligonucleótido dirigido a ApoB.

45 En ciertas realizaciones, los segundos agentes incluyen, pero sin limitación, un agente o fármaco anti-obesidad. Dichos agentes antiobesidad incluyen, pero sin limitación, orlistat, sibutramina o rimonabant, y se pueden administrar como se ha descrito anteriormente, como agentes adiposos o reductores del peso corporal. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido puede coadministrarse con supresores del apetito. Dichos supresores del apetito incluyen, pero sin limitación, tenuato de dietilpropion, mazindol, orlistat, fendimetrazina, fentermina y sibutramina, y pueden administrarse como se describe en el presente documento. En cierta realización, los agentes antiobesidad están basados en el SNC, tales como, pero sin limitación, sibutramina, o basados en GLP-1 tales como, pero sin limitación, liraglutida.

55 *Formulaciones*

Los compuestos proporcionados en el presente documento también pueden mezclarse, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptores u otras formulaciones, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de tales formulaciones de captación, distribución y/o absorción incluyen, pero sin limitaciones, los documentos US: 5.108,921; 5.354,844; 5.416,016; 5.459,127; 5.521,291; 5.543,158; 5.547,932; 5.583,020; 5.591,721; 4.426,330; 4.534,899; 5.013,556; 5.108,921; 5.213,804; 5.227,170; 5.264,221; 5.356,633; 5.395,619; 5.416,016; 5.417,978; 5.462,854; 5.469,854; 5.512,295; 5.527,528; 5.534,259; 5.543,152; 5.556,948; 5.580,575; y 5.595,756.

65 Los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento pueden incluirse en una composición o formulación farmacéutica. La composición farmacéutica que puede incluir cualquier sal, éster o sales de dichos

ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, incluido un ser humano, puede proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o un residuo del mismo.

- 5 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos proporcionados en el presente documento: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto parental y que no producen efectos toxicológicos indeseados en el mismo. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" incluye una sal preparada a partir de bases o ácidos inocuos farmacéuticamente aceptables, incluyendo bases y ácidos inorgánicos y orgánicos. Para los oligonucleótidos, los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos n.º 10 6.287.860. Se ha demostrado que las sales de sodio son formas adecuadas de fármacos oligonucleotídicos.

15 La expresión "derivado farmacéuticamente aceptable" abarca, pero sin limitación, sales, solvatos, hidratos, ésteres, profármacos, polimorfos, isómeros farmacéuticamente aceptables, variantes marcadas isotópicamente de los compuestos descritos en el presente documento.

20 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden administrar de diversos modos dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que se va a tratar. La administración puede ser parenteral. La administración parenteral incluye, pero sin limitación, inyección o infusión subcutánea, intravenosa o intramuscular.

25 Se prefiere que la administración parenteral esté dirigida a la expresión de GCGR dirigida en el hígado y el plasma. Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para administración parenteral.

30 Las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente invención, que se pueden presentar de forma conveniente en forma de monodosis, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en contacto los ingredientes activos con el(los) transportador(es) farmacéutico(s) o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan mezclando de forma uniforme e íntima los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos.

Las composiciones descritas en el presente documento también se pueden formular en forma de suspensiones en medio acuoso, no acuoso o mixto. La suspensión también puede contener estabilizantes.

35 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen, entre otras, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden comprender uno o más potenciadores de la penetración, vehículos, excipientes u otros principios activos o inactivos

40 Las formulaciones incluyen formulaciones liposomales. Como se usa en la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta por lípidos anfifílicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilaminares o multilamelares que tienen una membrana formada a partir de un 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. Se cree que los liposomas que son sensibles al pH o están cargados negativamente atrapan ADN en lugar de formar complejos con él. Se han usado liposomas catiónicos y no catiónicos para suministrar ADN a las células.

50 Los liposomas también incluyen liposomas "estabilizados estéricamente", un término que, como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan a liposomas, dan como resultado tiempos de vida en circulación mejorados con respecto a liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Los liposomas y sus usos se describen con más detalle en la patente de Estados Unidos 6.287.860.

55 En otra realización, las formulaciones incluyen formulaciones salinas. En ciertas realizaciones, una formulación consiste en los compuestos descritos en el presente documento y solución salina. En ciertas realizaciones, una formulación consiste esencialmente en los compuestos descritos en el presente documento y solución salina. En ciertas realizaciones, la solución salina es solución salina de calidad farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la solución salina es solución salina tamponada. En ciertas realizaciones, la solución salina es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

60 En ciertas realizaciones, una formulación excluye liposomas. En ciertas realizaciones, la formulación excluye liposomas estabilizados estéricamente. En ciertas realizaciones, una formulación excluye fosfolípidos. En ciertas realizaciones, una formulación consiste esencialmente en los compuestos descritos en el presente documento y solución salina y excluye liposomas.

65

Las formulaciones y composiciones farmacéuticas también pueden incluir tensioactivos. Los Tensioactivos y sus usos se describen con más detalle en la patente de Estados Unidos 6.287.860.

5 En una realización, la presente invención emplea diversos potenciadores de la penetración para afectar la administración eficiente de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos. Los potenciadores de la penetración y sus usos se describen con más detalle en la patente de Estados Unidos 6.287.860.

10 Un experto en la técnica reconocerá que las formulaciones se diseñan rutinariamente de acuerdo con su uso pretendido, es decir, vía de administración.

15 Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, incluyendo inyección o infusión subcutánea, intravenosa e intramuscular, pueden incluir soluciones acuosas estériles que pueden también contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados, tales como, entre otros, potenciadores de la penetración, compuestos vehículo y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

20 En otra realización relacionada, las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Como alternativa, las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana. En la técnica se conocen numerosos ejemplos de compuestos antisentido. Se pueden usar dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

Dosificación

25 La dosificación depende de la gravedad y la capacidad de respuesta del estado de enfermedad que se va a tratar y el curso de tratamiento que dura de varios días a varios meses o hasta que se efectúa una cura y se consigue una disminución del estado de la enfermedad. Pautas de dosificación óptimas se pueden calcular a partir de mediciones de la acumulación del fármaco en el cuerpo del paciente. Las dosis óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los oligonucleótidos individuales y generalmente se pueden estimar basándose en las CE_{50} que se ha descubierto que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, las dosificaciones varían de 0,01 μ g a 100 g por kg de peso corporal y pueden administrarse una o más veces diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente, o en los intervalos deseados. Tras un tratamiento exitoso, puede ser deseable hacer que el paciente se somete a terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado de enfermedad, en el que el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que varían de 0,01 μ g a 100 g por kg de peso corporal, una o más veces al día.

40 Aunque la presente invención se ha descrito con especificidad de acuerdo con algunas de sus realizaciones preferentes, los ejemplos siguientes solo sirven para ilustrar los compuestos de la invención y no se pretende que limiten la misma.

Ciertos compuestos

45 Se analizaron aproximadamente setecientos setenta y siete compuestos antisentido recientemente diseñados y desvelados anteriormente de diversas longitudes, motivos y composición de la cadena principal para determinar su efecto sobre el ARNm de GCGR *in vitro* en varios tipos de células (Ejemplo 1). Los nuevos compuestos se compararon con compuestos diseñados previamente, incluyendo ISIS 310457, ISIS 315163 e ISIS 325568 que se han determinado previamente como algunos de los compuestos antisentido más potentes *in vitro* (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos, la patente de Estados Unidos n.º 7.399.853 y la solicitud de patente publicada de Estados Unidos n.º US2007-0087987). De los aproximadamente setecientos setenta y siete compuestos antisentido diseñados recientemente y diseñados previamente, solo se presentan aquellos compuestos que fueron seleccionados para un estudio adicional basado en la potencia *in vitro*. Los compuestos seleccionados se analizaron para determinar la inhibición dependiente de la dosis en hepatocitos primarios de mono cinomolgo y células HepG2 (Ejemplos 5-13). De los 120 compuestos analizados por los ensayos de respuesta a la dosis, se seleccionaron 33 oligonucleótidos antisentido para los ensayos de tolerabilidad *in vivo*.

55 Los 33 oligonucleótidos seleccionados finales ISIS 304538 (SEQ ID NO: 112), ISIS 304539 (SEQ ID NO: 113), ISIS 325568 (SEQ ID NO: 4), ISIS 398457 (SEQ ID NO: 9), ISIS 398471 (SEQ ID NO: 17), ISIS 398486 (SEQ ID NO: 24), ISIS 398491 (SEQ ID NO: 105), ISIS 398506 (SEQ ID NO: 108), ISIS 398507 (SEQ ID NO: 109), ISIS 398508 (SEQ ID NO: 110), ISIS 436034 (SEQ ID NO: 35), ISIS 436140 (SEQ ID NO: 102), ISIS 436141 (SEQ ID NO: 114), ISIS 448718 (SEQ ID NO: 99), ISSI 448730 (SEQ ID NO: 100), ISIS 448754 (SEQ ID NO: 98), ISIS 448766 (SEQ ID NO: 31), ISIS 448817 (SEQ ID NO: 52), ISIS 448818 (SEQ ID NO: 56), ISIS 448819 (SEQ ID NO: 58), ISIS 448848 (SEQ ID NO: 62), ISIS 448860 (SEQ ID NO: 65), ISIS 448890 (SEQ ID NO: 68), ISIS 449884 (SEQ ID NO: 11), ISIS 449954 (SEQ ID NO: 51), ISIS 449956 (SEQ ID NO: 54), ISIS 459014 (SEQ ID NO: 80), ISIS 459024 (SEQ ID NO: 89), ISIS 459032 (SEQ ID NO: 81), ISIS 459040 (SEQ ID NO: 82), ISIS 459046 (SEQ ID NO: 83), ISIS 459076 (SEQ ID NO: 84) y ISIS 459157 (SEQ ID NO: 85), se analizaron para determinar la tolerabilidad en un modelo de ratón CD1, así como un modelo de rata Sprague-Dawley. Los compuestos son complementarios a las regiones 548-567,

2016–2035 y 2018–2037 de las SEQ ID NO: 1, y 6682–6698, 7267–7283, 7270–7286, 7292–7308, 7295–7311, 7316–7332, 7317–7333, 7319–7335, 7341–7357, 7344–7360, 7365–7381, 7368–7384, 7389–7405, 7392–7408, 7416–7432, 7437–7453, 7440–7456, 7783–7799, 8030–8049, 8133–8152, 8141–8160, 8144–8160, 9002–9021, 9008–9027, 9245–9264, 9246–9262, 9804–9823, 10676–10695, 10718–10734, 12030–12049, 12031–12050, 12031–12047, 12032–12051, 12033–12052, 12033–12049, 12036–12055, 12175–12194, 12178–12194, 13490–13509, 14138–14157, 15075–15094, 15743–15762, 15744–15763, 15745–15764, y 15746–15765 de la SEQ ID NO:2.

En los modelos *in vivo* se midieron los pesos corporales y los pesos de los órganos, los marcadores de la función hepática (tales como alanina transaminasa, aspartato transaminasa y bilirrubina) y los marcadores de función renal (tal como BUN y creatinina). En el modelo de ratón, ISIS 304538, ISIS 325568, ISIS 398457, ISIS 398471, ISIS 398491, ISIS 436140, ISIS 448754, ISIS 448766, ISIS 448818, ISIS 449884, ISIS 449956, ISIS 459014, ISIS 459024, ISIS 459032, ISIS 459040, ISIS 459046, ISIS 459076 e ISIS 459157 fueron tolerables en términos de niveles de transaminasas (Ejemplo 11). En el modelo de rata Sprague-Dawley, ISIS 304538, ISIS 325568, ISIS 398457, ISIS 398471, ISIS 398491, ISIS 436140, ISIS 448754, ISIS 448766, ISIS 448818, ISIS 449884, ISIS 449956, ISIS 459014, ISIS 459024, ISIS 459032, ISIS 459040, ISIS 459046, ISIS 459076 e ISIS 459157 se consideraron tolerables en términos de niveles de función hepática y marcadores de la función renal (Ejemplo 12).

Se seleccionaron nueve compuestos, ISIS 325568 (SEQ ID NO:4), ISIS 398471 (SEQ ID NO:17), ISIS 436140 (SEQ ID NO:102), ISIS 448766 (SEQ ID NO:31), ISIS 449884 (SEQ ID NO:11), ISIS 459014 (SEQ ID NO:80), ISIS 459032 (SEQ ID NO:81), ISIS 459040 (SEQ ID NO:82) e ISIS 459157 (SEQ ID NO:85), a partir de los modelos de tolerabilidad y se analizaron los efectos a largo plazo sobre la tolerabilidad en un modelo de rata CD/1GS durante 13 semanas (Ejemplo 13). Se midieron los pesos corporales y los pesos de los órganos, los marcadores de la función hepática (tales como alanina transaminasa, aspartato transaminasa y bilirrubina) y los marcadores de función renal (tal como BUN y creatinina). Los nueve compuestos también se analizaron para determinar su viscosidad, que se encontró que era óptima para todos los oligonucleótidos (Ejemplo 14).

ISIS 449884, que demostró una tolerabilidad muy buena en los tres modelos *in vivo*, se analizó para determinar su semivida en el hígado de ratón CD1 (Ejemplo 15). La semivida de ISIS 449884 se calculó en 15 días.

La evaluación final de estos estudios (Ejemplos 11-15) condujo a la selección de ocho oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases nucleotídicas de SEQ ID NO: 17 (ISIS 398471), 102 (ISIS 436140), 31 (ISIS 448766), 11 (ISIS 449884), 80 (ISIS 459014), 81 (ISIS 459032), 82 (ISIS 459040) o 85 (ISIS 459157). Los compuestos son complementarios a las regiones 7267–7283, 7270–7286, 7292–7308, 7295–7311, 7316–7332, 7319–7335, 7341–7357, 7344–7360, 7437–7453, 7365–7381, 7368–7384, 7389–7405, 7392–7408, 7416–7432, 7440–7456, 7783–7799, 8133–8152, 8144–8160, 9804–9823, 10718–10734, 15743–15762 de SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, los compuestos dirigidos a las regiones enumeradas, como se describe adicionalmente en el presente documento, comprenden un oligonucleótido modificado que tiene alguna porción de base nucleotídica de la secuencia indicada en las SEQ ID NO, como se describe adicionalmente en el presente documento. En ciertas realizaciones, los compuestos dirigidos a las regiones enumeradas o que tienen una porción de base nucleotídica de una secuencia enumerada en las SEQ ID NOs pueden ser de diversa longitud, como se describe adicionalmente en el presente documento, y puede tener uno de varios motivos, como se describe adicionalmente en el presente documento. En ciertas realizaciones, un compuesto dirigido a una región o que tiene una porción de base nucleotídica de una secuencia enumerada en las SEQ ID NOs listadas tiene la longitud y el motivo específicos, como se indica mediante los números ISIS: 398471, 436140, 448766, 449884, 459014, 459032, 459040, y 459157.

Estos ocho compuestos se analizaron para determinar su actividad, perfil farmacocinético y tolerabilidad en monos cinomolgos (Ejemplo 16). El tratamiento con algunos de los compuestos causó la reducción de la expresión de ARNm del GCGR en tejido hepático. Específicamente, el tratamiento con ISIS 449884, ISIS 459157 e ISIS 325568 causó una reducción significativa de la expresión de ARNm de GCGR en el tejido hepático, en comparación con el control de PBS. Se observó que ISIS 449884 causó la mayor reducción de expresión de ARNm de GCGR en comparación con el control de PBS. El aumento de los niveles de glucagón es una consecuencia de la inhibición de los niveles de ARNm de GCGR. El tratamiento con ISIS 325568, ISIS 448766, ISIS 459157 e ISIS 449884 causó aumentos significativos en los niveles de glucagón en plasma, causando ISIS 449884 el mayor aumento. Por lo tanto, en términos de actividad, ISIS 449884 fue el más eficaz en el estudio de los monos. El tratamiento con los compuestos fue bien tolerado en los monos, en particular, el tratamiento con ISIS 449884.

De acuerdo con esto, se proporcionan en el presente documento compuestos antisentido con una o más de las características mejoradas. En ciertas realizaciones, los compuestos como se describen en el presente documento son eficaces en virtud de tener al menos uno de una Cl_{50} *in vitro* inferior a 0,1 μ M, inferior a 0,2 μ M, inferior a 0,4 μ M, inferior a 0,35 μ M, inferior a 0,3 μ M, inferior a 2,5 μ M, inferior a 2,0 μ M, inferior a 1,5 μ M, inferior a 1,0 μ M, cuando se libera en una línea celular HepG2 usando electroporación como se describe en los Ejemplos 8-11. En algunas de tales realizaciones, los compuestos son complementarios a una o más de las regiones 548–567, 2016–2035 y 2018–2037 de la SEQ ID NO: 1, y 6682–6698, 7267–7283, 7270–7286, 7292–7308, 7295–7311, 7316–7332, 7317–7333, 7319–7335, 7341–7357, 7344–7360, 7365–7381, 7368–7384, 7389–7405, 7392–7408, 7416–7432, 7437–7453, 7440–7456, 7783–7799, 8030–8049, 8133–8152, 8141–8160, 8144–8160, 9002–9021, 9008–9027, 9245–9264,

9246–9262, 9804–9823, 10676–10695, 10718–10734, 12030–12049, 12031–12050, 12031–12047, 12032–12051, 12033–12052, 12033–12049, 12036–12055, 12175–12194, 12178–12194, 13490–13509, 14138–14157, 15075–15094, 15743–15762, 15744–15763, 15745–15764, y 15746–15765 de la SEQ ID NO:2.

- 5 En ciertas realizaciones, los compuestos como se describen en el presente documento son altamente tolerables, como se demuestra al tener al menos uno de un aumento de un valor de ALT o AST de no más de aproximadamente 100 veces, aproximadamente 60 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 30 plegar, aproximadamente 25 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 3 veces, o aproximadamente 2 veces sobre los animales tratados con
 10 solución salina; o un aumento del peso del hígado, bazo o riñón de no más de aproximadamente 30 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 5 % o aproximadamente 2 % como se describe en los Ejemplos. En ciertas de tales realizaciones, los compuestos son complementarios a una o más de las regiones 7267–7283, 7270–7286, 7292–7308, 7295–7311, 7316–7332, 7319–7335, 7341–7357, 7344–7360, 7437–7453, 7365–7381, 7368–7384, 7389–7405, 7392–7408,
 15 7416–7432, 7440–7456, 7783–7799, 8133–8152, 8144–8160, 9804–9823, 10718–10734, 15743–15762 de la SEQ ID NO:2.

Ejemplos

20 *Divulgación no limitante*

Aunque en el presente documento se han descrito ciertos compuestos, composiciones y procedimientos con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los ejemplos siguientes sólo sirven para ilustrar los compuestos descritos en el presente documento y no se pretende que limiten la misma.

25

Ejemplo 1: Inhibición antisentido del receptor de glucagón humano (GCGR) en células HepG2

- Se diseñaron oligonucleótidos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de GCGR y se analizaron sus efectos sobre el ARNm de GCGR *in vitro*. ISIS 310457, que se describió en una publicación anterior (WO 2007/035771) también se analizó. Las células HepG2 cultivadas a una densidad de 40.000 células por pocillo se transfectaron usando electroporación con oligonucleótido antisentido 4.000 nM. Tras un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm del GCGR mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador humano RTS1508 (secuencia directa GACACCCCGCCAATACC, designado en el presente documento como SEQ ID NO: 116; secuencia inversa CCGCATCTCTTGAACACGAA, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 117; secuencia de la sonda TTGGCACCACAAAGT, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 118) se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de GCGR se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición de GCGR respecto a las células control sin tratar. Se aisló un total de 309 oligonucleótidos. Solo los oligonucleótidos que se seleccionaron para los ensayos de respuesta a la dosis se muestran en la Tabla 1.

40

- Los oligonucleótidos antisentido quiméricos recientemente diseñados en la Tabla 1 se diseñaron como gapmeros 3-10-4 MOE o gapmeros 5-10-5 MOE. Los gapmeros 3-10-4 MOE tienen 17 nucleósidos de longitud, en los que el segmento del hueco central comprende diez desoxinucleósidos 2' y está flanqueado por un segmento de ala en la dirección 5' que comprende tres nucleósidos y por un segmento de ala en la dirección 3' que comprende cuatro nucleósidos. Los gapmeros 5-10-5 MOE tienen 20 nucleósidos de longitud, en los que el segmento del hueco central comprende diez desoxinucleósidos 2' y está flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y en la dirección 3' que comprende cinco nucleósidos cada uno. Cada nucleósido en el segmento de ala en 5' y cada nucleósido en el segmento de ala 3' tiene una modificación de 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada gapmero son enlaces fosforotioato (P = S). Todos los restos de citosina a lo largo de cada gapmero son 5-metilcitosinas. El "sitio de inicio" indica el nucleótido más 5' al que se dirige el gapmero en la secuencia génica humana. El "sitio de terminación" indica el nucleótido más 3' al que se dirige el gapmero en la secuencia génica humana. Cada gapmero enumerado en la Tabla 1 está dirigido al ARNm de GCGR humano, designado en el presente documento como SEQ ID NO: 1 (N.º de acceso de GENBANK NM_000160.3) o la secuencia genómica de GCGR humano, designada en el presente documento como SEQ ID NO: 2 (N.º de acceso en GENBANK NW_926918.1 truncado de 19598000 a 16865000). 'n/a' indica que el oligonucleótido antisentido no se dirige a esa secuencia génica particular.

55

Tabla 1

Inhibición de los niveles de ARNm del GCGR humano por oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2

No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
310457	548	564	GCACTTTGTGGTGCCAAGGC	88	5-10-5	n/a	n/a	4
449823	1098	1114	GCACCCAGCCGATGCC	91	3-10-4	n/a	n/a	5
450035	n/a	n/a	AGCCCTGGCCGGTCCTT	82	3-10-4	6691	6707	6
449881	n/a	n/a	TCCCGAGGTGCCCAATG	89	3-10-4	7267	7283	7
						7292	7308	
						7316	7332	
						7341	7357	
						7365	7381	
						7389	7405	
449882	n/a	n/a	TTCCCGAGGTGCCCAAT	87	3-10-4	7268	7284	8
						7293	7309	
						7317	7333	
						7342	7358	
						7366	7382	
						7390	7406	
						7414	7430	
398457	n/a	n/a	GGGTTCCCGAGGTGCCCAAT	95	3-10-4	7268	7287	9
						7293	7312	
						7317	7336	
						7342	7361	
						7366	7385	
						7390	7409	
						7414	7433	
7438	7457							

ES 2 673 721 T3

No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
449883	n/a	n/a	GTTCCCGAGGTGCCCAA	98	3-10-4	7269	7285	10
						7294	7310	
						7318	7334	
						7343	7359	
						7367	7383	
						7391	7407	
						7415	7431	
449884	n/a	n/a	GGTCCCGAGGTGCCCA	94	3-10-4	7270	7286	11
						7295	7311	
						7319	7335	
						7344	7360	
						7368	7384	
						7392	7408	
						7416	7432	
449885	n/a	n/a	GGGTTCCCGAGGTGCCC	93	3-10-4	7271	7287	12
						7296	7312	
						7320	7336	
						7345	7361	
						7369	7385	
						7393	7409	
						7417	7433	
450039	n/a	n/a	TGATCTACCCAGCCCT	88	3-10-4	7740	7756	13
						7782	7798	
						7785	7801	
						7897	7913	
						8133	8152	
						8139	8155	
						8139	8155	
449894	n/a	n/a	AAGGTGACACCAGCCTG	92	3-10-4	7782	7798	14
449895	n/a	n/a	CTGAAGGTGACACCAGC	90	3-10-4	7785	7801	15
450040	n/a	n/a	TTCCAGCTGAGCACCCA	84	3-10-4	7897	7913	16
398471	n/a	n/a	TCCACAGGCCACAGGTGGGC	80	5-10-5	8133	8152	17
449905	n/a	n/a	GCATCCACAGGCCACAG	85	3-10-4	8139	8155	18

ES 2 673 721 T3

No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
449906	n/a	n/a	AGCATCCACAGGCCACA	90	3-10-4	8140	8156	19
449907	n/a	n/a	CAGCATCCACAGGCCAC	85	3-10-4	8141	8157	20
449908	n/a	n/a	CTCAGCATCCACAGGCC	84	3-10-4	8143	8159	21
449910	n/a	n/a	AGCCACTGGGAGCACCC	85	3-10-4	8386	8402	22
449912	n/a	n/a	GGCTCTGCCCCAACTCT	82	3-10-4	8448	8464	23
398486	n/a	n/a	GTGAGCAGCCATGCAGGCTT	95	5-10-5	9002	9021	24
449916	n/a	n/a	GAGCAGCCATGCAGGCT	86	3-10-4	9003	9019	25
449917	n/a	n/a	TGAGCAGCCATGCAGGC	90	3-10-4	9004	9020	26
449922	n/a	n/a	GCCAGGTGAGCAGCCAT	86	3-10-4	9010	9026	27
450049	n/a	n/a	AGGGACAGGCACCTGCG	87	3-10-4	9130	9146	28
450050	n/a	n/a	GCCTGGATTTTAGCCTC	84	3-10-4	9249	9265	29
448762	n/a	n/a	CGGGGTGGCAACAGCTACAC	80	5-10-5	9592	9611	30
448766	n/a	n/a	GCAAGGCTCGGTTGGGCTTC	86	5-10-5	9804	9823	31
450054	n/a	n/a	TGCAAGGCTCGGTTGGG	82	3-10-4	9808	9824	32
449759	176	192	GCAGAGCAGCAGAGCCT	80	3-10-4	10667	10683	33
449760	177	193	GGCAGAGCAGCAGAGCC	88	3-10-4	10668	10684	34
436034	185	204	GGCAGCTGAGTGGCAGAGCA	72	5-10-5	10676	10695	35
450059	281	297	GCATGCCTCTGGGCAGC	88	3-10-4	10772	10788	36
448799	n/a	n/a	AGGCACAGGCTGAAAGGCTC	80	5-10-5	11667	11686	37

ES 2 673 721 T3

No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
449938	n/a	n/a	AGGCCAGGCACAGGCTG	92	3-10-4	11675	11691	38
448802	n/a	n/a	GCTGAGGCCAGGCACAGGCT	87	5-10-5	11676	11695	39
398585	n/a	n/a	GGCTGCATAAGCACCCAGGA	87	5-10-5	11724	11743	40
449944	n/a	n/a	CTGCATAAGCACCCAGG	84	3-10-4	11725	11741	41
449945	n/a	n/a	CCCAGCTCTGTGGCTCA	90	3-10-4	11819	11835	42
448806	n/a	n/a	GTCCCCAGCTCTGTGGCTCA	96	5-10-5	11819	11838	43
450061	n/a	n/a	GCAAGTCCCCAGCTCTG	91	3-10-4	11826	11842	44
449948	n/a	n/a	CGCCCTGGCACTGTCTG	88	3-10-4	11962	11978	45
449949	n/a	n/a	GTGTCCAGGCCATGATA	88	3-10-4	12026	12042	46
449951	n/a	n/a	AAGTGTCCAGGCCATGA	93	3-10-4	12028	12044	47
398504	n/a	n/a	CCCAAGTGTCCAGGCCATGA	91	5-10-5	12028	12047	48
449952	n/a	n/a	CAAGTGTCCAGGCCATG	90	3-10-4	12029	12045	49
449953	n/a	n/a	CCAAGTGTCCAGGCCAT	91	3-10-4	12030	12046	50
449954	n/a	n/a	CCCAAGTGTCCAGGCCA	92	3-10-4	12031	12047	51
448817	n/a	n/a	CACCCAAGTGTCCAGGCCA	98	5-10-5	12031	12050	52
449955	n/a	n/a	CCCAAGTGTCCAGGCC	94	3-10-4	12032	12048	53
449956	n/a	n/a	ACCCAAGTGTCCAGGC	89	3-10-4	12033	12049	54
449958	n/a	n/a	GCACCCAAGTGTCCAG	93	3-10-4	12035	12051	55
448818	n/a	n/a	CCCTGCACCCAAGTGTCCA	83	5-10-5	12036	12055	56

ES 2 673 721 T3

No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
449960	n/a	n/a	AAACCTGTGGCTGCCAC	93	3-10-4	12175	12191	57
448819	n/a	n/a	GCCAAACCTGTGGCTGCCAC	95	5-10-5	12175	12194	58
449797	733	749	GGACAGGCTGTAGCCCA	83	3-10-4	13034	13050	59
448840	n/a	n/a	GGCTCACTCCATCACTGAGC	82	5-10-5	13314	13333	60
449967	n/a	n/a	CCACCTGCCTGGCTGCC	89	3-10-4	13366	13382	61
448848	1024	1043	GTGCAGGTACAGGCCCTCCA	92	5-10-5	13490	13509	62
448850	1049	1068	GGAGGGTGGCCAGGCCCAGC	80	5-10-5	13515	13534	63
449819	1093	1109	CCAGCCGATGCCCAGGT	82	3-10-4	13559	13575	64
448860	n/a	n/a	GGCCAGTGTCTCTGGTGTCTCT	79	5-10-5	14138	14157	65
449836	1467	1483	GCCACCAGCAGGCCCTG	87	3-10-4	14779	14795	66
450074	n/a	n/a	GGGCTGAGGCCAACCTG	91	3-10-4	15007	15023	67
448890	n/a	n/a	GCCACCCAGCATCGCCACGG	86	5-10-5	15075	15094	68
448897	n/a	n/a	CCCTGCTGGGCACAGCTATG	83	5-10-5	15094	15113	69
448901	n/a	n/a	CACAAGCTCCCTGCTGGGCA	82	5-10-5	15102	15121	70
448903	n/a	n/a	GAGCGACACAAGCTCCCTGC	86	5-10-5	15108	15127	71
448905	n/a	n/a	GGTGCAGAGCGACACAAGCT	81	5-10-5	15114	15133	72
449851	1646	1662	GGCTGCCACCACCCCTC	88	3-10-4	15374	15390	73
449856	2016	2032	CTTTATTGTTGGAGGAC	85	3-10-4	15744	15760	74
449858	2018	2034	CTCTTTATTGTTGGAGG	85	3-10-4	15746	15762	75

No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
449859	2019	2035	GCTCTTTATTGTTGGAG	91	3-10-4	15747	15763	76
449860	2020	2036	AGCTCTTTATTGTTGGA	88	3-10-4	15748	15764	77
449861	2021	2037	GAGCTCTTTATTGTTGG	81	3-10-4	15749	15765	78

Ejemplo 2: Inhibición antisentido del receptor de glucagón humano (GCGR) en células HepG2

Se diseñaron oligonucleótidos antisentido adicionales dirigidos a un ácido nucleico de GCGR y se analizaron sus efectos sobre el ARNm de GCGR *in vitro*. También se analizó ISIS 315163 (ACCTGGAAGCTGCTGTACAT (SEQ ID NO 79); el sitio de iniciación en la SEQ ID NO:1 es 702; el sitio de iniciación en la SEQ ID NO:2 es 13003), que se describió en una publicación anterior (documento WO 2004/096016). Las células HepG2 cultivadas a una densidad de 40.000 células por pocillo se transfectaron usando electroporación con oligonucleótido antisentido 1.000 nM. Tras un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm del GCGR mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando el conjunto de sonda de cebador humano RTS1508. Los niveles de ARNm de GCGR se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición de GCGR respecto a las células control sin tratar. Se aisló un total de 156 oligonucleótidos antisentido. Solo los oligonucleótidos que se seleccionaron para los ensayos de respuesta a la dosis se muestran en la Tabla 2.

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos recientemente diseñados en la Tabla 2 se diseñaron como los gapmeros 3-10-3 MOE, 3-10-4 MOE 4-10-4 MOE, 4-10-5 MOE o 5-10-6 MOE. Los gapmeros 3-10-3 MOE tienen 16 nucleósidos de longitud, en los que el segmento del hueco central comprende diez desoxinucleósidos 2' y está flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y en la dirección 3' que comprende tres nucleósidos cada uno. Los gapmeros 3-10-4 MOE tienen 17 nucleósidos de longitud, en los que el segmento del hueco central comprende diez desoxinucleósidos 2' y está flanqueado por un segmento de ala en la dirección 5' que comprende tres nucleósidos y por un segmento de ala en la dirección 3' que comprende cuatro nucleósidos. Los gapmeros 4-10-4 MOE tienen 18 nucleósidos de longitud, en los que el segmento del hueco central comprende diez desoxinucleósidos 2' y está flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y en la dirección 3' que comprende cuatro nucleósidos cada uno. Los gapmeros 4-10-5 MOE tienen 19 nucleósidos de longitud, en los que el segmento del hueco central comprende diez desoxinucleósidos 2' y está flanqueado por un segmento de ala en la dirección 5' que comprende cuatro nucleósidos y por un segmento de ala en la dirección 3' que comprende cinco nucleósidos. Los gapmeros 5-10-6 MOE tienen 21 nucleósidos de longitud, en los que el segmento del hueco central comprende diez desoxinucleósidos 2' y está flanqueado por un segmento de ala en la dirección 5' que comprende cinco nucleósidos y por un segmento de ala en la dirección 3' que comprende seis nucleósidos. Cada nucleósido en el segmento de ala en 5' y cada nucleósido en el segmento de ala 3' tiene una modificación de 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada gapmero son enlaces fosforotioato (P = S). Todos los restos de citosina a lo largo de cada gapmero son 5-metilcitosinas. El "sitio de inicio" indica el nucleótido más 5' al que se dirige el gapmero en la secuencia génica humana. El "sitio de terminación" indica el nucleótido más 3' al que se dirige el gapmero en la secuencia génica humana. Cada gapmero enumerado en la Tabla 2 está dirigido al ARNm de GCGR humano, designado en el presente documento como SEQ ID NO: 1 (N.º de acceso de GENBANK NM_000160.3) o la secuencia genómica de GCGR humano, designada en el presente documento como SEQ ID NO: 2 (N.º de acceso en GENBANK NW_926918.1 truncado de 19598000 a 16865000). 'n/a' indica que el oligonucleótido antisentido no se dirige a esa secuencia génica particular.

Tabla 2

Inhibición de los niveles de ARNm del GCGR humano por oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a la SEQ ID NO: y la SEQ ID NO: 2

No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
315163	702	721	ACCTGGAAGCTGCTGTACAT	38	5-10-5	13003	13022	79
459014	227	243	GGGCAATGCAGTCCTGG	62	3-10-4	10718	10734	80
459032	n/a	n/a	GAAGGTGACACCAGCCT	83	3-10-4	7783	7799	81
459040	n/a	n/a	GCTCAGCATCCACAGGC	63	3-10-4	8144	8160	82
459046	n/a	n/a	TGGATTTTAGCCTCCTC	73	3-10-4	9246	9262	83
459076	n/a	n/a	GCCAAACCTGTGGCTGC	84	3-10-4	12178	12194	84
459157	n/a	n/a	GGGTTCCCGAGGTGCCCAATG	92	5-10-6	7267	7287	85
						7292	7312	
						7316	7336	
						7341	7361	
						7365	7385	
						7389	7409	
459010	n/a	n/a	GGTTCCTCGAGGTGCC	100	3-10-3	7271	7286	86
						7296	7311	
						7320	7335	
						7345	7360	
						7369	7384	
						7393	7408	
						7417	7432	
7441	7456							
459011	n/a	n/a	GGGTTCCCGAGGTGCC	89	3-10-3	7272	7287	87
						7297	7312	
						7321	7336	
						7346	7361	
						7370	7385	
						7394	7409	
						7418	7433	
7442	7457							
459058	n/a	n/a	GAGGCCAGGCACAGGCT	75	3-10-4	11676	11692	88
459024	n/a	n/a	CGGTCCTTGGAGGATGC	63	3-10-4	6682	6698	89

ES 2 673 721 T3

No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
459088	n/a	n/a	GTTCCCGAGGTGCCCAATG	89	4-10-5	7267	7285	90
						7292	7310	
						7316	7334	
						7341	7359	
						7365	7383	
						7389	7407	
						7437	7455	
459087	n/a	n/a	GGTCCCGAGGTGCCCAAT	95	4-10-5	7268	7286	91
						7293	7311	
						7317	7335	
						7342	7360	
						7366	7384	
						7390	7408	
						7414	7432	
7438	7456							
459086	n/a	n/a	GGGTTCCCGAGGTGCCCAA	96	4-10-5	7269	7287	92
						7294	7312	
						7318	7336	
						7343	7361	
						7367	7385	
						7391	7409	
						7415	7433	
7439	7457							
459083	n/a	n/a	GGTCCCGAGGTGCCCAA	91	4-10-4	7269	7286	93
						7294	7311	
						7318	7335	
						7343	7360	
						7367	7384	
						7391	7408	
						7415	7432	
7439	7456							
459009	n/a	n/a	GTTCCCGAGGTGCCCA	61	3-10-3	7270	7285	94
						7295	7310	
						7319	7334	
						7344	7359	
						7368	7383	
						7392	7407	
						7416	7431	

No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
						7440	7455	
459082	n/a	n/a	GGGTTCCCGAGGTGCCCA	91	4-10-4	7270	7287	95
						7295	7312	
						7319	7336	
						7344	7361	
						7368	7385	
						7392	7409	
						7416	7433	
						7440	7457	
459158	n/a	n/a	GGGTTCCCGAGGTGCCCAATA	94	5-10-6	7413	7433	96
459063	n/a	n/a	CCAGCTCTGTGGCTCAG	62	3-10-4	11818	11834	97

Ejemplo 3: Inhibición antisentido del receptor de glucagón humano (GCGR) en células HepG2

- 5 Se diseñaron oligonucleótidos antisentido adicionales dirigidos a un ácido nucleico de GCGR y se analizaron sus efectos sobre el ARNm de GCGR *in vitro*. También se analizó ISIS 315163. También se analizó ISIS 325568, que se ha descrito en una publicación anterior (documento WO 2007/035771). Las células HepG2 cultivadas a una densidad de 40.000 células por pocillo se transfectaron usando electroporación con oligonucleótido antisentido 2.000 nM. Tras un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm del GCGR mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando el conjunto de sonda de cebador humano RTS1508. Los niveles de ARNm de GCGR se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición de GCGR respecto a las células control sin tratar. Se aisló un total de 78 oligonucleótidos antisentido. Solo los oligonucleótidos que se seleccionaron para los ensayos de respuesta a la dosis se muestran en la Tabla 3.
- 10
- 15 Los oligonucleótidos antisentido quiméricos recién designados en la Tablas 3 se diseñaron como gapmeros 5-10-5 MOE. También se analizó ISIS 315163 (ACCTGGAAGCTGCTGTACAT (SEQ ID NO 79); el sitio de iniciación en la SEQ ID NO:1 es 702; el sitio de iniciación en la SEQ ID NO:2 es 13003), que se describió en una publicación anterior (documento WO 2004/096016). Cada nucleósido en el segmento de ala en 5' y cada nucleósido en el segmento de ala 3' tiene una modificación de 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada gapmero son enlaces fosforotioato (P = S). Todos los restos de citosina a lo largo de cada gapmero son 5-metilcitosinas. El "sitio de inicio" indica el nucleótido más 5' al que se dirige el gapmero en la secuencia génica humana. El "sitio de terminación" indica el nucleótido más 3' al que se dirige el gapmero en la secuencia génica humana. Cada gapmero enumerado en la Tabla 3 está dirigido al ARNm de GCGR humano, designado en el presente documento como SEQ ID NO: 1 (N.º de acceso de GENBANK NM_000160.3) o la secuencia genómica de GCGR humano, designada en el presente documento como SEQ ID NO: 2 (N.º de acceso en GENBANK NW_926918.I truncado de 19598000 a 16865000). 'n/a' indica que el oligonucleótido antisentido no se dirige a esa secuencia génica particular.
- 20
- 25

Tabla 3

Inhibición de los niveles de ARNm del GCGR humano mediante oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2

No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
315163	702	721	ACCTGGAAGCTGCTGTACAT	42	5-10-5	13003	13022	79
325568	548	567	GCACTTTGTGGTGCCAAGGC	58	2-16-2	n/a	n/a	4
448754	n/a	n/a	CCTGGATTTTAGCCTCCTCC	79	5-10-5	9245	9264	98
448718	n/a	n/a	TGGGTCTCTGATAGTGAGGC	81	5-10-5	8030	8049	99
448730	n/a	n/a	GCTCAGCATCCACAGGCCAC	74	5-10-5	8141	8160	100
448738	n/a	n/a	GCCAAGCCTGGCTCTGCCCC	76	5-10-5	8454	8473	101

5

Ejemplo 4: Inhibición antisentido del receptor de glucagón humano (GCGR) en células HepG2

Se diseñaron oligonucleótidos antisentido adicionales dirigidos a un ácido nucleico de GCGR y se analizaron sus efectos sobre el ARNm de GCGR *in vitro*. También se analizaron ISIS 315163 e ISIS 325568. Las células HepG2 cultivadas a una densidad de 40.000 células por pocillo se transfectaron usando electroporación con oligonucleótido antisentido 5.000 nM. Tras un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm del GCGR mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando el conjunto de sonda de cebador humano RTS1508. Los niveles de ARNm de GCGR se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición de GCGR respecto a las células control sin tratar. Se aisló un total de 234 oligonucleótidos antisentido. Solo los oligonucleótidos que se seleccionaron para los ensayos de respuesta a la dosis se muestran en la Tabla 4.

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos recién designados en la Tablas 4 se diseñaron como gapmeros 5-10-5 MOE. También se analizó ISIS 315163 (ACCTGGAAGCTGCTGTACAT (SEQ ID NO 79); el sitio de iniciación en la SEQ ID NO:1 es 702; el sitio de iniciación en la SEQ ID NO:2 es 13003), que se describió en una publicación anterior (documento WO 2004/096016). Cada nucleósido en el segmento de ala en 5' y cada nucleósido en el segmento de ala 3' tiene una modificación de 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada gapmero son enlaces fosforotioato (P = S). Todos los restos de citosina a lo largo de cada gapmero son 5-metilcitosinas. El "sitio de inicio" indica el nucleótido más 5' al que se dirige el gapmero en la secuencia génica humana. El "sitio de terminación" indica el nucleótido más 3' al que se dirige el gapmero en la secuencia génica humana. Cada gapmero enumerado en la Tabla 4 está dirigido al ARNm de GCGR humano, designado en el presente documento como SEQ ID NO: 1 (N.º de acceso de GENBANK NM_000160.3) o la secuencia genómica de GCGR humano, designada en el presente documento como SEQ ID NO: 2 (N.º de acceso en GENBANK NW_926918.1 truncado de 19598000 a 16865000). 'n/a' indica que el oligonucleótido antisentido no se dirige a esa secuencia génica particular.

35

Tabla 4

Inhibición de los niveles de ARNm del GCGR humano por oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2

No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
315163	702	721	ACCTGGAAGCTGCTGTACAT	71	5-10-5	13003	13022	79
325568	548	567	GCACTTTGTGGTGCCAAGGC	79	2-16-2	n/a	n/a	4

436140	2015	2034	CTCTTTATTGTTGGAGGACA	93	5-10-5	15743	15762	102
398455	2014	2033	TCTTTATTGTTGGAGGACAT	89	5-10-5	15742	15761	103
398470	n/a	n/a	CCACAGGCCACAGGTGGGCT	85	5-10-5	8132	8151	104
398491	n/a	n/a	AGCCAGGTGAGCAGCCATGC	81	5-10-5	9008	9027	105
398501	n/a	n/a	AAGTGTCAGGCCATGATAT	84	5-10-5	12025	12044	106
398503	n/a	n/a	CCAAGTGTCAGGCCATGAT	92	5-10-5	12027	12046	107
398506	n/a	n/a	ACCCCAAGTGTCAGGCCAT	89	5-10-5	12030	12049	108
398507	n/a	n/a	GCACCCCAAGTGTCAGGCC	97	5-10-5	12032	12051	109
398508	n/a	n/a	TGCACCCCAAGTGTCAGGC	87	5-10-5	12033	12052	110
304535	1988	2007	GCACATGGGACGTGCCGACA	98	5-10-5	15716	15735	111
304538	2016	2035	GCTCTTTATTGTTGGAGGAC	95	5-10-5	15744	15763	112
304539	2018	2037	GAGCTCTTTATTGTTGGAGG	92	5-10-5	15746	15765	113
436141	2017	2036	AGCTCTTTATTGTTGGAGGA	93	5-10-5	15745	15764	114
436164	n/a	n/a	GGTCCCGAGGTGCCCAATG	92	5-10-5	7267	7286	115
						7292	7311	
						7316	7335	
						7341	7360	
						7365	7384	
						7389	7408	
						7437	7456	

Ejemplo 5: Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en hepatocitos primarios de mono cinomolgo

- 5 Los gapmeros del Ejemplo 1 que exhiben inhibición significativa *in vitro* del GCGR humano se analizó en diversas condiciones en hepatocitos primarios de cinomolgo. Las células se sembraron a una densidad de 24.000 células por pocillo y se transfectoron mediante electroporación con concentraciones de oligonucleótido antisentido de 0,4 µM, 1,1 µM, 3,3 µM y 10,0 µM, como se especifica en la Tabla 5. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, el ARN aislado de las células y los niveles de ARNm del GCGR se midieron mediante
- 10 PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador DE GCGR humano RTS1508 se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de GCGR se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición de GCGR respecto a las células control sin tratar.
- 15 La concentración inhibitoria semimáxima (CI₅₀) de cada oligonucleótido también se presenta en la Tabla 5 y se calculó representando las concentraciones de oligonucleótidos utilizadas frente al porcentaje de inhibición de la expresión de ARNm de GCGR logrado en cada concentración, y observando la concentración de oligonucleótido a la que se logró una inhibición del 50 % en comparación con el control. Como se ilustra en la Tabla 5, los niveles de ARNm del GCGR se redujeron significativamente de una manera dependiente de la dosis en células tratadas con
- 20 oligonucleótidos antisentido

Tabla 5

Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en hepatocitos primarios de mono cinomolgo usando electroporación

25

ISIS No	0,4 µM	1,1 µM	3,3 µM	10,0 µM	CI ₅₀ (µM)
315163	23	39	73	88	2,0
398457	64	69	71	68	<0,3
449759	24	47	75	85	1,3
449760	43	49	77	86	0,7
449797	38	54	69	93	0,8
449819	30	36	56	85	1,7

ES 2 673 721 T3

ISIS No	0,4 µM	1,1 µM	3,3 µM	10,0 µM	CI ₅₀ (µM)
449823	29	31	43	82	2,5
449836	29	37	62	85	1,6
449851	14	36	73	93	1,6
449856	0	39	70	88	2,1
449858	16	27	65	86	2,1
449859	57	76	92	96	<0,3
449860	41	66	86	91	0,5
449881	27	49	67	70	1,5
449882	33	33	53	71	2,3
449883	63	66	75	76	<0,3
449884	64	77	74	71	<0,3
449885	67	74	71	76	<0,3
449894	55	56	74	78	<0,3
449895	44	60	71	72	0,5
449905	47	59	65	69	0,4
449906	52	66	75	80	<0,3
449907	35	36	62	70	1,8
449908	21	48	67	69	1,8
449910	7	16	51	61	4,8
449912	21	45	66	60	2,3
449916	16	40	55	55	3,9
449917	45	67	72	71	0,3
449922	39	48	60	67	1,3
449938	5	22	44	41	>10,0
449944	6	0	25	62	7,0
449945	22	36	57	64	2,8
449948	0	19	45	60	5,2
449949	0	16	41	52	7,8
449951	26	40	55	61	2,9
449952	21	28	52	62	3,8
449953	15	22	49	59	4,8
449954	0	53	60	58	3,4
449955	30	43	61	66	1,9
449956	10	40	52	64	3,3
449958	17	46	54	67	2,6
449960	10	22	46	63	4,7
449967	0	16	36	49	9,8
450035	0	35	41	60	5,0
450039	18	30	51	60	4,2
450040	0	21	41	66	4,7
450049	22	27	59	68	2,9
450050	28	22	49	61	4,7
450054	0	11	22	25	>10,0

ISIS No	0,4 μM	1,1 μM	3,3 μM	10,0 μM	CI ₅₀ (μM)
450059	11	41	64	78	2,1
450061	13	29	49	60	4,4
450074	15	27	40	61	5,4

Ejemplo 6: Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en células HepG2

5 Los gapmeros del ejemplo 5 que exhiben inhibición significativa *in vitro* del ARNm del GCGR se analizaron a diversas dosis en células HepB2. Las células se sembraron a una densidad de 40.000 células por pocillo y se transfectoron mediante electroporación con concentraciones de oligonucleótido antisentido de 0,12 μM , 0,37 μM , 1,11 μM , 3,33 μM y 10,00 μM como se especifica en la Tabla 6. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, el ARN aislado de las células y los niveles de ARNm del GCGR se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador DE GCGR humano RTS1508 se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de GCGR se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición de GCGR respecto a las células control sin tratar.

15 La concentración inhibitoria semimáxima (CI₅₀) de cada oligonucleótido se presenta también en la Tabla 6. Como se ilustra en la Tabla 6, los niveles de ARNm de GCGR se redujeron significativamente de una manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

Tabla 6

Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en células HepG2 usando electroporación

20

ISIS No	0,12 μM	0,37 μM	1,11 μM	3,33 μM	10,00 μM	CI ₅₀ (μM)
315163	0	3	26	62	88	2,2
398457	47	81	94	97	97	<0,1
449760	0	26	64	91	97	0,8
449797	0	16	42	84	95	1,2
449819	0	17	40	79	93	1,3
449851	4	28	65	94	97	0,7
449859	36	51	89	95	95	0,2
449860	30	53	77	86	94	0,3
449882	0	19	57	85	97	1,0
449883	7	49	84	92	96	0,5
449884	67	87	95	94	97	<0,1
449885	44	83	77	97	95	<0,1
449894	1	34	78	87	98	0,7
449895	0	31	29	84	95	1,1
449906	12	26	67	93	95	0,7

Ejemplo 7: Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en células HepG2

25 Los gapmeros del ejemplo 5 que exhiben inhibición significativa *in vitro* del ARNm del GCGR se seleccionaron analizaron adicionalmente a diversas dosis en células HepB2. Las células se sembraron a una densidad de 40.000 células por pocillo y se transfectoron mediante electroporación con concentraciones de oligonucleótido antisentido de 0,04 μM , 0,12 μM , 0,37 μM , 1,11 μM , 3,33 μM y 10,00 μM como se especifica en la Tabla 7. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, el ARN aislado de las células y los niveles de ARNm del GCGR se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador DE GCGR humano RTS1508 se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de GCGR se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición de GCGR respecto a las células control sin tratar.

35 La concentración inhibitoria semimáxima (CI₅₀) de cada oligonucleótido se presenta también en la Tabla 7. Los niveles de ARNm de GCGR se redujeron significativamente de una manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótidos antisentido. 'n/a' indica que no hay datos para el oligonucleótido ISIS para dicha

concentración en particular. ISIS 398457, ISIS 449884 e ISIS 449954, que causaron una reducción significativa de los niveles de ARNm de GCGR, se seleccionaron para estudios adicionales. Significativamente, ISIS 449884 demostró una CI_{50} de diez a cincuenta veces más baja que el ISIS 315163 de referencia en estudios comparativos presentados en los ejemplos 5-7.

5

Tabla 7

Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en células HepG2 usando electroporación

ISIS No	0,04 μ M	0,12 μ M	0,37 μ M	1,11 μ M	3,33 μ M	10,00 μ M	CI_{50} (μ M)
315163	22	9	22	45	67	93	1,5
398457	36	62	88	99	99	100	0,1
449856	8	24	49	73	92	95	0,4
449858	28	27	41	80	93	97	0,3
449859	16	40	72	89	97	98	0,2
449860	32	38	46	78	94	98	0,2
449883	25	27	68	92	98	100	0,2
449884	42	59	93	99	100	n/a	<0,04
449885	18	60	84	97	98	n/a	0,1
449894	8	31	44	83	96	99	0,3
449951	0	32	62	86	98	99	0,4
449954	9	40	57	86	99	99	0,2

10 **Ejemplo 8: Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en hepatocitos primarios de mono cinomolgo**

Los gapmeros de los estudios descritos en los Ejemplos 1-7 se analizaron adicionalmente a varias dosis en hepatocitos primarios de cinomolgo. Las células se sembraron a una densidad de 35.000 células por pocillo y se transfectoron usando electroporación con concentraciones de 750 nM, 1.500 nM, 3.000 nM, 6.000 nM y 12.000 del oligonucleótido antisentido, como se especifica en la Tabla 8. Tras un periodo de tratamiento de aproximadamente 16 horas, el ARN se aisló de las células y los niveles de ARNm de GCGR se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador DE GCGR humano RTS1508 se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de GCGR se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición de GCGR respecto a las células control sin tratar. Como se ilustra en la Tabla 8, los niveles de ARNm del GCGR se redujeron significativamente en células tratadas con oligonucleótidos antisentido

15

20

Tabla 8

25 Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en hepatocitos primarios de mono cinomolgo usando electroporación

N° ISIS	750,0 nM	1500,0 nM	3000,0 nM	6000,0 nM	12000,0 nM
398457	85	89	92	89	85
398471	78	85	87	85	87
436140	81	93	96	97	96
448754	44	59	80	80	81
448766	79	90	88	87	83
448818	19	13	58	64	76
449884	89	92	89	87	90
459014	51	63	79	82	84
459032	78	85	88	88	87
459040	70	77	81	89	83
459046	34	38	65	61	80
459076	31	39	67	79	77

459157	89	87	88	88	86
--------	----	----	----	----	----

Ejemplo 9: Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en hepatocitos primarios de mono cinomolgo

5 Los gapmeros del ejemplo 8 que exhiben inhibición significativa *in vitro* del GCGR humano se seleccionaron y analizaron adicionalmente a diversas dosis en hepatocitos primarios de cinomolgo. También se analizó ISIS 325568 (GCACTTTGTGGTGCCAAGGC (SEQ ID NO:4), el sitio de iniciación diana 548 en la SEQ ID NO:1), que se describió en una publicación anterior (BIOL066USL). Las células se sembraron a una densidad de 35.000 células por pocillo y se transfectoron mediante electroporación con concentraciones de oligonucleótido antisentido de 0,006
10 μM , 0,020 μM , 0,063 μM , 0,200 μM , 0,632 μM , 2,000 μM , 6,325 μM , y 20,000 μM como se especifica en la Tabla 9. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, el ARN aislado de las células y los niveles de ARNm del GCGR se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador DE GCGR humano RTS 1508 se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de GCGR se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en forma del
15 porcentaje de inhibición de GCGR respecto a las células control sin tratar.

La concentración inhibitoria semimáxima (CI_{50}) de cada oligonucleótido se presenta también en la Tabla 9. Los niveles de ARNm de GCGR se redujeron significativamente de una manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótidos antisentido.

20

Tabla 9

Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en hepatocitos primarios de mono cinomolgo usando electroporación

N° ISIS	0,006 μM	0,020 μM	0,063 μM	0,200 μM	0,632 μM	2.000 μM	6.325 μM	20.000 μM	CI_{50} (μM)
325568	0	0	0	0	0	42	75	93	3,1
398471	0	4	7	24	62	65	65	59	0,4
448766	5	0	0	2	28	51	57	34	0,6
449884	0	12	61	59	71	68	72	62	0,1
459014	1	0	2	23	15	47	69	74	2,6
459032	0	6	4	33	55	68	72	61	0,5
459157	0	12	29	69	69	72	73	62	0,1

25

En base a los datos de inhibición, se seleccionaron ISIS 398471, ISIS 448766, ISIS 449884, ISIS 459014, ISIS 459032 e ISIS 459157 para las pruebas *in vivo* en un modelo de ratón.

Ejemplo 10: Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en células HepG2

Los gapmeros de los estudios descritos en los Ejemplos 1, 4 y 9 se analizaron adicionalmente a varias dosis en células HepG2. Las células se sembraron a una densidad de 40.000 células por pocillo y se transfectoron mediante electroporación con concentraciones de oligonucleótido antisentido de 0,12 μM , 0,37 μM , 1,11 μM , 3,33 μM y 10,00
35 μM como se especifica en la Tabla 10. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, el ARN aislado de las células y los niveles de ARNm del GCGR se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador DE GCGR humano RTS1508 se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de GCGR se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición de GCGR respecto a las células control sin tratar.
40 Como se ilustra en la Tabla 10, los niveles de ARNm del GCGR se redujeron significativamente en células tratadas con oligonucleótidos antisentido

Tabla 10

Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en células HepG2 usando electroporación

45

N° ISIS	0,12 μM	0,37 μM	1,11 μM	3,33 μM	10,00 μM	CI_{50} (μM)
398455	35	57	81	94	94	0,2
398457	33	79	91	97	98	0,1
398470	37	48	86	92	96	0,2
398471	33	50	86	92	87	0,2

398486	50	47	85	91	98	0,1
398491	25	61	73	96	92	0,3
398501	35	43	85	98	98	0,3
398503	21	58	80	97	99	0,3
398504	51	57	91	92	98	0,1
398506	40	71	96	98	99	0,1
398507	59	85	97	98	n/a	<0,1
398508	22	48	90	94	98	0,3
398585	25	57	84	88	93	0,3
436034	34	56	61	81	92	0,3

En base a los resultados de inhibición, se seleccionaron ISIS 398457, ISIS 398471, ISIS 398486, ISIS 398491, ISIS 398506, ISIS 398507, ISIS 398508 e ISIS 436034 para analizar en un modelo de ratón.

5

Ejemplo 11: Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en células HepG2

Los gapmeros del estudio descrito en el Ejemplo 4 se analizaron adicionalmente a varias dosis en células HepG2. Las células se sembraron a una densidad de 40.000 células por pocillo y se transfectaron mediante electroporación con concentraciones de oligonucleótido antisentido de 0,04 μM , 0,12 μM , 0,37 μM , 1,11 μM , 3,33 μM y 10,00 μM como se especifica en la Tabla 11. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, el ARN aislado de las células y los niveles de ARNm del GCGR se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador DE GCGR humano RTS1508 se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de GCGR se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición de GCGR respecto a las células control sin tratar. Los niveles de ARNm de GCGR se redujeron significativamente en las células tratadas con oligonucleótido antisentido.

10

15

Tabla 11

Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en células HepG2 usando electroporación

20

N° ISIS	0,04 μM	0,12 μM	0,37 μM	1,11 μM	3,33 μM	10,00 μM	CI ₅₀ (μM)
304535	21	31	55	90	99	96	0,2
304538	27	42	73	91	100	95	0,1
304539	15	33	56	87	95	93	0,3
436140	4	27	57	85	94	95	0,3
436141	19	27	64	84	92	95	0,3
436164	12	37	75	94	94	96	0,2

En base a los resultados de la inhibición, se seleccionaron ISIS 304538, ISIS 304539, ISIS 436140 e ISIS 436141 para analizar en un modelo de ratón.

25

Ejemplo 12: Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en células HepG2

Los gapmeros del estudio descritos en los Ejemplos 1, 3, 8 y 9 se analizaron adicionalmente a varias dosis en células HepG2. Las células se sembraron a una densidad de 40.000 células por pocillo y se transfectaron mediante electroporación con concentraciones de oligonucleótido antisentido de 0,12 μM , 0,37 μM , 1,11 μM , 3,33 μM y 10,00 μM como se especifica en la Tabla 12. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, el ARN aislado de las células y los niveles de ARNm del GCGR se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador DE GCGR humano RTS1508 se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de GCGR se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición de GCGR respecto a las células control sin tratar. Los niveles de ARNm de GCGR se redujeron significativamente en las células tratadas con oligonucleótido antisentido.

30

35

Tabla 12

Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en células HepG2 usando electroporación

Nº ISIS	0,12 µM	0,37 µM	1,11 µM	3,33 µM	10,00 µM	CI ₅₀ (µM)
448718	35	64	74	90	92	0,2
448730	44	67	87	94	85	0,1
448738	31	52	75	95	97	0,3
448754	40	47	81	95	96	0,3
448762	43	62	75	96	97	0,2
448766	36	59	88	94	85	0,2
448799	42	53	92	96	99	0,2
448802	43	70	88	97	93	0,1
448806	39	60	82	97	96	0,2
448817	35	62	95	88	92	0,2
448818	29	52	74	97	98	0,3
448819	73	89	97	n/a	93	<0,1
448840	31	58	80	83	98	0,3
448848	71	92	98	98	99	<0,1
448850	54	60	74	88	94	<0,1
448860	41	58	73	92	98	0,2
448890	49	60	83	94	99	0,1
448897	50	52	80	92	97	0,2
448901	29	58	81	91	99	0,3
448903	32	48	73	91	99	0,3
448905	43	49	76	89	97	0,2

5 En base a los resultados de inhibición, se ISIS 448718, ISIS 448730, ISIS 448754, ISIS 448766, ISIS 448817, ISIS 448818, ISIS 448819, ISIS 448848, ISIS 448860 e ISIS 448890 para analizar en un modelo de ratón.

Ejemplo 13: Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en células HepG2

10 Los gapmeros del estudio descritos en los Ejemplos 1, 2, 8 y 9 se analizaron adicionalmente a varias dosis en células HepG2. Las células se sembraron a una densidad de 40.000 células por pocillo y se transfectaron mediante electroporación con concentraciones de oligonucleótido antisentido de 0,12 µM, 0,37 µM, 1,11 µM, 3,33 µM y 10,00 µM como se especifica en la Tabla 13. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, el ARN aislado de las células y los niveles de ARNm del GCGR se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador DE GCGR humano RTS1508 se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de GCGR se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición de GCGR respecto a las células control sin tratar. Los niveles de ARNm de GCGR se redujeron significativamente en las células tratadas con oligonucleótido antisentido.

20

Tabla 13

Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en células HepG2 usando electroporación

Nº ISIS	0,12 µM	0,37 µM	1,11 µM	3,33 µM	10,00 µM	CI ₅₀ (µM)
398457	62	84	95	98	97	<0,1
459009	26	47	80	96	97	0,3
459010	56	90	96	98	97	<0,1
459011	46	81	97	95	96	<0,1
459024	29	56	74	89	95	0,3

459032	40	61	74	97	98	0,2
459040	48	65	84	96	95	0,1
459046	36	54	77	96	98	0,2
459058	21	46	88	95	98	0,3
459063	34	42	79	97	99	0,3
459076	32	72	84	98	99	0,1
459082	46	71	92	97	97	0,1
459083	53	71	90	96	97	<0,1
459086	24	72	92	96	97	0,2
459087	23	67	94	97	98	0,2
459088	34	61	86	95	98	0,2
459157	50	74	92	97	97	<0,1
459158	54	81	94	97	99	<0,1

En base a los resultados de la inhibición, se seleccionaron ISIS 459024, ISIS 459032, ISIS 459040, ISIS 459046, ISIS 459076, e ISIS 459157 para analizar en un modelo de ratón.

5 **Ejemplo 14: Tolerabilidad de oligonucleótidos antisentido dirigidos al GCGR humano en ratones CD1**

Los ratones CD1® (Charles River, MA) son un modelo de ratón multipropósito, frecuentemente utilizado para pruebas de seguridad y eficacia. Los ratones se trataron con oligonucleótidos antisentido ISIS seleccionados de los estudios descritos anteriormente y se evaluaron los cambios en los niveles de diversos marcadores de química plasmática.

Tratamiento

A grupos de ratones CD1 machos de seis semanas se inyectó por vía subcutánea dos veces por semana durante 6 semanas 50 mg/kg de ISIS 304538, ISIS 304539, ISIS 325568, ISIS 398457, ISIS 398471, ISIS 398486, ISIS 398491, ISIS 398506, ISIS 398507, ISIS 398508, ISIS 436034, ISIS 436140, ISIS 436141, ISIS 448718, ISIS 448730, ISIS 448754, ISIS 448766, ISIS 448817, ISIS 448818, ISIS 448819, ISIS 448848, ISIS 448860, ISIS 448890, ISIS 449884, ISIS 449954, ISIS 449956, ISIS 459014, ISIS 459024, ISIS 459032, ISIS 459040, ISIS 459046, ISIS 459076 e ISIS 459157. Se inyectó a un grupo de ratones CD1 macho de seis semanas de edad por vía subcutánea dos veces a la semana durante 6 semanas con PBS. Se sacrificó a los ratones 48 horas después de la última dosis, y los órganos y el plasma se recogieron para un análisis posterior. *Marcadores de química plasmática*

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática y renal, se midieron los niveles plasmáticos de transaminasas, bilirrubina, albúmina y BUN usando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 14. Los oligonucleótidos ISIS que causaron cambios en los niveles de cualquiera de los marcadores de función hepática o renal fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron en estudios posteriores.

Tabla 14

30 Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en marcadores de química plasmática en plasma de ratones CD 1 en la semana 6

	ALT (UI/l)	AST (UI/l)	Bilirrubina (mg/dl)	Albúmina (mg/dl)	BUN (mg/dl)
PBS	26	37	0,20	3,2	24
ISIS 304538	71	93	0,18	3,4	24
ISIS 304539	151	126	0,21	3,4	22
ISIS 325568	47	67	0,20	3,1	18
ISIS 398457	26	45	0,28	3,6	25
ISIS 398471	33	46	0,21	3,6	28
ISIS 398486	447	381	0,22	3,5	28

	ALT (UI/l)	AST (UI/l)	Bilirrubina (mg/dl)	Albúmina (mg/dl)	BUN (mg/dl)
ISIS 398491	56	54	0,20	3,3	28
ISIS 398506	884	823	0,35	3,4	25
ISIS 398507	2381	895	0,28	3,9	24
ISIS 398508	643	227	0,20	3,4	25
ISIS 436034	1481	696	0,38	3,4	23
ISIS 436140	40	62	0,20	3,0	25
ISIS 436141	232	163	0,20	3,3	21
ISIS 448718	378	221	0,20	2,9	25
ISIS 448730	852	398	1,40	3,5	27
ISIS 448754	71	84	0,20	3,4	28
ISIS 448766	47	46	0,26	3,5	23
ISIS 448817	211	144	0,25	3,6	24
ISIS 448818	33	52	0,17	3,1	23
ISIS 448819	196	188	0,25	3,5	23
ISIS 448848	1677	855	0,61	3,1	17
ISIS 448860	951	536	0,22	3,3	20
ISIS 448890	402	345	0,17	3,0	18
ISIS 449884	38	51	0,23	3,5	23
ISIS 449954	1465	1229	0,28	3,7	23
ISIS 449956	55	63	0,17	2,9	21
ISIS 459014	27	50	0,17	3,2	22
ISIS 459024	52	54	0,23	3,3	22
ISIS 459032	50	55	0,22	3,2	21
ISIS 459040	37	70	0,14	3,1	22
ISIS 459046	41	81	0,19	3,0	20
ISIS 459076	33	50	0,21	3,0	22
ISIS 459157	25	43	0,21	3,2	21

Ejemplo 15: Tolerabilidad de oligonucleótidos antisentido dirigidos al GCGR humano en ratas Sprague-Dawley

- 5 Las ratas Sprague-Dawley son un modelo multipropósito utilizado para evaluaciones de seguridad y eficacia. Se trató a las ratas con oligonucleótidos antisentido ISIS seleccionados el estudio descrito en el ejemplo 14 y se evaluaron los cambios en los niveles de diversos marcadores de química plasmática.

Tratamiento

- 10 Se mantuvieron las ratas macho Sprague-Dawley de siete semanas de edad en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se alimentaron *ad libitum* con pienso normal para ratas Purina, dieta 5001. A grupos de cuatro ratas Sprague-Dawley se inyectó por vía subcutánea dos veces a la semana durante 4 semanas con 50 mg/kg de ISIS
- 15 304538, ISIS 304539, ISIS 325568, ISIS 398457, ISIS 398471, ISIS 398486, ISIS 398491, ISIS 398506, ISIS 398507, ISIS 398508, ISIS 436034, ISIS 436140, ISIS 436141, ISIS 448718, ISIS 448730, ISIS 448754, ISIS 448766, ISIS 448817, ISIS 448818, ISIS 448819, ISIS 448848, ISIS 448860, ISIS 448890, ISIS 449884, ISIS 449954, ISIS 449956, ISIS 459014, ISIS 459024, ISIS 459032, ISIS 459040, ISIS 459046, ISIS 459076 e ISIS 459157. Cuarenta y ocho horas después de la última dosis, se sacrificó a las ratas y se extrajeron los órganos y el plasma para su posterior análisis.

20

Función hepática

5 Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron los niveles plasmáticos de transaminasas, usando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron los niveles plasmáticos de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) y los resultados se presentan en la Tabla 16 expresados en UI/l. Los niveles plasmáticos de bilirrubina también se midieron usando el mismo analizador de química clínica y los resultados también se presentan en la Tabla 16. ALT y AST también se expresaron como aumento de veces sobre el control de PBS y se presentan en la Tabla 17. Los oligonucleótidos ISIS que causaron cambios en los niveles de cualquier marcador de función hepática fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron en estudios posteriores.

10

Tabla 16
Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre la función hepática en ratas Sprague-Dawley

	ALT (UI/l)	AST (UI/l)	Bilirrubina (mg/dl)
PBS	49	74	0,13
ISIS 304538	127	206	0,17
ISIS 304539	48	70	0,10
ISIS 325568	66	89	0,13
ISIS 398457	59	98	0,10
ISIS 398471	57	78	0,10
ISIS 398486	778	734	0,28
ISIS 398491	121	211	0,13
ISIS 398506	236	287	0,57
ISIS 398507	424	231	0,25
ISIS 398508	305	302	0,31
ISIS 436034	338	385	0,30
ISIS 436140	58	92	0,13
ISIS 436141	55	108	0,15
ISIS 448718	99	115	0,13
ISIS 448730	92	110	0,13
ISIS 448754	131	79	0,10
ISIS 448766	70	102	0,10
ISIS 448817	102	169	0,16
ISIS 448818	92	188	0,19
ISIS 448819	261	211	0,11
ISIS 448848	105	125	0,14
ISIS 448860	203	248	0,79
ISIS 448890	224	204	0,22
ISIS 449884	134	121	0,15
ISIS 449954	548	706	1,19
ISIS 449956	100	133	0,21
ISIS 459014	64	138	0,16
ISIS 459024	150	182	2,38
ISIS 459032	109	109	0,11
ISIS 459040	67	95	0,11
ISIS 459046	60	127	0,09

ISIS 459076	57	114	0,14
ISIS 459157	52	85	0,15

Tabla 17

Aumento sobre el control de PBS de ALT y AST en grupos de tratamiento de ratas Sprague–Dawley

NO. ISIS	ALT	AST
304538	4,1	3,6
304539	0,8	0,8
325568	1,2	1,4
398457	0,9	1,1
398471	0,9	0,9
398486	12,2	8,3
398491	1,9	2,4
398506	7,6	5,0
398507	13,6	4,0
398508	9,8	5,3
436034	10,8	6,7
436140	1,9	1,6
436141	1,8	1,9
448718	3,2	2,0
448730	1,4	1,2
448754	2,1	0,9
448766	1,1	1,2
448817	2,0	2,4
448818	1,9	2,4
448819	5,0	3,0
448848	2,0	1,8
448860	4,1	3,2
448890	4,5	2,6
449884	2,6	1,7
449954	11,1	9,0
449956	2,0	1,7
459014	1,3	1,8
459024	3,1	2,3
459032	2,1	1,6
459040	1,3	1,4
459046	1,1	1,8
459076	1,2	1,5
459157	1,0	1,2

5

Función renal

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron los niveles plasmáticos de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina, usando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 18, expresados en mg/dl.

10

Tabla 18
Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores de función renal (mg/dl) en ratas Sprague-Dawley

	BUN (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)
PBS	16	0,27
ISIS 304538	18	0,35
ISIS 304539	21	0,32
ISIS 325568	15	0,31
ISIS 398457	18	0,32
ISIS 398471	19	0,33
ISIS 398486	20	0,34
ISIS 398491	21	0,32
ISIS 398506	18	0,44
ISIS 398507	16	0,33
ISIS 398508	18	0,41
ISIS 436034	17	0,33
ISIS 436140	16	0,42
ISIS 436141	25	0,42
ISIS 448718	17	0,4
ISIS 448730	21	0,35
ISIS 448754	23	0,36
ISIS 448766	21	0,35
ISIS 448817	17	0,33
ISIS 448818	20	0,52
ISIS 448819	16	0,31
ISIS 448848	19	0,34
ISIS 448860	25	0,38
ISIS 448890	19	0,39
ISIS 449884	16	0,34
ISIS 449954	19	0,45
ISIS 449956	30	0,52
ISIS 459014	20	0,45
ISIS 459024	25	0,59
ISIS 459032	13	0,22
ISIS 459040	21	0,33
ISIS 459046	19	0,3
ISIS 459076	21	0,39
ISIS 459157	17	0,31

5

Ejemplo 16: Tolerabilidad de oligonucleótidos antisentido dirigidos al GCGR humano en ratas CD/IGS

Las ratas CD/IGS son un modelo multipropósito utilizado para evaluaciones de seguridad y eficacia. Se trató a las ratas con oligonucleótidos antisentido ISIS seleccionados el estudio descrito en los ejemplos 14 y 15 y se evaluaron los cambios en los niveles de diversos marcadores de química plasmática.

10

Tratamiento

Se mantuvieron ratas CD/IGS macho de diez y doce semanas de edad en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se alimentaron *ad libitum* con pienso normal para ratas Purina, dieta 5001. A grupos de cuatro ratas CD/IGS se inyectó por vía subcutánea dos veces a la semana durante 13 semanas 30 mg/kg de ISIS 325568, ISIS 398471, ISIS 436140, ISIS 448766, ISIS 449884, ISIS 459014, ISIS 459032, ISIS 459040 e ISIS 459157. Se extrajeron muestras de sangre a varios puntos de tiempo. Cuarenta y ocho horas después de la última dosis, se tomaron los pesos corporales, se sacrificó a las ratas y se extrajeron los órganos y el plasma para su posterior análisis.

10 *Pesos de los órganos*

Se midieron los pesos del hígado, corazón, pulmones, bazo y riñón al final del estudio, y se presentan en la Tabla 19. Los oligonucleótidos ISIS que causaron cualquier cambio en el peso de los órganos fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de estudios posteriores.

15

Tabla 19

Peso de los órganos de ratas CD/IGS después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en la semana 13 expresado en gramos (g)

	Corazón	Hígado	Pulmón	Bazo	Riñón
PBS	1,8	21,3	1,9	1,0	4,1
ISIS 325568	1,3	16,9	2,6	2,1	3,6
ISIS 398471	1,6	19,8	2,1	1,6	3,3
ISIS 436140	1,4	22,7	2,4	2,4	4,9
ISIS 448766	1,5	22,6	2,2	2,3	3,4
ISIS 449884	1,6	19,0	2,0	1,3	3,3
ISIS 459014	1,6	16,4	1,9	1,0	3,2
ISIS 459032	1,6	33,3	2,8	6,1	4,0
ISIS 459040	1,5	18,7	2,7	2,3	4,5
ISIS 459157	1,4	19,4	2,1	1,5	3,3

20

Función hepática

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron los niveles de diversos marcadores de química plasmática en la semana 8,5 (día 57) y la semana 13 (día 90) usando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron los niveles plasmáticos de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) y los resultados se presentan en las Tabla 20 y 21 expresados en UI/l. Los niveles plasmáticos de bilirrubina y BUN también se midieron usando el mismo analizador de química clínica y los resultados también se presentan en las Tablas 20 y 21. Los oligonucleótidos ISIS que causaron cambios en los niveles de cualquier marcador de función hepática fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron en estudios posteriores.

30

Tabla 20

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores de función hepática en ratas CD/IGS el día 57

35

	ALT UI/l	AST UI/l	Bilirrubina mg/dl	BUN mg/dl
Solución salina	28	48	0,12	12,7
325568	38	59	0,09	16,7
398471	29	49	0,10	10,4
436140	28	45	0,08	11,0
448766	31	64	0,08	13,2
449884	45	55	0,11	12,1
459014	27	44	0,13	23,2
459032	98	172	0,23	14,6

459040	25	43	0,08	14,1
459157	26	48	0,09	15,8

Tabla 21

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores de función hepática en ratas CD/IGS el día 80

5

	ALT	AST	Bilirrubina	BUN
PBS	47	71	0,22	17,9
ISIS 325568	57	102	0,15	19,6
ISIS 398471	59	88	0,18	18,8
ISIS 436140	43	70	0,19	23,3
ISIS 448766	77	168	0,18	22,3
ISIS 449884	95	105	0,23	20,1
ISIS 459014	58	108	0,26	21,4
ISIS 459032	221	422	0,53	18,3
ISIS 459040	56	98	0,16	14,1
ISIS 459157	67	138	0,34	19,4

Función renal

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos de ISIS sobre la función renal, se midieron los niveles de proteínas totales en orina y de creatinina en la orina, y se evaluó la relación entre la proteína total de la orina y la creatinina. Los resultados se presentan en la tabla 22.

10

Tabla 22

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre la proporción proteína/creatinina en la orina en el riñón de ratas CD/IGS

15

	pre-dosis	Semana 8	Semana 12
PBS	1,1	0,7	0,7
ISIS 325568	1,1	3,6	5,2
ISIS 398471	0,8	4,4	4,6
ISIS 436140	1,1	5,4	15,6
ISIS 448766	0,9	5,4	7,0
ISIS 449884	0,9	3,2	3,7
ISIS 459014	1,0	3,6	3,3
ISIS 459032	1,0	4,5	6,0
ISIS 459040	0,8	4,8	5,6
ISIS 459157	1,2	3,3	4,1

Ejemplo 17: Determinación de la viscosidad de los oligonucleótidos antisentido ISIS dirigidos al GCGR humano

20

La viscosidad de los oligonucleótidos antisentido seleccionados del estudio descrito en el Ejemplo 16 se midió con el objetivo de seleccionar oligonucleótidos antisentido que tienen una viscosidad superior a 40 cP. Los oligonucleótidos que tienen una viscosidad superior a 40 cP serían demasiado viscosos para ser administrados a cualquier sujeto.

25

Se pesaron los oligonucleótidos ISIS (32 - 35 mg) en un vial de vidrio, se añadieron 120 µl de agua y el oligonucleótido antisentido se disolvió en solución calentando el vial a 50 °C. Parte de (75 µl) la muestra precalentada se pipeteó a un micro-viscosímetro (Cambridge). La temperatura del microcomponedor se ajustó a 25 °C y se midió la viscosidad de la muestra. Otra parte (20 µl) de la muestra precalentada se pipeteó en 10 ml de agua para lectura de UV a 260 nM a 85 °C (instrumento Cary UV). Los resultados se presentan en la Tabla 23 e indican

que todas las soluciones de oligonucleótidos antisentido son óptimas en su viscosidad según el criterio indicado anteriormente.

Tabla 23

Viscosidad y concentración de los oligonucleótidos antisentido ISIS dirigidos al GCGR humano

N.º ISIS	Motivo	Viscosidad (cP)	Concentración (mg/ml)
398471	5-10-5	27	173
436140	5-10-5	6	162
448766	5-10-5	4	142
449884	3-10-4	4	145
459014	3-10-4	9	167
459032	3-10-4	7	154
459040	3-10-4	11	157
459157	5-10-6	5	144

Ejemplo 18: Farmacocinética del oligonucleótido antisentido en hígado de ratón CD1

Se trató a los ratones CD1 con ISIS 449884 y se evaluó la semivida de los oligonucleótidos, así como el tiempo transcurrido para la degradación y eliminación del oligonucleótido del hígado.

Tratamiento

Se inyectó a un grupo de diez ratones CD1 por vía subcutánea dos veces a la semana durante 2 semanas con 50 mg/kg de ISIS 449884. Se sacrificó a grupos de cinco ratones cada uno 3 días y 56 días después de la dosis final. Se extrajeron los hígados para su análisis.

Determinación de la concentración de oligonucleótidos

Se midió la concentración del oligonucleótido de longitud completa así como la concentración total de oligonucleótidos (incluida la forma degradada). El procedimiento utilizado es una modificación de procedimientos previamente publicados (Leeds y col., 1996; Geary y col., 1999) que consisten en una extracción en fenol-cloroformo (líquido-líquido), seguido de una extracción en fase sólida. Se añadió un patrón interno (ISIS 355868, un oligonucleótido de fosforotioato modificado con 2'-O-metoxietilo 27-mer, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTT, designado aquí como SEQ ID NO: 119) antes de la extracción. Las concentraciones de la muestra de tejido se calcularon usando curvas de calibración, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de aproximadamente 1,14 µg/g. Las semividas se calcularon después utilizando el software WinNonlin (PHARSIGHT).

Los resultados se presentan en la Tabla 24, expresados como µg/g de tejido hepático. La semivida de ISIS 449884 se calculó como 15,1 días.

Tabla 24

Concentración de oligonucleótidos de ISIS 449884 en el hígado de ratones CD1

	Concentración de la longitud completa (µg/g)
Día 3	118,7
Día 56	10,9

Ejemplo 19: Efecto de oligonucleótidos antisentido de ISIS sobre el GCGR humano en monos cinomolgos

Los monos cinomolgos se trataron con oligonucleótidos antisentido ISIS seleccionados de los estudios descritos en los Ejemplos 14-18. Se evaluaron la eficacia y tolerabilidad de los oligonucleótidos antisentido, así como su perfil farmacocinético en el hígado y el riñón. Los oligonucleótidos antisentido humanos analizados también tienen reactividad cruzada con la secuencia genómica de rhesus (designada aquí como SEQ ID NO: 3). Cuanto mayor es la complementariedad entre el oligonucleótido humano y la secuencia del mono rhesus, más probable es que el oligonucleótido humano pueda reaccionar de forma cruzada con la secuencia del mono rhesus. Los sitios de iniciación y terminación de cada oligonucleótido para la SEQ ID NO: 3 se presentan en la Tabla 25. El "sitio de iniciación" indica el nucleótido más 5' al que se dirige el gapmero en la secuencia génica del mono rhesus,

Tabla 25
Oligonucleótidos antisentido complementarios de la SEQ ID NO: 3

Sitio de iniciación	Secuencia	NO. ISIS	Motivo	SEQ ID NO
1495	TCCACAGGCCACAGGTGGGC	398471	5-10-5	17
8857	CTCTTTATTGTTGGAGGACA	436140	5-10-5	102
3196	GCAAGGCTCGGTTGGGCTTC	448766	5-10-5	31
639	GGTTCCCGAGGTGCCCA	449884	3-10-4	11
666				
716				
744				
799				
826				
4131	GGGCAATGCAGTCCTGG	459014	3-10-4	80
1142	GAAGGTGACACCAGCCT	459032	3-10-4	81
1506	GCTCAGCATCCACAGGC	459040	3-10-4	82
636	GGGTTCCCGAGGTGCCCAATG	459157	5-10-6	85
663				
713				
741				
796				
823				

5

Tratamiento

Antes del estudio, se mantuvo a los monos en cuarentena durante un período de 5 semanas, durante el cual los animales fueron observados diariamente para vigilar la salud general. Los monos tenían 2-3 años y pesaban entre 2 y 5 kg. A cada uno de nueve grupos de cinco monos cinomolgos macho asignados al azar se inyectó subcutáneamente el oligonucleótido ISIS o PBS utilizando una aguja dosificadora de acero inoxidable y una jeringa de tamaño apropiado en la región intracapsular y el muslo externo de los monos. Los monos recibieron la dosis cuatro veces a la semana durante la primera semana (días 1, 3, 5 y 7) como dosis de carga, y, posteriormente, una vez a la semana durante semanas 2-13, con 40 mg/kg de ISIS 325568, ISIS 398471, ISIS 436140, ISIS 448766, ISIS 449884, ISIS 459014, ISIS 459032, ISIS 459040, o ISIS 459157. Se inyectó un grupo de control de 8 monos cinomolgos con PBS por vía subcutánea tres veces por semana durante la primera semana (días 1, 3, 5), y 7), y posteriormente una vez por semana durante semanas 2-13.

Durante el período de estudio, se observó a los monos dos veces al día en busca de signos de enfermedad o angustia. Cualquier animal que experimente más que un dolor momentáneo o leve o angustia debido al tratamiento, lesión o enfermedad fue tratado por el personal veterinario con analgésicos o agentes aprobados para aliviar el dolor después de consultar con el Director del estudio. Cualquier animal con mala salud o en una posible condición moribunda se identificó para un seguimiento adicional y posible eutanasia. Por ejemplo, un animal del grupo tratado con ISIS 436140 se sacrificó el día 86, y un animal del grupo tratado con ISIS 459040 se sacrificó el día 71. La eutanasia programada de los animales se realizó el día 93 mediante exanguinación después de administración de ketamina/xilazina como anestesia inducida y administración de pentobarbital sódico. Los protocolos descritos en el Ejemplo fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC).

Reducción de la diana hepática

30

Análisis de ARN

El día 93, se extrajo el ARN del tejido hepático para el análisis PCR en tiempo real del GCGR usando el conjunto de sonda de cebador humano RTS1508. Los análisis también se realizaron usando el conjunto de sonda de cebador de mono rhesus humano RTS1479 (secuencia directa ATCTCCTGCCCTGGTACCT, designada en el presente documento como SEQ ID NO: 120; secuencia inversa GGTCACGCACCCACTGA, incorporada en el presente

35

documento como SEQ ID NO: 121; secuencia de la sonda ACCGCTTCGTGTTCAAGAGATGCG, designada en el presente documento como SEQ ID NO: 122). Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición del ARNm de GCGR, en relación con el control de PBS, normalizado para el gen de mantenimiento, ciclofilina. Se obtuvieron resultados similares en la normalización con RIBOGREEN®. Como se muestra en la Tabla 26, el tratamiento con los oligonucleótidos antisentido ISIS dio como resultado una reducción significativa del ARNm del GCGR 1 en comparación con el control con PBS. Específicamente, el tratamiento con ISIS 449884 dio como resultado la reducción más significativa de la expresión de ARNm de GCGR.

Tabla 26

10 Porcentaje de inhibición del ARNm del GCGR en el hígado de monos cinomolgos en relación con el control de PBS

NO. ISIS	RTS1508/Ribogreen	RTS1479/Ribogreen	RTS1508/Ciclofilina	RTS1479/Ciclofilina
325568	59	49	68	59
398471	27	16	39	30
448766	49	37	55	42
449884	78	75	79	75
459014	25	21	39	32
459157	63	62	72	69

Análisis de los niveles de glucagón

15 Los niveles de glucagón en plasma se midieron antes de la dosificación, y en las semanas 3, 6, 7 y 10 del tratamiento. Dado que los niveles de glucagón cambian en función del nivel de estrés en los animales, se sedó a los monos con ketamina administrada por inyección intramuscular antes de la obtención de muestras sangre. Los animales ayunaron durante la noche antes de la extracción de sangre. Los animales se dejaron en ayunas durante la noche previa a la cirugía. Se extrajeron aproximadamente 1,8–2,0 ml de sangre de la vena femoral y se introdujeron en tubos con K₂-EDTA que contenían 10 µl/ml del inhibidor de DPP-IV y 250 KIU/ml aprotinina. Los tubos se invirtieron para mezclar la sangre con las soluciones y luego se colocaron en agua helada. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3.000 g durante 15 minutos a 4-8 °C dentro de los 30 minutos de la obtención de sangre.

20 El aumento de los niveles de glucagón es una consecuencia de la inhibición de los niveles de GCGR. Los niveles de glucagón se midieron usando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 27, e indican que la inhibición de los niveles del receptor de glucagón por el tratamiento con oligonucleótidos antisentido da como resultado un aumento significativo en los niveles de glucagón en plasma. Específicamente, el tratamiento con ISIS 449884 dio como resultado un aumento dependiente del tiempo en los niveles de glucagón.

30

Tabla 27

Niveles de glucagón en el hígado de mono cinomolgo después del tratamiento antisentido (pg/ml)

	Pre-dosis	Semana 3	Semana 6	Semana 7	Semana 10
PBS	268	231	248	170	304
ISIS 325568	271	759	726	760	850
ISIS 398471	322	317	279	132	220
ISIS 448766	404	560	572	313	411
ISIS 449884	257	439	631	716	1018
ISIS 459014	348	281	245	122	180
ISIS 459157	369	471	486	538	828

35 Estudios de tolerabilidad

Determinaciones de los pesos corporales y de órganos

40 Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la salud general de los animales, se midieron los pesos corporales y de los órganos el día 93. Se midieron los pesos corporales y se presentan en la Tabla 28. Se midieron los pesos de los órganos y los datos se presentan también en la Tabla 28. Los resultados indican que el efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los pesos del cuerpo y de los órganos estaba dentro del intervalo

esperado para los oligonucleótidos antisentido. Específicamente, el tratamiento con ISIS 448994 fue bien tolerado en términos del peso corporal y de los órganos de los monos.

Tabla 28

5 Pesos finales del cuerpo y del órgano en el mono cinomolgo en relación con los niveles previos a la dosis

	Peso corporal (kg)	Bazo (g)	Riñón (g)	Hígado (g)
PBS	2,6	4	12	60
ISIS 325568	2,6	8	16	69
ISIS 398471	2,6	5	13	71
ISIS 436140	2,7	13	23	98
ISIS 448766	2,7	9	18	80
ISIS 449884	2,6	5	14	70
ISIS 459014	2,6	5	12	65
ISIS 459032	2,5	5	13	65
ISIS 459040	2,7	5	13	69
ISIS 459157	2,5	7	12	68

Función hepática

10 Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos de ISIS en la función hepática, se tomaron muestras de sangre de todos los grupos de estudio. Las muestras de sangre se recogieron mediante venopunción femoral el día 95, 48 horas después de la dosificación. Los monos se dejaron en ayunas durante la noche previa a extracción de sangre. La sangre fue recolectada en tubos que contenían anticoagulante K₂-EDTA, que se centrifugaron para obtener plasma. Los niveles de diversos marcadores de función hepática se midieron usando un analizador de química Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Japón). Se midieron los niveles plasmáticos de ALT y AST y los resultados se presentan en la Tabla 29, expresados en UI/l. La bilirrubina, un marcador de función hepática, se midió de manera similar y se presenta en la Tabla 29, expresado en mg/dl. Los resultados indican que los oligonucleótidos antisentido no tuvieron ningún efecto sobre la función hepática fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido. Específicamente, el tratamiento con ISIS 448994 fue bien tolerado en términos de la función hepática en monos.

15

20

Tabla 29

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los marcadores de función hepática en plasma de mono cinomolgo

25

	ALT (UI/l)	AST (UI/l)	Bilirrubina (mg/dl)
PBS	42	42	0,18
ISIS 325568	31	31	0,14
ISIS 398471	56	39	0,16
ISIS 448766	89	43	0,14
ISIS 449884	44	43	0,14
ISIS 459014	24	39	0,16
ISIS 459157	47	34	0,18

Función renal

30 Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos de ISIS en la función renal, se tomaron muestras de sangre de todos los grupos de estudio. Las muestras de sangre se recogieron mediante venopunción femoral el día 95, 48 horas después de la dosificación. Los monos se dejaron en ayunas durante la noche previa a extracción de sangre. La sangre fue recolectada en tubos que contenían anticoagulante K₂-EDTA, que se centrifugaron para obtener plasma. Los niveles de BUN y creatinina se midieron usando un analizador de química Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Japón). Los resultados se presentan en la Tabla 30, expresados en mg/dl.

35

Los datos de la química en plasma indican que la mayoría de los oligonucleótidos ISIS no tenían ningún efecto sobre la función renal fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido. Específicamente, el tratamiento con ISIS 449884 fue bien tolerado en términos de la función renal de los monos.

- 5 **Tabla 30**
Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los niveles de BUN plasmático y creatinina (mg/dl) en monos cinomolgos

	BUN	Creatinina
PBS	17	0,60
ISIS 325568	16	0,52
ISIS 398471	16	0,50
ISIS 448766	13	0,54
ISIS 449884	17	0,59
ISIS 459014	18	0,60
ISIS 459157	17	0,58

10 **Hematología**

Para evaluar cualquier efecto de los oligonucleótidos ISIS en monos cinomolgos sobre los parámetros hematológicos, se extrajeron muestras de sangre de aproximadamente 1,3 ml de sangre la semana 11 de cada uno de los animales de estudio disponibles en tubos que contenían K₂-EDTA. Las muestras se analizaron para determinar el recuento de glóbulos rojos (RBC), recuento de glóbulos blancos (WBC), recuentos de glóbulos blancos individuales, tales como el de monocitos, neutrófilos, linfocitos, así como para el recuento de plaquetas, el contenido de hemoglobina y el hematocrito, usando un analizador de hematología ADVIA120 (Bayer, EE. UU.). Los datos se presentan en las Tabla 31 y 32.

- 20 Los datos indican que los oligonucleótidos no causaron ningún cambio en los parámetros hematológicos fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido a esta dosis. Específicamente, el tratamiento con ISIS 448994 fue bien tolerado en términos de los parámetros hematológicos de los monos.

- 25 **Tabla 31**
Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre varias células sanguíneas en monos cinomolgos

	GR (x 10 ⁶ /μl)	Plaquetas (x 10 ³ /μl)	WBC (x 10 ³ /μl)	Neutrófilos (x 10 ³ /μl)	Linfocitos (x 10 ³ /μl)	Monocitos (x 10 ³ /μl)
PBS	5,4	499	11,5	5,8	5,2	0,28
ISIS 398471	5,4	568	9,1	2,9	5,8	0,21
ISIS 448766	4,9	422	8,6	4,1	3,9	0,34
ISIS 449884	5,2	415	10,0	4,4	5,1	0,25
ISIS 459014	5,1	433	9,8	4,6	4,7	0,26
ISIS 459157	5,3	357	8,0	3,8	3,8	0,26
ISIS 325568	5,1	376	11,7	5,2	5,7	0,55

- 30 **Tabla 32**
Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los parámetros hematológicos en monos cinomolgos

	Hemoglobina (g/dl)	HCT (%)
PBS	13,1	43
ISIS 398471	13,1	44
ISIS 448766	12,3	41
ISIS 449884	12,6	41
ISIS 459014	13,2	44

ES 2 673 721 T3

ISIS 459157	13,2	43
ISIS 325568	13,3	44

5 En general, los resultados del estudio indican que ISIS 449884 es el compuesto más potente y bien tolerado de los que se analizaron para inhibir el receptor de glucagón y es un candidato importante para el tratamiento de enfermedades metabólicas, tales como diabetes, obesidad, resistencia a la insulina y deficiencia de insulina.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc.
 Susan M. Freier
 Sanjay Bhanot

<120> MODULACIÓN ANTISENTIDO DE LA EXPRESIÓN DE GCGR

<130> BIOL0161WO

<150> 61/537.007
 <151> 2011-09-20

<160> 122

<170> FastSEQ para Windows Versión 4,0

<210> 1
 <211> 2051
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

agtttgacc gaccccgatc tggcagcgcc gcgaagacga gcggtcaccg gcgccccgacc 60
cgagcgcgcc cagaggacgg cggggagcca agccgacccc cgagcagcgc cgcgcgggacc 120
ctgaggctca gaggggcagc ttcaggggag gacaccccac tggccaggac gccccaggct 180
ctgctgctct gccactcagc tgcctcggga ggagcgtaca caccaccag gactgcattg 240
ccccagctgt gcagcccctg ccagatgtgg gaggcagcta gctgcccaga ggcatgcccc 300
cctgccagcc acagcgaccc ctgctgctgt tgetgctgct gctggcctgc cagccacagg 360
tcccctccgc tcaggtgatg gacttctctt ttgagaagtg gaagctctac ggtgaccagt 420
gtcaccacaa cctgagcctg ctgccccctc ccacggagct ggtgtgcaac agaaccttcg 480
acaagtattc ctgctggccg gacacccccg ccaataccac ggccaacatc tcctgcccct 540
ggtacctgcc ttggcaccac aaagtgaac accgcttctg gttcaagaga tgcggggccc 600
acggtcagtg ggtgctgga ccccgggggc agccttggcg tgatgcctcc cagtgccaga 660
tggatggcga ggagattgag gtccagaagg aggtggccaa gatgtacagc agcttccagg 720
tgatgtacac agtgggctac agcctgtccc tggggccct gctcctcgcc ttggccatcc 780
tggggggcct cagcaagctg cactgcaccc gcaatgccat ccacggaat ctggttgcgt 840
ccttcgtgct gaaagccagc tccgtgctgg tcattgatgg gctgctcagg acccgctaca 900
gccagaaaat tggcgacgac ctcagtgtca gcacctggct cagtgatgga gcggtggctg 960
gctgccgtgt ggccgcggtg tcatgcaat atggcatcgt ggccaactac tgctggctgc 1020
tggtaggagg cctgtacctg cacaacctgc tgggctggc caccctccc gagaggagct 1080
tcttcagcct ctacctgggc atcggtggg gtgcccccat gctgttogtc gtcccctggg 1140
cagtgggtcaa gtgtctgttc gagaacgtcc agtgctggac cagcaatgac aacatgggct 1200
tctgggtgat cctgcggttc cccgtcttcc tggccatcct gatcaacttc ttcactcttcg 1260
tccgcategt tcagctgctc gtggccaagc tgcgggcaag gcagatgcac cacacagact 1320
acaagttccg gctggccaag tccacgctga ccctcatccc tctgctgggc gtccacgaag 1380
tggctcttcg cttcgtgacg gacgagcacg cccagggcac cctgcgctcc gccaagctct 1440
tcttcgacct ctctcagc tcctccagc gcctgctggt ggtgtcctc tactgcttcc 1500
tcaacaagga ggtgcagtgc gagctgcccg ggcgttggca ccgctggccc ctgggcaag 1560
tgctatggga ggagcggaac accagcaacc acagggcctc atcttcgccc ggccacggcc 1620
ctcccagcaa ggagctgcag tttgggaggg gtggtggcag ccaggattca tctgcgggaga 1680
cccccttggc tgggtggcctc cctagattgg ctgagagccc cttctgaacc ctgctgggac 1740
cccagctagg gctggactct ggcaaccaga gggcgtcgct ggacaacca gaactggacg 1800
cccagctgag gctgggggag ggggagccaa cagcagcccc cacctacccc ccacccccag 1860
tgtggctgtc tgcgagattg ggcctcctc ccctgcacct gccttgtccc tgggtgcagag 1920
gtgagcagag gagtccaggg cgggagtggt ggctgtgccc tgaactgcgt gccagtgtcc 1980
ccacgtatgt cggcacgtcc catgtgcatg gaaatgtcct ccaacaataa agagctcaag 2040
tggtcaccgt g 2051
    
```

<210> 2
 <211> 20001
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(20001)
 <223> n = A,T,C o G

<400> 2

```

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 120
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 180
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 240
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 300
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 360
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 420
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 480
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 540
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 600
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 660
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 720
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 780
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 840
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 900
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 960
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nntacttgg ccctcctaatt tgggtgtctt 1020
cagtgaaaac gaggacactg ctaatatgct ttagaaaata gccctcacat tctccctgtt 1080
cccaatcccc cacttactct aagctcccca ggtagcaata attcagaagt caaattgctc 1140
agcactccta tggttcaagt gattcttgtg tctcagcctc ccaagtagct gggactacag 1200
gagcccacca ccacgcccag ttaatTTTTT tattTTTTTtag tagagatggg gtttcaccat 1260
gttgaccagg ctggtctcga actcctgacc tcaagtgatc cactggcctc ggcctccaaa 1320
agtgttggga ttacaggcgt gagccactgc gcccagcctc aaccttctag tgaaccctcc 1380
atgctctgtt atcttttatt cctcttggat ttttgttgtt tcttttcttt ttcttcttct 1440
ttttcttttc tttttttttt tttgagatgg agtttcatct ttgttgccca ggctggagtg 1500
caatggcaca accttggctc actgcaacct tcgcctcctg ggttcaagca atttgcctgc 1560
ctcagcctcc caagtagctg ggattacagg catgtgctac catgcctggc gaatTTTgta 1620
tttttagtag agacagggtt tctccgtgtt ggtcgggctg atctcaaaact cccgacctca 1680
ggtgatcagc ccgccttggc ctcccaaagt gctgagatta caggcatgag ccaccacacc 1740
cagcctTTTT gttgtttctt ctgagagatt tcttcaactc aatTTTccaa ccttctatt 1800
aaatTTTTta aattccagat attctatttg cagccggcaa ggactcttcc tgcctctga 1860
ttgttttcca aagcattccg ttctagtttt tatgggagca tcatcctttc atgtctctaa 1920
ggataatcag agtggttaaa atgttcttga agttttcttc tgttccctgc agtagctctg 1980
tttctccag tttctctttt cccaagtgat tgggtctgtct catataccta gaggtcttgc 2040
tttgattca catctaaagg caaaaggcgc taggatgcag tgcggagggtc cattcgcttt 2100
gtcgtaaggt ttgtgccttt cttagtcctg cagtggttga gtaaaacctg accatcccac 2160
acctcaaat actaagtgcc cctgggtagt gatgtggagg ggccttctta ttaatgtgag 2220
gaaatgcttg tgttataggt tgtggtgaga aacgctggtt acaaaactat atcaaagtaa 2280
aaatgtatta atgcacagta aagacacctg gaaaaaaaat gccctttaat gctcacagaa 2340
ggtctctccg aggggcagcc ccaccacct cctgTTTTcc ttctgcatt tccacgtttt 2400
tctgggcca gatgcagcct ccctcccac ccctggtccc tccgcttgg ctccggctg 2460
tcgctttcat ccctcctcct catcagcccc ttgcagaact ccagggtggg gcttctgagt 2520
ctcgctggca gtatgggctc cataagtctt gctggacacc gaaattaagt tctgcaggtg 2580
cogtctccag aatccccagc acagatagac aaaccacat ctcaggggtg gggggtgcag 2640
acctgcccc agnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 2700
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nntcccagc tgcctctgt 2760
ttatatgtct caccaatgtc aagggaacc agaactggat agcagttgaa acacatattt 2820
tgttcgggac tattgttaata ggggaaaaaa gatttttagta tagacctggg ctcaactctc 2880
aatgtggcac aggcaagtgg ggatttagat ctgaggagca gggcggggtc agtgggtgga 2940
aaattactgg cacgaaacac ctgtctggag gattctggct aaaccagga aacaggaagc 3000
ttgctgaggg caggcaggggt tagcagacat cgctggggg tggcggaggc tgagaacct 3060
accaggttaa aatgaagctt gctgacggca gacagggtta gcagacacgg cctggaggtg 3120
gcagaggcta aggaacctac ccaggtaaaa cgaagcttgc tgacggcaga caggggttagc 3180
agacacggcc tggaggtggc agaggctaag gaacctacca aggtaaaatg aagcttctgt 3240

```

ES 2 673 721 T3

aaggcagcca ggggtgagcag atattgcctg ggggtggcgg aaactgagga ccctaccag 3300
gtaaaaggaa gcctgctgaa ggcaggcagg gtgagcagac attgccctgtg gbtgacagag 3360
gctgaggact ctaccaggt aacaggaatc ttgcttaagg caggcaaggt gagcagacat 3420
cgctggggg tggcggaggc tgaggactct accagataa caggaatctt gctgcgggca 3480
gccaggtga gcagacgtcg cctgggggtg gtggaagctg aggaccctac ccaggtaaaa 3540
ggaagcttg tgaaggcagg caagtaagc agacatcgcc tgggggtggc ggaggctgag 3600
gacctgatc agatagggg ggatggaggc ttcttgccaa actgacttag cagagttctt 3660
gctgaatctg gattttataa ggcagaatgc agatgagcct gtgagaaggt tctgaagccg 3720
gactacagtt tggcaagca aacaatcttg tcatggattc agtcataata ataagggtca 3780
cccagcccag gggaggtgcc ccacccatc tgttccctct ccctcccac actgagtcag 3840
aacctttcag gctttgcccc cttcacacac tccaaattta ttcttctact tctcttctcg 3900
caggtaccag actccggcca ccagcgctt acctgggact gctgggcctc tgcccctgag 3960
ggacctgtcc tccaggaaac aaggccagac acaggagggc agggaggact ctctccagg 4020
gcccgtgccc cgtctcttca gccccatggc acttgactta ggcagagcct acagcaccct 4080
caccagcagc cctgcagcca ccaggaggtg gtccccctca tcccattagc catcaccgcc 4140
attcaacag gtctcggact gaggtggca gggggagcac catgaccocaa gatcagaaac 4200
ctgttctctg tgcctctgga gaggtggggg caggagctga gggagggttt ggtgggagag 4260
gggagaagat gcagtagcag gagcagatgc tggcaggtag agacaaactt ttatgacctt 4320
tgccttctga cctttgcctc tggccactgc tccaaactaaa acagaatggc ccctctggtg 4380
aacaggccct cctatgggct ggaagcagc gagccccac agtgtggcta tgcagagccg 4440
tgaggaccag gtggggcag gcctgtgggg gtcacagagc tgggctaagc ttcagaggga 4500
agtggccctc gggaggggga atggctgggg taaagacct gggttccac gcccccacaa 4560
cagaagtaga attagggaga aaggaccccc aagaccagg acggcaccta tcagaggagc 4620
tctccacggg caggaggtgt cccaggtga ggggtggccag gacaggtcta gggaaatga 4680
ggtggagcag gaccagaga tggattggag atgcccggag ggaggcttcc tagcgggagc 4740
ggagacaggg actgcagaca agtgtcagcg ggaggggctc tgggtgggga agaagactgg 4800
gacttggagg aagacctctc cagggagaag gtaggagggg gaaggagaag gggaggaagt 4860
gggaggagga gagtctcat cctggaagcc acagcctcgg agagaacttt ctagaaggaa 4920
ggcatgacca tcaagtctcc aggtgctga gaggccagga aaggtgaggc ctcaaggcgc 4980
catggggttg tggtagcccc aagatcactg ggcacagagc agggatggct gggggtgga 5040
ggggaggggg gcgggtgag gttctagggc cccaaagcca ggtgtgatgt ggtcttaggg 5100
ggagcgggga agggagaaat gtcctctga gcgtgcctct tggggaaggc aggggttctg 5160
gctggggcct ctccactccc aggaaaggag gtggtgtgga aggagcgggt gggacggag 5220
agagagcggc ccgcccggcgc aggaccagca ggtgggggac cagggtcagc gctgctggag 5280
gggacctagc gcgacaggac tggccagaga ccggggatgt ggcacagaaa gacttaaaag 5340
gcacccccag gaccgacctc ccggtccacc catgtcacc atgttgggcc tactaccag 5400
ccccgtctgc tctgcagggg aaggaaccgg gagcccggtt gggggcgact gggggtgtcg 5460
gtctttccag aaaatcaggc aggcacaggg aaagaagggg cgagaaccoc gggacgcgag 5520
aggaaggggg cgaggggggn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnccgctcc cagggcctcc 5580
cctcccggga ctggagccca ccctgctgg cacctgctgg gccagggtcc gggggctcag 5640
gggtctgcag gattagggtc tgcggaacca ggaccctgg gacaaaggtc tgtggggcgc 5700
gggtccgagg ggtggaattc agcgcgccga gctctcglat ggccgggta cgaggcgtc 5760
cctgcgagg gtggcagga ccgaagctcg ccgggagctg cgcggagggc gggcggggac 5820
cctccggtgc cgtccccacc ccgcccggcc gcccccagc ccgcccctcc ccgcccctcc 5880
cgccctcgtc gcccccggaa agtttgacc gaccccgatc tggcagcgcc gcgaagacga 5940
gcggtcaccg gcgcccagcc cgagcgcgce cagaggacgg cggggagcca agccagcccc 6000
cgagcagcgc cgcgcgggta gcacctgggc cgcggacccg aggggacgtt ggggagtcga 6060
cccgggtggg acagagaccg cggggcgggc gcggcggggc cgggggcgcg gggagcggg 6120
agccggccgg gcggtctccg gggctccggc tgggtcgcctc ctcagtcccg tcagacacc 6180
ccgttcccaa ccccggctcg gacaccacc ggtcctgcac cgtcgggag gtccaggggt 6240
ctcagcccct ccccgttct ctggtcctgg ggggcgcggc tggggcggg ggtgtcgtg 6300
gcccgtggc gccctgcggc ggccacactg cagcggccac actcccact cagggccccc 6360
ggcccgcgg ccctggggag gcacaaaag gccgcggag cgtcccag ggcgggggtc 6420
tcaccagcgc tgtctcccct cgggtgggctc ctgcccag gactgcccgg tggcaccggc 6480
gcggcccagg atggggtag ggggtctcgc gcccccctg gccgtcctc ttccgcggcc 6540
cacactggcg actttgacc cggcaagcgg gtcaactgcc tgcgggctc cggcccccc 6600
ggcggcccac caccggccg actcggccac cgggcttatg ctccgactc gaaccgactg 6660
accocggccc cctcggcgcc cgcacctcc aaggaccggc cagggtctc ctctgccctt 6720
ggtattgggg acatcagggt tggggggtct ggggtgcccc acgctgccc cgcccccacg 6780
gggtgagggc gcagggatag ggctttgtca acagcctgtg gccctgatc ccgcccgggt 6840
gcctgacct tccactacct tctctggttt cacaaaaaca tcccggctcc catcccggag 6900
ctcctcaaag cgtctgagag gcccttgcg gacgcctgg gagccccgt gccttctcgg 6960
accagtggcc gctccaccca tcctgggggc ccagctccag gtctgcggtt ccctcagcgg 7020

ES 2 673 721 T3

ccccagtgga gaatcgggtg agcctgacgc agccaggagc gcccgaagagt cacgtgttct 7080
gccagggaag acatgggaca ggacacgggg tgccagccct gcaaaagcggc cggggcagtg 7140
gagctcaggt ggccctaagc cctggtggtg gctggtgtgg cccggcaggc agctgtggga 7200
gggaggaagg ggtggcatg cgttgggggt ctagagaagg cgggcagggc acctcgggag 7260
ccccccatt gggcacctcg ggaaccccc acattgggca cctcgggaac cctcccattg 7320
ggcacctcgg gaacccccca catggggcac ctcgggaacc cccgcatttg gcacctcggg 7380
aaccctccca ttgggcacct cgggaacccc cctattgggc cctcgggaa cccccacatt 7440
gggcacctcg ggaaccccc cctattgggc ccttgggaac ccctccccta attctcagct 7500
gactccaagg cctgagaagg agcttgggtc cctggactgt gaaggtggag ggtggggtcc 7560
ctgggtgggtc gtcccacctc ccagctgtgt cgccggaagg gtaatcaggc gcactgtggc 7620
cccggggagc cccgagtggt agctccacag ctgggagttt ctgtccactc ctctcagtaa 7680
caaacattga tcctgggtg accggggccc ggggggtgtc gtgtctctc tcgggggaga 7740
gggctgggtg agatcaacag aggagcctcc ctctctccct tcaggctggt gtcacctca 7800
gtgatggggc aggtcccca cttgggaagt taaatcgtcg tccccgtccc aggaccacag 7860
cagcctcagc cctgctctcc aggccaggct ctctcatggg tgctcagctg gaaattgtgtc 7920
ccccaccgac cccaccccc cctgttgggg tgaggagctg gactctccct acccatatag 7980
gaccaccac ccgaggga cggaggagc tcacacttct gcacctcctg cctcactatc 8040
agagaccag tggagaatg cctcccacct cacctcttctg attcagaggc cctgaccctc 8100
agggatccgg gactaggggt gccctatggg gagcccacct gtggcctgtg gatgtctgagc 8160
tgtcggggga atcctccagg atccccgga ccaccttccc aaccttctgt tgaggctgag 8220
gggacacaga gccccactcc tgggtcctga ctgtttcaaa gaaaggcctg ggggactggg 8280
cagccaaccc ctccctcggc tcgctgggggt ctccagactg gctgcccggc tgggaaggtg 8340
ggccctggca cgcgaggacc tcactgtgtg aggcactggc ttgggggggtg ctcccagtg 8400
ctctagagtc aacatgacag gcctcgaatg gctcctgttt ctctggcaga gttggggcag 8460
agccaggctt ggccacgctg ggctctaagg ggctgtcatt ttggcccagg agctcctggc 8520
tgggtgtgoc tccccccagg gtgagcacgc gtcccccca cccccacttc gaggcgcaca 8580
ggcagggaac agctcatttg ccagtgtcct tcctccttgt cccccgctg catctccacc 8640
ttgccacccc ttccagctgc cccttggccc tctcccgtc cctgcccag agcccaggt 8700
ctcccctgca cccctgagcc tggccacctc gcagtgcctc tegtccaggg cccctctggg 8760
ttgggggtgc acacagtgg gagaggcggc tcctgctgct cctcaccag cccggctcag 8820
tgcccgagc cgcaccagac agtggcagta gatggggctg tttgatcagg atcagggaag 8880
ataaggcccc ttgctgacc ccagagctgg ggcagccaaa actgcccctc ctccccacc 8940
cgctgcccg tgtctccgcc agggagagc ccctactctg tgggtccttc gccccagcac 9000
caagcctgca tggctgctca cctggctcag gaactgggga tcagcgacac acgggtcctg 9060
cctcccctcg gcccctacat gagcccaggg tccaagggtc gcggttggga gctccttagc 9120
agtctgtgac gcggggcagc cctgggtgga gctggccca cgcgggctca cccagccgct 9240
ggccccgtta ggctaaaatc caggctgtcc cgtggcagcc agcagtcag gcctgcccgg 9300
aaaccctctg ctccagctgc agccttcgcc catctccttg cccctctccc cggcttcccc 9360
ctggcactgc cttccagctg gctggccctc catctcccga cccatccatc cacacctctt 9420
attccatttg aggtgcccc aaagaagagc ccgtaaacag cccgggggctc atagccagcc 9480
actcgcggga cccgcacat gcacgtggac ccacaggaag accctccctg ctctctcccac 9540
agaattcag tgggtcagaa actgggctct gttagcaacga aaggccgatt tgtgtagctg 9600
ttgccacccc gaactcccag ctccagatgct ggctgtggca tggggaccag gggctgtgac 9660
tcccacagcc ctggcaggca ccacggggga tgtcctcccc accctgtgcc cccaccctag 9720
gccagctcct cctccaagtc gacgcccgca gtgtaacct caaaggactg tgcagccagc 9780
ctgtgggctc ccatgggatc caggaagccc aaccgagcct tgcacggcac ccacgaggca 9840
cctaggcacc ccggtgctgg gcagggggca cacatgtgac acagaccctc gagtgtgggc 9900
cccacacact tggcctggca cagctgcaag ccagcccagc cactttgctc gctgtggcac 9960
tggggccaag tgatggaagg tccaggcacc gccaccctca cgttggcac attggctcag 10020
gtcagcctgg caagccagct tcccagggg cttaagaatag gtgaggagga tgggtaggaa 10080
gcagccgggg gctgtcaact gagggaggag gtcaccatct ggggaggctg gtcccccacc 10140
caagagcatt ggtcaccct gcaggaaggt ggctgccacc agcaatgaga cgaggggctc 10200
tgagaccctc agagctgcca gccagccagc cctgggtggc aagagtgact cctcctgggg 10260
tctcctccct cctatgccc aatggcgcaa tctctcgctc ctgcaagctc tgccctccgg 10380
gttcacatca ttctcctgcc tcaagctccc gactagctgg gactacaggc gcctgccacc 10440
acgcctggct aatttttgt atttttagta gacatggggg ttactgtgt tagccaggat 10500
ggtctcaatc tccagacctc gtgatccacc cccctcggcc tcccagggtg ctgggattac 10560
aggtgtgagc caccacgccc agccccagc tccctcttta tccctaggac cctgaggctc 10620
agaggggag cttcagggga ggacacccca ctggccagga cgcaccaggc tctgtgtctc 10680
tgccactcag ctgcctcgg aggagcgtac acaccacca ggactgcatt gcccagctg 10740
tgcagccct gccagatgtg ggaggcagct agctgccag aggcattgccc ccctgccagc 10800

ES 2 673 721 T3

cacagegacc cctgctgctg ttgctgctgc tgctggcctg ccaggtgagg actcacagca 10860
cctcagac ccagggccc tctgtgagg actgcacact gatggctctc tgtctgctg 10920
cctgcctgcc tgctgtctg cctgcctgtc tgtctgtctg cccgtctgcc tgcccactg 10980
cctgtctgtc tgctgtccg tctgtctgtc catctgtcca tctgcctatc catctgctg 11040
cctgtctgcc tgtccgtctg cctgtctgtc tgctgtcca tctgtccatc tgccatcca 11100
tctgcctgcc tgtctgtcgg cctgcctgcc tgctgtctg tctgtgcct gtctgtccgt 11160
ctgcctgtct gcctgtccgt ctgcctgcct gtcctgtctg ctgtccgtct gcctgcctgc 11220
ctgcctgcc gtctgcctgt ctgcctgcct gtcctgtctg ctgtccgtct gcctgcctgt 11280
ctgtccgtct gtccatctgc ctatccatct gcctgcctat ctgtctgtcc gtctgcctgc 11400
ctgtctgtct gcctgtctgc ctgtctgtct gcctgtctgt ccactgcct atccatctac 11460
ctgcctgcc gtctgcctgt ctgtctgtcc gtctgtctg ctgcctgtct gtctgtctgt 11520
ctgggtgctt gtgcatgtgt cccccagcca caggtcccct ccgctcaggt gatggacttc 11580
ctgtttgaga agtggagct ctacgggtgac cagtgtcacc acaacctgag cctgctgccc 11640
cctcccacgg gtgagcccc cccccagagc ctctcagcct gtgcctggcc tcagcacttc 11700
ctgggttctc ttcatggaa ggttctctgg tgcttatgca gccttgagg acccggcct 11760
ggggccctgt cattctcag gccccacca ccgtgggag gtgaggtaac gaggtaacg 11820
agccacagag ctggggactt gcctcagggc gcagagccag gaaataacag aacggtggca 11880
ttgccccaga accggctgct gctgctgccc ccagggccag atgggtaata ccacctacag 11940
ccccgtggag tttcagtggt gcagacagtg ccagggcgtg gaagctggga ccaggggcc 12000
tgggagggtc cgggtggaga gtgtatatca tggcctggac acttggggtg cagggagagg 12060
atagggtgg aggactcacc cgggaggcag tgctggggt cggatgaggg aggcagccac 12120
cactgggcag aggggggag gtgtggcagc ctccattggg cagagggagc agatgtggca 12180
gccacaggtt tggcagtga ctgggaagg atgaaaatgg cattggggtt cagccccac 12240
agagggaggt gctgagagaa ggtcacggag aatgggggac ccaggtgtgg gtttggggca 12300
catttgagat ggggggtctc caaggaagg tgcctgcag agctgcaatt cagggctggg 12360
ctgggctgct tagcggaggc tggccaggg gaggtggatg gtcaggtgag gaaggtggag 12420
gtcagatggg ggaggtggag gtcgaagtg ggagggagca gccaggcca tgtcctgct 12480
gaggtgacgg ccgagctcag gctccagag agagggagaga ggctgctga gggagcccct 12540
tctcccacc tgccctgcc tgcctgccc tgccctacc taccctgcag agctggtgtg 12600
caacagaacc ttcgacaagt attcctgctg gccggacacc cccgccaata ccaccggcca 12660
catctcctgc cctggtagc tgccctggca ccacaaaggt acccatagag gggaggaact 12720
gtgggggggg cgggcccagg gtggggctga cccagcctc cccccacacc cccagtgcaa 12780
caccgctctg tgtcaagag atcgggccc gacggtcagt gggctcgtgg accccggggg 12840
cagccttggc gtgatgcctc ccagtgccag atggatggcg agggattga ggtccaggtc 12900
agtgggcggc aggcaggcgc ggtggggctg gatgggaac ggcatggggg cctcctgctg 12960
gccctcacag gccactgtaa ctgcagaag gaggtggcca agatgtacag cagctccag 13020
gtgatgtaca cagtgggcta cagcctgtcc ctggggccc tgctcctcgc cttggccatc 13080
ctggggggcc tcaggtagga ttccggcagc gccggggcg gccgcagagg acagggagga 13140
ggcggggcgc tgactggctg tgcccacagc aagctgcact gcaccgcaa tgcctccac 13200
gcgaatctgt ttgctcctt cgtgctgaaa gccagctccg tgctggtcat tgatggctg 13260
ctcaggacc gctacagcca gaaaattggc gacgacctca gtgtcagcac ctggctcagt 13320
gatggagtga gccccctcg gccggcccag gcaggtgggt ggggtggcag ccaggcaggt 13380
ggccacgtag ccgctcac actgcacctg taccaggcgg tggctggctg ccgtgtgccc 13440
gcggtgttca tgcaatag catcgtggcc aactactgct ggctgctggt ggagggcctg 13500
tacctgcaca acctgctggg cctggccacc ctcccggaga ggagcttctt cagcctctac 13560
ctgggcatcg gctggggtga gtgggctggc atgagaggg gttaaaggcag gctgaccaag 13620
cctttgggac cacagctgct gcccccaaca ggtgcccaca tgctgtctgt cgtcccctgg 13680
gcagtggtca agtgtctgtt cgagaacgtc cagtgagtat gagcggctgg acagcctggg 13740
gagggaccgg ggggctgggg tgcggcgtc tggcctgagg cagggagggg ccggggatga 13800
gcctgggtgcc tggggagggg gtcatttgt accttctccc ttccttttct gagaccgaa 13860
ttagatcctg gcaaaatcg gacgggggtg ctgagggcgg gaggggctgg gggctgtgct 13920
ccagtatgtg agtggcctgg cctcgcaggt gctggaccag caatgacaac atgggcttct 13980
ggtggatcct gcggttccc gtcttctctg ccatcctggt cctgaggctg cccaggaga cagcagcatc 14040
gcgcacccca ggccctcct ccttggcgt cctgagcagg acaccaggac actggccagc 14100
accctggaca ctgagccagg ctgttctcc ctggctgtgt gcccaccagc cccagggcta 14220
tgtggcccag ggctatctt gctgccaggc ccactgcag gaggtcagg tggggccttc 14280
caagggcaca gagctgttcc ctgggctcg ggtgcccct gactcgcacc cttctcacac 14340
agatcaactt cttcatctt gtcgcatcg ttcagctgct cgtggccaag ctgcgggac 14400
ggcagatgca ccacacagac tacaagtcc ggtgggtgcc gcggcagctg gcgtctcgag 14460
acctggagac cctcagggcc agagggcagc tgggggtggg gactccaagc tccacgtgga 14520
tggctcgggc cgaggtggg ggcggtgggt gactcaggcg ctgcctctgc aggctggcca 14580

ES 2 673 721 T3

agtccacgct gaccctcatc cctctgctgg gcgtccacga agtgggtcttc gccttcgtga 14640
 cggacgagca cgcccagggc accctgcgct ccgccaagct cttctctcgac ctcttctca 14700
 ctgccttcca ggtgcccgcc cggcccgccg ctcccccgcc cggggcgagc tgtgccacc 14760
 ctgaccaccc tgtctctcca gggcctgctg gtggctgtcc tctactgctt cctcaacaag 14820
 gaggtaggtg ggagtggggg catctgagac catcagcact ggccgtcggg gtcaggggca 14880
 gagagaggca cagggatgcc agccccacc ctgcccgggg gttggaacac gtggggcca 14940
 agcctttccc tccccctgct cttattgggt gcagtgtgca tggcgtggg tgtcaggccc 15000
 ccaggacagg ttggcctcag ccccatcgct acggtgtcca ccgtgggggt ccccagggtg 15060
 ctgcagactg ctttccgtgg cgatgctggg tggcatagct gtgcccagca gggagcttgt 15120
 gtcgctctgc acccctcaga gcggagactg ggcactctcg atgaggccca cagcaggctc 15180
 cgggtgggtg gagaggacag gcaggcccta ggactggcct gccccgtccc cctccccagg 15240
 tgacgtcggg gctgcggcgg gcttggcacc gctggcgctc gggcaaatgt ctatggagg 15300
 agcggaaacac cagcaaccac agggcctcat cttcggcccg ccacggccct cccagcaagg 15360
 agctgcagtt tgggaggggt ggtggcagcc aggatctatc tgcggagacc cccttggctg 15420
 gtggcctccc tagattggct gagaagccct tctgaaccct gctgggagcc cagctagggc 15480
 tgacgtcggg caccagagg gcctcgctgg acaaccaga actggacgoc cagctagagg 15540
 tgggggctgg ggagccaaca gcagccccc cctaccccc acccccagtg tggctgtctg 15600
 cgagattggg cctcctctcc ctgcacctgc cttgtccctg gtgcagaggt gagcagagga 15660
 gtccaggcgg ggagtggggg ctgtgcccgt aactgcgtgc cagtgtcccc acgtatgtcg 15720
 tcactggccac tgtgatgga aatgtcctc aacaataaag agctcaagtg gtcaccgtgc 15780
 atgtcctgga aagcagggtc ggaatgtctg gggccgaagc agtgggggat ggaacagcgg 15840
 tgggtggtca gcgccagtgc gggctgttga agggctcccc tgctgtccca gttcactcag 15900
 agttggcact ggaaccccgg aggatcccga aggcagccag cctgtgccc tctgagcagg 15960
 tctggccac cttcccatcc tggttctggc gggcagtcct cctggacgct ttggccacca 16020
 gaggtgctacc attcaccagc agagacgtga ggggcacagt ggctaaggcg gctataggca 16080
 tcacagctccc ctgaccgacc ccacagcac tggattcacc cgaggcgctc ttctcctgg 16140
 aggccgtgag gacactggca cctggtctat cggccccgcc ttcctctgag cctcctggcc 16200
 tcogtttcat ctcagctcca gcccccctgg gcaatttaca ggccacgtag cagattgaag 16260
 cgggaagaaa tgggcctgaa cattgcccgg ggtccaggcg acggagaggg gcagttgctc 16320
 caacttctgc acaggaccog ggggtgcgcca cacacacgoc agtccctcgt ccacacagag 16380
 aggtccggcc tacgccagt cctcgtgccac acagagaggt ccggcctacg ccagtccctc 16440
 tccacagcac agaggtccgg cctacgcccag tcctcgtgcc acacagagag gtcggccta 16500
 cggcagctcct cgtgccacac agagaggtcc ggcctacgcc agtccctcgt ccacacagag 16560
 aggtccggcc tacgccagt cctctgccac ctctggtgg gtggcgccc tgcttgccag 16620
 ccaggagcca ccaggaaaga gctgcctcct gcgtgctgga cacaggaggt gcttcagggt 16680
 ggggttctcc attgtgtgg gcccaacctg agtctaaggg cccagggacc acacagcggg 16740
 ggtggagaca aatcagggt agaagctgtg agggcctgt ggtcagcccc ccggggggctc 16800
 cctgcagcag gcaactgtg acctactgag gtgtgtgcat gggctgggga aggagccagt 16860
 cagggtcccc tgcctgagag agctgctggg aagtgctgct gggccctggg ggaaggggtg 16920
 ctccacagcac agaggtccgg cactgggctc ggagccgctc aggcagagcc ggaactaatt 16980
 gggcaaatga ggggacagga ggcctctgag gaaaggtaaa tagaattact caccgccag 17040
 gcaactgggg cctcctgggg gggccctcac cctgccacc accacagggc ctgcatgcag 17100
 cagggagggg agtgagctga ttaggcaagg ctggaccctt ctggggccct ggggttctg 17160
 tgattgggac ggcaaggcca ggagacggtc cctgagctg cacctgctgg aggcctgtga 17220
 tctcagacct taaggcttca ggccagctct acgcccctcc ggcctcaggt cctggctctc 17280
 ctctgagccc tggatgccc ggtgcctgtg tgggcacgag gctgtccga gtcagcacac 17340
 ggaggtggac attctccttc atgccagctg agctcagggc tgggtactgc cctggggaaa 17400
 ctgccctca cctgggacct cctgacagcc ctcccattc ccgagctcct ctgccctgt 17460
 cctctttcac ctctgtccc cctcatccc taagggaact ggagcaggct ggtggagttg 17520
 ggtggagttg gggactggca ggggtgggac tcacccaggc aataaacact ggcctaac 17580
 aggcagctcct gcaggcaggt aggtggagg actgttttt ttctttttt gagatagag 17640
 ctcaactctgt tgccaagtt ggagtgcagt ggcagatct tggctcactg caaactccac 17700
 ctcccaggtt catgtgattc tctgcctcag cctcccaggt agctgggatt ataggcgtgt 17760
 gccacgacac ctggctaatt ttttttttt tttttttgag acggagtttc actctcgttg 17820
 cccaggctgg agctcaatgg cgcgatctca gctcaccgca acctccgct cccaggttca 17880
 agcgattctc ctgccttagc ctccctagta gctgggatta caggcaggta tgtgatgccc 17940
 ggcaccccaa aggggtatct gcaagagttg ggtgctgtgt gtgcatggct gggaggaaga 18000
 tgactttgat accctggaat ctggtgtctg tggacacaaa aataactact aaatgagagt 18060
 ggagaccagg aaaaaggaag acatgaacta catgaaggac caaatctagg agagtcagaa 18120
 gtgcgtcaca ggaataggg accttgagcc agacagaagg ctcagcagag acacctcaa 18180
 ggggatgaaa gggattgagt gcaactaatat ttagaggaga gagttagga cttgattagt 18240
 gactagtaca tagaaaacta aacaaatgag gctgggtgca gtggctcatg cctgtaatcc 18300
 cagcactttg gggggccaag gcgggcgaat cacctgaggt caggagttcg agaccagcct 18360

ES 2 673 721 T3

ggccaacatg gtgaaacctc gtctctactg aaaatacaaa aattagccgg gcggtggtggc 18420
 gggcgccctgt agtcccagct acttgggagc ctgaggcagg agaatcgctt gaacctggga 18480
 ggcggaggct gctgtgagcc aagatggtgc cattgcactc caccctgggt gacagagcaa 18540
 gactccgtct caaaaaaaaa aaaaaagaaa gaaaaaacca agcaaatgaa aaaagaaggc 18600
 aattaataat tccaagaaa agaaaaattt gggcagaaaa gaacaaaaca agcagaattt 18660
 accatgactc agttctgaat acaaacacag acatcataat gtaaacacca aactgatgc 18720
 aaccagaatc atgggagaaa aaagatctag ggagggtggt ggacgggaat atcacgtatg 18780
 tactgggggt aggggagaga acaaatggg aaaaatcaag aataattcac gttagaata 18840
 aaaatacaga gcaaaattta aaaatgcaa gaatgagggtg aagagttcaa agtggtcacc 18900
 tcggggccgg gcgcggtggc tcacgcctgt gatcccagca ctctgggag ctagggcggg 18960
 cggatcacia gggcaggagt ttgagaccat cctggctaac aaggagaaac cccatctcta 19020
 ctaaaaatta gccaggcgtg gtggtggcg cctgtagtcc cagctactcg ggaggctgag 19080
 gcaggagaat ggcgtgaacc caggaggcgc agcttgagc gatccgagat cgcgccactg 19140
 cactccagct tggcaacag agtgagactc gcctcaaac aaaacaaaaa aaacaaaaa 19200
 aacaaaagtgg tcatctctag gcaagggtgg tgggagatgg ctagggtgc aggtcacta 19260
 cgtgagctgg ctacgctat ccccagacac cctgactca ctacgcccg ggtcctccc 19320
 ctgcaactac tcagccccg gtccctccc gcactcactc agccccgggt cctcccctg 19380
 cactcactca gccccgggtc ctcccctgcc tgcctttct ctgaccctgc cctccactgt 19440
 tccttttct tcttctctc cctggtgtg scaggaacca ggcaccacc cctctcttc 19500
 ttgatcaatc tttaaaaacc agcagtgctc agctaactct tcatctatct cccccact 19560
 ggggctctgc tgaatccacg ctttagacc agctatcagc tcggcatgta cagctggatg 19620
 tccacaccga gctgctcacc ctgtcccag cttcttctc ccactgtcca ctgcagaagc 19680
 ctcctaacag gaccocctgct gctaccccgg accctgcaac ccattcccac acagcagcca 19740
 gatgctttga caccogaagt ctectatgaa tccgatgagg cctctgcacc acacctcatt 19800
 ttacagaagt acaggggaaa caggggtctg ttgacaccac agagatgcag ctggcctaaag 19860
 gcagaatgtg gggtaacacga ctgtcaaac ccaggggtcc ttacacgaat ggtggaaaaa 19920
 gaggggcatg ttacggatgg aggctcggga cacatggggc cgccttccc atgctgccag 19980
 caaccacca ggaacctatt a 20001

<210> 3
 <211> 10000
 5 <212> ADN
 <213> Macaca mulatta

<400> 3

tgtctact ccgaaccgac cgaccagacc ctctcggcgc ccgcatcctc caaggaccgg 60
 ccagggtctg tttctgcctt tgtattggg cgcattgagg ttggggggtc ggggcgcacc 120
 caggccggca cccaggcctg ccccgcctcc acggagttag ggctcagggc tttgtcaaca 180
 gcctgtggcc cctgatcccg cctggtgccc ctgacctcc gctgccttct ctggtttcc 240
 aaaaacatcc cggctccgat gcgggagctc tccaaagcgt ctgagaggcc cctgccggac 300
 gccctgggag ccccgctgcc ttctgaacc agtggccgct gcacccatcc tgggggcca 360
 gctccaggtc tgcgagctc tcagccacc ccagtgagg ttggtggagc ctgaggggagc 420
 catgagcaca caagagtcac gtgttctgcc agggcagaca tgggacagga caggggggtgc 480
 cagccctgca aaggggcccag ggcagtgag ctcaggtggc cccaaggcct ggtggtggct 540
 ggtgtggccc tgtgggagg aggaaggggg tgggtgtgag tggaggggct 600
 aggaaggcgc ggcagggcac ctcgggagac cccctcattg ggcacctcgg gaaccccccc 660
 ggcattgggc acctcgggaa ccccccgcat tgggaacctc ggggaacccc cgcattgggc 720
 acctcgggaa ccccccccg cattgggcac ctcgggaacc ccccccgca ttgggcacct 780
 ggggaacccc ccccgcattg ggcacctcgg gaaccccccc cgcattgggc acctcgggaa 840
 cccctcccct aattcttatg actccaaggc ctgagaagga gcttgggtcac ctggactgtg 900
 aaggccgagg gtgggtctc ttggtgggtg cccaacctac cagcagcgtc gccagcaggg 960
 taataagggg cactgcggcc atggggagcc ccgggtggca cctccacagc tgggagtttc 1020
 tgtccacttc ttcagtcaac agacattgat cccgggtgta cgggggccc gggttgtcag 1080
 tgtctcctgt caggggagag gctgggtga gatcatcaga ggagcctccc tcttccctt 1140
 caggctggtg tcacctcag tgacgggca ggtcctat ttgggaagtt aatcatcat 1200
 ccccgctcca ggaccacagc ggtctcagcc ttgctctcta ggccaggctg tctcctgggt 1260
 gctcagctgg aaattggccc atcccccggt cttcaccac ccctgctggg atgaggggct 1320
 ggagtctccc taccacatg ggaccaccgc cccgcaggga acagaggacc cccacactcc 1380
 tacacctcct gacctactat cagagaccga gtggagaatt gccccacc ccacctttg 1440
 tattcagagg ccctgacccc taagatcca ggactagggg tgcctgatg gggagcccac 1500
 ctgtggcctg tggatgctga gctgttaggg gaatcctcca ggatccgcag cccactttc 1560
 ccaaccttct gttgagattg ggggggacac agagagcccc actcctctt cctccccact 1620
 cctgggcccct gactgctca aagaaaggcc tgggggactg ggcagcccgc cctcctca 1680
 gctcactggg gtctccagac tgcatgcagc gctggaaggt ggggccccg cactcagaga 1740

10

ES 2 673 721 T3

gcttgtgtgt ggaggcgcca tctcctctcg cactggcttg ggggtgctcc cagtggctct 1800
 ggggtcaaca tggcagtcac tgaatggctc ctgtttctct ggcagagtgg gggcagagcc 1860
 aggcctggcc acgctgggct ctaaggggct gtcattttgc ccaggagact cctggctgag 1920
 ctgtcctctc ccaggggtga gcacgcacgc cctaaccctc cactgcaggg ccccagcca 1980
 gggaaacagct tatcagccag tgtccttctc ccttggcccc tgctgcaccc tccaccatcc 2040
 gccctgctcc agctgcccgt tgtctttctc cccgtcccct gccagagacc ccaggcctcc 2100
 cctgcacccc tgagcctgcc cacctagcag tgcccctcct ccaggggccc tctccagggg 2160
 cccctccggg ttgggggtgc acacagcagg gagaggcggc tctgctgctc cctcacceag 2220
 cccagctcag tggccagagc cggcccaggg agtggcagca gatggggctg tttgatcaga 2280
 atcaggaaaa ataaggcccc ttgggtgacc ccagagctgg ggacgccaaa actgctcctc 2340
 ctccccacc cgcctgctgc tttctccacc agggagagcc cctccctac tccgtgggtc 2400
 cttcacccca gtgctaagcc tgcataagcc ctcacctggc tcagggactg gggatcagt 2460
 atgcatgggt cctgcctccc atcggccccct acctgagccc agggctcaag ggtgctgggt 2520
 ggaagcccct tagcaggctg tgacgcagggt gcctgtccct atcatteagc tgtcacctctg 2580
 tttggtgcat ctgagcccct gttagcagga ggagccccag gtggtgctgg cccacgcag 2640
 gctcaaccag cagctgcctg gaggagctga aaatccaggc tgtccatgg cagcagctg 2700
 tccagcccgg cccgaaaatc ctccgctcca gcggcagcct tcgcccctct cctcacccct 2760
 ctcccgggct tcttctggc actgccttcc agctggccgg cctccatct gccagccct 2820
 ccatccacac ctcttattcc gtttgagggg gccccaaga agagctcatc gacgcctgg 2880
 ggtcaccaga cagcacagc gcccacggg aagaccctcc ctgcttctcc cacagaatc 2940
 agttggtgca gaaactaggc tctgcagcaa tgaaaggccg atttgtggag ctgttcccgc 3000
 cccaaactcc cagctcagat gctggctctg gcctgggacc aggtgctgtg actcccag 3060
 ccttggcaga caccacaggg gctgtcctcc ccacctgtg ccccgactct aggccagctc 3120
 ctctcagcag ccggcgtgg cagtgcta8 ctcaaaggaa tgtgcagcca gctgtagt 3180
 tccatggga cccaggaagc ccaaccgagc cttgcatggc acccatgggg cacttagcca 3240
 ccacagtgtc gggcaggggc atgcatgtga cacagatccc cgagtgtggg tccacacac 3300
 ttgacctggc acagctgcaa gccagcccag ccactttgct caccgtggca ctggggccaa 3360
 gtgactgga gctctgggca agctcgggca aggtctggca cgttggctca ggtcagctg 3420
 gcaagccaac tttccaggg gctaagaatg ggtgaggacc ggaaccgagc gggctgtca 3480
 actgagggag gaggtcagca tctggggagg ctggtcccct gccaaagaca ttgggtcacc 3540
 cggcagggag gtggctgcca acagcactga gacaaggggc tctgggacc tccagagctg 3600
 cagccagcca gcctgggctg gcggaagagc cagctccact tctactggc aaggagtgc 3660
 tctgctggg gtctcctccc tcccagctcc ctcttttttt ttttttttt tttttttgag 3720
 acagtctcac tctgtctgcc agtctggagt gcagtggctc cgtcttggct cattacaagc 3780
 tctgcctccc gggttcacgc cttctcctg cctcagactc ccgagtaact gggactacag 3840
 gcgccacta ccatgcccgg ctaatttttt tatttttagt agagacatgg ttcaactat 3900
 tttagccagg atggtctcga tctcctgacc ttgtgatctg cctgccttga cctcccaaag 3960
 tttctgggatt acaggtgtga gccaccatgc ccagccccca gctcccctct tatccgtagg 4020
 actctgaggg tgagaggggc agctgcccct cggaggagcg gctagctgcc cagaggcatg 4080
 ggtctgctgc cctgcccag cctgcccagat gtgggaggca gctagctgcc cagaggcatg 4200
 ccccctgtc agccacgtcg acccctgcta ctggtgctgc tgcctgctggc ctgccagtg 4260
 aggaactaca gcacccctcag caccacaggg cctcctgag gactgcacac tgatggttct 4320
 ctgcccctgc gctgcccctg ctggctgtcc gtctgcccct ctgtccatct gctgcccgt 4380
 ccactgtct gtctgcccct ctgtctgtct gcctgcccgt ctgcccctgc gctatctgt 4440
 ccgtctgtct gtctgtctgc ctatctgtct gtctttctgc ctgtctgccc gtctgcccct 4500
 ttgtctgtct gtctgcccct ctgcccctat ctctgcccct ctgtctgccc gtctgcccct 4560
 ttgtctgtct gtctgtctgc ctatctctct gctatctgc ctgcccctgc gctgcccgt 4620
 ctgcccctgc gctgcccct ctgcccctgc gctgctgtct ctgtctgtcc atctgcccgt 4680
 ctgcccctat gtctgtccat ctgcccctgc gtctgtatgg ttgcttctgc atgtgtccc 4740
 cagccacagg ccccctccgc tcaggtgatg gacttcccgt ttgagaagtg gaaactctac 4800
 ggtgaccagt gtcaccacaa cctgagcctg ctgcccctcc ccacgggtga gcccccacc 4860
 agagcctttc agcctgtgcc tggcctcagc atttcctgag ctcttcatgg gaaggttcct 4920
 ggggtgcttat gcagcccctg aggatcccgc caaggggccc caccacctca gggcccacca 4980
 ccattgggag gtgacgtaac caggtagctg agccacagag ctggggactt gctaaaggct 5040
 gcagagcccag gaaataacag aacagtggaa ttgctgctg tcccaggcc cagatgccta 5100
 ataccgccta tagcccccag gagttttcag tgggcagaca gtgccagggc gtgggaggtg 5160
 ggaccacagag ggtcagcaga ggacacaggg ctgggaaggc ttgggtggag agtgcatatc 5220
 atggcctgga cacttggggg gcaggggcag gctaggggct gaggacttac ctgggagcca 5280
 gtgccacggg tcagacagag gaggcagcct ccaactgggca gaggggacc ggtgtggcag 5340
 ccacaggttt ggcagtgcac ctgggatgga tgaaaatggc atgggggttc agccccaga 5400
 gagggaggtg ctgagagaaa gtcacggaga atgggggacc ccagtgtggg tttgggggac 5460
 atctgagatg ggggttctct gagtgaaggt gtcctgcaga gctggaactc agggatgggc 5520

ES 2 673 721 T3

tgggagtgct aggggaggct ggcccagggg agatggatgg tcaggtgagg aagttggagg 5580
 tcagattggg gaggtggagg tcaggtgggg gaggaagcag cccaggtcat gtctggggg 5640
 gaggtgacag ctgagctcag gcctccagag agaggtaaag ggctgtgga gggagcccct 5700
 tctcccacc tgccctgcag agctggctcg taacagaacc ttcgacaagt attcctgctg 5760
 gccagacacc cctgccaaata ccacggccaa catctcctgc ccctggtaac tgccttggca 5820
 ccacaaaggt acccatagag ggaaggaaca gtgggagggg caggcccagg ggtggcgctg 5880
 accccagcct cccccaacac acgcagtgca acaccgcttc gtgttcaaga gatgcccggc 5940
 cgatggtcag tgggtgcgtg gaccccgggg gcagccttgg cgtgacgcct ctcaagtcca 6000
 gatggacggc gaggagcttg aggtccaggt cagccggcgg caggcgggcg cggtggggct 6060
 ggatgggaat gggcacgggg gtcccggccc ggccctcaca ggccactgta actcgcagaa 6120
 ggaggtggct aagatgtaca gcagcttcca ggtgatgtac acggtgggct acagcctgtc 6180
 cctgggggct ctgctcctcg ccttggccgt cctggggggg atcaggtagg atcccgcag 6240
 tgcccggggc ggccgcagag ggcagggagg agggcggtcg ctgactggct gtccccacag 6300
 caagctgcac tgcacccgca acgccaatcca cgcgaacctg tttgtgtcct tctgtctgaa 6360
 ggccagctcc gtgctggtca tcgatgggct gctcaggacc cgctacagcc agaagattgg 6420
 cgatggtcag agtgcagca tctggctcag tgatggagtg agccccctg agggggccag 6480
 acacaggcgg gtggcggggc agccaggcag gtggccatgt ggccacgctc acaactgcacc 6540
 tgtgccaggc ggtggccggc tgcctgtgtg ccgctgtgtt catgcaat at ggctgtgtg 6600
 ccaactactg ctggctgctg gtggagggcc tgtacctgca caacctgctg ggctggcca 6660
 ccctccctga gaggagcttc ttcagcctct acctgggcat cggctggggt gactggccag 6720
 gcacgggaag gggctcggggc aggctggcca agccttgaga ccacagctgc tgcccccca 6780
 aggtgccccc atgctgttca tcatcccctg ggtggtggtc aggtgtctgt tcgagaacat 6840
 ccagtgagta tgagcggccg gacggcccgg ggaaggggcc ggggggctgg ggtgtggagc 6900
 tctggcccga ggcagggagg ggcgggggat gacccctggt cccggggagg gtggctatc 6960
 gtgaccttct cccttcgttt cctgagccct gaattagata ctggcaaat cgggacgggg 7020
 gtgctgaggg ctgaggggccc ggggtctgtg ccccagtttg tgagtggccc ggctcgcag 7080
 gtgctggacc agcaatgaca acatgggctt ctggtggatc ctgctgtcc ccgtcttct 7140
 ggccatcctg gtgaggaatc gaagagcaag gaccgcacg cagggccctc ctccctggc 7200
 gtctgaggc tgcccagga ggcagcatcc tgtctgggag ggccaggagg gagctggcc 7260
 ccagacagga caccaggaca ctggccagca ccctgggccc tgagccaggc tgcctctccc 7320
 tggctggggtg cccaccagcc ccagggctct gtgccagggc ctatctggct gccagaccca 7380
 cctgcaggag ggtcaggtgg ggccttccaa gggcacagag ctgtcccctg gggctctgg 7440
 tgcccctgac tctgtccctt ctcacataga tcaactctt catcttcatc cgcattgttc 7500
 acctgcttgt ggccaagctg cgggcccggg agatgcacca cacagactac aagttccggt 7560
 ggggtgccacg gcgggcccggc gcctccggat ctggagacc tcagggccag agggcagctg 7620
 ggtgggggga ctccaagctc cacgtggatg gtgcccggc agggcgaggg tgggtgtgga 7680
 ctggggctct gcctctgtag actggccaag tccacactga cctcatccc cctgctgggt 7740
 gtccaacgaag tggcttctgc cttcctgacg gacgagcacg cccagggcac cctgcccctc 7800
 gccaaagctct tcttcgacct cttcctcagc tccctccagg tgccctgccc cccgcccgtc 7860
 ccccaaccgg ggcgcagctg gccaccctgt accaccgtct ctctccaggg ctgctgtgtg 7920
 gctgtcctct actgcttctt caacaaggag gtagggtggca gtggggcggt ctgagacctg 7980
 cagccctggc cgtcagggtc aggggcagag agtggcacag ggatgccagc cccaccccctg 8040
 ctcagggggt ggaacacatg tggcccgaagc cttttactgg gtgccgttgc cgtggcgctg 8100
 gctgtcaggc cccaagaca ggttggcctc agcccattg ctagggtgtc cacagcgggg 8160
 gtcccagat gtctgcagac tgtgcttctc gtggcgatgc tgggtggcat agctgtgccc 8220
 agcaggggagc ttgtgtcgt ctgcacccc cagagtggag accgggcatc tctgacgggg 8280
 cccacagcag gtcccgggtg ggcgggagagg acaggcagac cccaggactg gctgcccga 8340
 cccccggccc caggtgcagt cggaaacttc cgggcatbgg caccgctggc gctgggcaa 8400
 agtctgcag gaggaagcgg gcaccagcaa ccacaaggcc ccatctgctc ctggccaagg 8460
 ccttccctggc aagaagctgc agtctgggag ggggtgtggc agccaggact catctgagg 8520
 gatccccttg gctggtggcc tccttaggtt gqctgagagc ccttctcaa ctctgctggg 8580
 accccagcta gggctggact caggcaccta gagggcatcg ctggacaacc cagaaccaga 8640
 cggccagctg aggtggggg caggggagcc aaaagcagcc cccgctatc cctaccccc 8700
 agtgtggcag tccgagagat ggggcccctc ctcccctgac ctgcccctgt cctggtgctg 8760
 gggcgagctg aggagtcag ggcagaggta ggggctgtgc tgcgaactgc tcaccagtgt 8820
 ccccatggat gttggcacgt gctacatgcc tggagatgtc ctccaacaat aaagagctca 8880
 agtggtcacc gcgcatgtcc tggaaagcag gqctggaat gccgggcccga agcagtgggg 8940
 atggaacagc agtgggtggc cagcgcagc gcgggtcgtt gaaagacccc tctgtgccc 9000
 gttcacagag agttggtact ggaaccccag aggatcccga aggcagccag cctgtgccc 9060
 tctgagcagg cctggccac ctcccactc tgggtctggc gggcatccc ctggacgctt 9120
 tggccaccag agggtcacca ttcaccagca gaaatgtgag gggcacagtg gctaagggag 9180
 catgaggcat cacagtcccc caaccaccc catcagcact ggattcacc agagggtgtc 9240
 tcctccctgg aggcctgag gacactggtc cctggctcac cagcccaccc ttcctctgag 9300

ES 2 673 721 T3

```

cctcctggcc tccgcttcat ctccagctcca gcccctcgg gcaatttgca ggccacgtag 9360
cagactgaag caggaagaaa tgggcctgaa cattgccacg ggtccaggtg acgaagcagt 9420
gcaagttgcc caaactctgc acaggacca cggcgtgcc cacagagag tccagcctac 9480
gccagtcctc ctgccactgc atgggtggta ggtgccctgc ttgccagcca gggagcacca 9540
ggaaagagct gcctcctgca tgttggacac aggaggtgct tgaggggtgg gtctcccatt 9600
gtctggggca caccctgaat ctaagggccc agggaccaca cagcaggggt ggagacaagt 9660
ccaggtgga agcccatgag gggcctgtgg tcagtcctcg ggggtggtcct tatggtaggt 9720
gctgtgagac ctgctgaagt gtgtgcatgg gctggggaag gagccagcca ggtgcccctg 9780
ctctgaggag ctgctgggag gtgccgctgg accctggggg aaggggtgct cacaggcccc 9840
gcctgggcca cgtgggctgg agccgctcag gcagagccgg actaattggg gcaaagtagg 9900
ggacaggagg cctctgagga aaggtaaata gaattactca cccaccaggc actggggccc 9960
tcctgggggg gccctcacc tgcactcac cacaggcct 10000

```

- <210> 4
- <211> 20
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Oligonucleótido sintético
- 10
- <400> 4

- gcactttgtg gtgccaaggc 20

- 15 <210> 5
- <211> 17
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Oligonucleótido sintético

- <400> 5

- 25 gcaccccagc cgatgcc 17

- <210> 6
- <211> 17
- <212> ADN
- 30 <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Oligonucleótido sintético

- 35 <400> 6

- agccctggcc ggtcctt 17

- <210> 7
- <211> 17
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 45 <223> Oligonucleótido sintético

- <400> 7

- tcccggagtg cccaatg 17
- 50
- <210> 8
- <211> 17
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 55
- <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 8
 5 ttcccgaggt gcccaat 17
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 15 <400> 9
 gggttcccga ggtgcccaat 20
 <210> 10
 20 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 10
 gttcccgagg tgcccaa 17
 30 <210> 11
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 11
 40 ggtcccgag gtgccca 17
 <210> 12
 <211> 17
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 50 <400> 12
 gggttcccga ggtgccc 17
 55 <210> 13
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 13
 65 tgatctacc cagccct 17

<210> 14
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 14
 10 aagtgacac cagcctg 17
 <210> 15
 <211> 17
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20 <400> 15
 ctgaaggtga caccagc 17
 25 <210> 16
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 16
 35 ttccagctga gcaccca 17
 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 45 <400> 17
 tccacaggcc acaggtggc 20
 <210> 18
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 18
 gcatccacag gccacag 17
 60 <210> 19
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 19
 5 agcatccaca ggccaca 17
 <210> 20
 <211> 17
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 15 <400> 20
 cagcatccac agccac 17
 <210> 21
 <211> 17
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 21
 ctcagcatcc acaggcc 17
 30 <210> 22
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 22
 40 agccactggg agcacc 17
 <210> 23
 <211> 17
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 50 <400> 23
 ggctctgccc caactct 17
 55 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 24
 65 gtgagcagcc atgcaggct 20

<210> 25
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 25
 10 gagcagccat gcaggct 17
 <210> 26
 <211> 17
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20 <400> 26
 tgagcagcca tgcaggc 17
 25 <210> 27
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 27
 35 gccaggtgag cagccat 17
 <210> 28
 <211> 17
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 45 <400> 28
 aggacaggc acctgcg 17
 <210> 29
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 29
 gcctggatt tagcctc 17
 60 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 30
 5 cggggtggca acagctacac 20
 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 15 <400> 31
 gcaaggctcg gttgggctc 20
 <210> 32
 20 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 32
 tgcaaggctc gttggg 17
 30 <210> 33
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 33
 40 gcagagcagc agagcct 17
 <210> 34
 <211> 17
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 50 <400> 34
 ggcagagcag cagagcc 17
 55 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 35
 65 ggcagctgag tggcagagca 20

<210> 36
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 36
 10 gcatgcctct gggcagc 17
 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20
 <400> 37
 aggcacaggc tgaaggctc 20
 25 <210> 38
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 38
 35 aggccaggca caggctg 17
 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 45 <400> 39
 gctgaggcca ggcacaggct 20
 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55 <400> 40
 ggctgcataa gcaccagga 20
 60 <210> 41
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 41
 5 ctgcataagc acccagg 17
 <210> 42
 <211> 17
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 15 <400> 42
 cccagctctg tggctca 17
 <210> 43
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 43
 gtccccagct ctgtggctca 20
 30 <210> 44
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 44
 40 gcaagtcccc agctctg 17
 <210> 45
 <211> 17
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 50 <400> 45
 cgccctggca ctgtctg 17
 55 <210> 46
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 46
 65 ggtccaggc catgata 17

<210> 47
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 47
 10 aagtgccag gccatga 17
 <210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20
 <400> 48
 cccaaggtgc cag
 gccatga 20
 25 <210> 49
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 49
 35 caagtgcca ggccatg 17
 <210> 50
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 45 <400> 50
 ccaagtgcc aggccat 17
 <210> 51
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 51
 55 cccaaggtgc caggcca 17
 60 <210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 52
 5 caccccaagt gtccaggcca 20
 <210> 53
 <211> 17
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 15 <400> 53
 ccccaagtgt ccaggcc 17
 <210> 54
 20 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 54
 accccaagtg tccaggc 17
 30 <210> 55
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 55
 40 gcacccaag tgtccag 17
 <210> 56
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 50 <400> 56
 ccctgcacc caagtgcca 20
 55 <210> 57
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 57
 65 aaacctgtgg ctgccac 17

<210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 58
 10 gccaacctg tggctgccac 20
 <210> 59
 <211> 17
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20
 <400> 59
 ggacaggctg tagccca 17
 <210> 60
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 60
 ggctcactcc atcactgagc 20
 35
 <210> 61
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 61
 45 ccacctgcct ggctgcc 17
 <210> 62
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55
 <400> 62
 gtcaggtac aggccctcca 20
 60
 <210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 63

5 ggaggggtggc caggcccagc 20

<210> 64
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 64

15 ccagccgatg cccaggt 17

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

20 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 65

ggccagtgtc ctggtgcct 20

30 <210> 66
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 66

40 gccaccagca ggccctg 17

<210> 67
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 67

gggctgaggc caacctg 17

<210> 68
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 68

60 gccaccagc atgccacgg 20

65 <210> 69

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 69
 10 ccctgctggg cacagctatg 20
 <210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20 <400> 70
 cacaagctcc ctgctgggca 20
 <210> 71
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 71
 gagcgacaca agtccctgc 20
 35 <210> 72
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 72
 45 ggtgcagagc gacacaagct 20
 <210> 73
 <211> 17
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55 <400> 73
 ggctgccacc acccctc 17
 60 <210> 74
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 74
 5 ctttattggt ggaggac 17
 <210> 75
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 75
 15 ctctttattg ttggagg 17
 <210> 76
 <211> 17
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 76
 gctctttatt gttggag 17
 30 <210> 77
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 77
 40 agctctttat tgttga 17
 <210> 78
 <211> 17
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 50 <400> 78
 gagctcttta ttgttg 17
 <210> 79
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 79
 acctggaagc tgctgtacat 20
 65 <210> 80

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

5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 80

10 gggcaatgca gtctctgg 17
 <210> 81
 <211> 17
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 81
 gaaggtgaca ccagcct 17
 <210> 82
 25 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 82
 gctcagcatc cacaggc 17
 35 <210> 83
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 83
 45 tggatttag cctcctc 17
 <210> 84
 <211> 17
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 84
 gccaaacctg tggctgc 17
 60 <210> 85
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 85

5 gggttcccga ggtgcccaat g 21

<210> 86
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 86

15 ggtcccagag gtgccc 16

<210> 87
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 87

gggtcccga ggtgcc 16

30 <210> 88
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 88

40 gaggccaggc acaggct 17

<210> 89
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 89

cggtccttgg aggatgc 17

<210> 90
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 90

60 gttcccaggg tgcccaatg 19

65 <210> 91

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 91
 10 ggtcccgag gtgccaat 19
 <210> 92
 <211> 19
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20 <400> 92
 gggttcccga ggtgccaa 19
 <210> 93
 25 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 93
 ggtcccgag gtgccaa 18
 35 <210> 94
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 94
 45 gttcccgagg tgccca 16
 <210> 95
 <211> 18
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55 <400> 95
 gggttcccga ggtgccaa 18
 60 <210> 96
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 96

5 gggttcccga ggtgcccaat a 21

<210> 97
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 97

15 ccagctctgt ggctcag 17

<210> 98
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 98

cctggatttt agcctcctcc 20

30 <210> 99
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 99

40 tgggtctctg atagtgaggc 20

<210> 100
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 100

gctcagcatc cacaggccac 20

<210> 101
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

60 <400> 101

gccaagcctg gctctgcccc 20

65 <210> 102

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 102
 10 ctctttattg ttgaggaca 20
 <210> 103
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20 <400> 103
 tctttattgt tggaggacat 20
 <210> 104
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 104
 ccacaggcca caggtgggct 20
 35 <210> 105
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 105
 45 agccaggtga gcagccatgc 20
 <210> 106
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55 <400> 106
 aagtgccag gccatgat 20
 60 <210> 107
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 107

5 ccaagtgtcc aggccatgat 20

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

10 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 108

15 accccaagtg tccaggccat 20

<210> 109
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 109

gcacccaag tgtccaggcc 20

30 <210> 110
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 110

40 tgcacccaa ggtccaggc 20

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

45 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 111

gcacatggga cgtgccgaca 20

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

55 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 112

60 gctcttatt gttgaggac 20

65 <210> 113

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 113
 10 gagctcttta ttgttgagg 20
 <210> 114
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20 <400> 114
 agctcttat tgttgagga 20
 <210> 115
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 115
 ggtcccgag gtgccaatg 20
 35 <210> 116
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cebador
 <400> 116
 45 gacaccccg ccaatacc 18
 <210> 117
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 55 <400> 117
 ccgcatctct tgaacacgaa 20
 60 <210> 118
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda

ES 2 673 721 T3

<400> 118
5 ttggcaccac aaagt 15
<210> 119
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> Oligonucleótido sintético
<400> 119
15 gcgtttgctc ttcttcttgc gttttt 27
<210> 120
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
25 <400> 120
atctcctgcc cctgttacct 20
30 <210> 121
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
35 <220>
<223> Cebador
<400> 121
40 ggtccacgca cccactga 18
<210> 122
<211> 24
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Sonda
50 <400> 122
accgcttcgt gttcaagaga tgcg 24

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado monocatenario que consiste en la secuencia de bases nucleotídicas de la SEQ ID NO: 11, en la que el oligonucleótido comprende:
- 5 un segmento separador que consiste en diez desoxinucleósidos unidos;
un segmento del ala en 5' que consiste en tres nucleósidos unidos;
un segmento del ala en 3' que consiste en cuatro nucleósidos unidos;
- 10 en el que el segmento separador está colocado entre el segmento de ala en 5' y el segmento de ala en 3',
en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado 2'-O-metoxietilo, en el que cada enlace internucleosídico de dicho oligonucleótidos modificado es un enlace fosforotioato y en el que cada resto de citosina de dicho oligonucleótido modificado es una 5-metilcitosina.
- 15 2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto está en forma de una sal de sodio.
3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto está en forma de una sal de potasio.
4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el compuesto antisentido está conjugado.
- 20 5. Una composición que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o una sal del mismo y al menos uno de un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de la reivindicación 5 para su uso en terapia.
- 25 7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad metabólica en un ser humano, opcionalmente en el que la enfermedad metabólica es diabetes.

30