

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 462**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2014 PCT/US2014/043723**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14205449**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2014 E 14813708 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3011026**

54 Título: **Compuestos y métodos para modular expresión de C-III de apolipoproteína para mejorar un perfil diabético**

30 Prioridad:

21.06.2013 US 201361838211 P

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

10.08.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CROOKE, ROSANNE, M. y
ALEXANDER, VERONICA, J.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 778 462 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos y métodos para modular expresión de C-III de apolipoproteína para mejorar un perfil diabético

5 **Campo de la invención**

[0001] En el presente documento se describen compuestos mejorados, composiciones y métodos asociados para reducir la expresión de ARNm y proteína de apolipoproteína C-III (ApoCIII) en un sujeto diabético o un sujeto con riesgo de diabetes.

10

Antecedentes

[0002] La apolipoproteína C-III (también llamada APOC3, APOC-III, ApoCIII y APO C-III) es un componente de HDL y de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG). ApoCIII ralentiza el aclaramiento de las lipoproteínas ricas en TG al inhibir la lipólisis mediante la inhibición de la lipoproteína lipasa (LPL) y al interferir con la unión de las lipoproteínas a la matriz de glucosaminoglucano de la superficie celular (Shachter, *Curr. Opin. Lipidol*, 2001, 12, 297-304).

15

[0003] Los niveles elevados de ApoCIII se han asociado con niveles elevados de TG, resistencia elevada a la insulina hepática y enfermedades como enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), obesidad y diabetes (Chan et al., *Int J Clin Pract*, 2008, 62: 799-809; Onat et al., *Atherosclerosis*, 2003, 168: 81-89; Mendivil et al., *Circulation*, 2011, 124: 2065-2072; Mauger et al., *J. Lipid Res*, 2006, 47: 1212-1218; Chan et al., *Clin. Chem*, 2002, 278-283; Ooi et al., *Clin. Sci*, 2008, 114: 611-624; Davidsson et al., *J. Lipid Res*, 2005, 46: 1999-2006; Sacks et al., *Circulation*, 2000, 102: 1886-1892; Lee et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23: 853-858; Lee et al., *Hepatology*, 2011, 54: 1650-1660), mientras que se encontró que una mutación nula en ApoCIII humano confiere un perfil lipídico plasmático favorable y cardioprotección (Pollin et al., *Science*, 2008, 322: 1702-1705) lo que lleva a suponer que la disminución de los niveles de ApoCIII mejoraría ciertas enfermedades asociadas con ApoCIII elevado o mejoraría los marcadores fisiológicos de enfermedades como la resistencia a la insulina.

20

25

30

[0004] Sin embargo, la relación entre ApoCIII y la enfermedad es complicada. Por ejemplo, algunos estudios han sugerido que disminuir los niveles de ApoCIII no necesariamente mejoraría la resistencia a la insulina en un sujeto. No se encontró que los ratones hipertriglicéridémicos transgénicos para el gen ApoCIII humano fueran resistentes a la insulina (Reaven et al., *J. Lipid Res*, 1994, 35: 820-824). Sin embargo, un estudio diferente en ratones transgénicos ApoCIII encontró resistencia severa a la insulina hepática pero ningún cambio periférico de resistencia a la insulina (Lee et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23: 853-858; Lee et al., *Hepatology*, 2011, 54: 1650-1660). Además, en un modelo knockout de ApoCIII de ratón, la obesidad y la resistencia a la insulina aumentaron (Duivenvoorden et al., *Diabetes*, 2005, 54: 664-671). Por consiguiente, se necesitan más estudios para determinar si los efectos de la disminución de las concentraciones de ApoCIII sería mejorar enfermedades asociadas con ApoCIII elevada tal como la diabetes, o el riesgo de la diabetes, o mejorar los marcadores fisiológicos de la enfermedad, tales como resistencia a la insulina.

35

40

[0005] La tecnología antisentido está emergiendo como un medio eficaz para reducir la expresión de ciertos productos génicos y puede resultar de una utilidad única en una serie de aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y de investigación para la modulación de ApoCIII. Se han descrito previamente compuestos antisentido dirigidos a ApoCIII y métodos asociados para inhibir ApoCIII (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 7.598.227, la Patente de Estados Unidos 7.750.141, la publicación PCT WO 2004/093783 y la publicación PCT WO 2012/149495). Se ha probado un compuesto antisentido dirigido a ApoCIII, ISIS-APOCIII_{Rx}, en un ensayo clínico de fase I y se demostró que es seguro. Actualmente, ISIS-APOCIII_{Rx} se encuentra en ensayos clínicos de fase II para evaluar su efectividad en el tratamiento de la hipertriglicéridemia. Sin embargo, todavía existe la necesidad de proporcionar opciones de tratamiento adicionales y más potentes para los sujetos que tienen o tienen riesgo de diabetes. Graham y *col.* analiza la inhibición antisentido de oligonucleótidos de ApoCIII reduciendo los triglicéridos plasmáticos en roedores, primates no humanos y humanos.

45

50

Sumario de la invención

55

[0006] La invención proporciona un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido 12-30 nucleobases de longitud de segmentación ApoCIII para uso en un método de tratamiento de:

60

(a) un sujeto diabético o un sujeto en riesgo de diabetes, en el que el tratamiento comprende la mejora del perfil de diabetes del sujeto en el que se mejora el índice de sensibilidad a la insulina, la tasa de eliminación de glucosa, la MCR de glucosa, el metabolismo de la glucosa: la relación de insulina; en donde los ácidos grasos libres, triglicéridos, no HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contiene VLDL, ApoB y LDL-C se reducen y HDL-C aumenta, o

65

(b) un sujeto diabético al mejorar la sensibilidad a la insulina.

[0007] La invención proporciona además un oligonucleótido antisentido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4 para su uso en un método de tratamiento de:

5 (a) un sujeto diabético o un sujeto en riesgo de diabetes, en el que el tratamiento comprende la mejora del perfil diabetes del sujeto en el que se mejora el índice de sensibilidad a la insulina, la tasa de eliminación de glucosa, la MCR de glucosa, el metabolismo de la glucosa: la relación de insulina; en donde los ácidos grasos libres, triglicéridos, no HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contiene VLDL, ApoB y LDL-C se reducen y aumenta HDL-C; o

10 (b) un sujeto diabético mejorando la sensibilidad a la insulina

en donde el oligonucleótido antisentido comprende:

15 (a) un segmento de separación que consiste en 10 desoxinucleósidos unidos;
 (b) un segmento de ala 5' que consiste en 5 nucleósidos unidos;
 (c) un segmento de ala 3' que consiste en 5 nucleósidos unidos;

20 en donde el segmento de separación se coloca inmediatamente adyacente ay entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, en donde cada citosina es una 5-metilcitosina, en donde cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato.

[0008] La invención proporciona además una composición que comprende el compuesto o oligonucleótido antisentido de acuerdo con la presente invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, para uso en un método de tratamiento de:

25 (a) un sujeto diabético o un sujeto con riesgo de diabetes, en el que el tratamiento comprende mejorar el perfil de diabetes del sujeto en el que se mejora el índice de sensibilidad a la insulina, la tasa de eliminación de glucosa, la MCR de glucosa, el metabolismo de la glucosa: la proporción de insulina; en donde los ácidos grasos libres, triglicéridos, no HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contiene VLDL, ApoB y LDL-C se reducen y aumenta HDL-C; o
 30 (b) un sujeto diabético mejorando la sensibilidad a la insulina.

Sumario de la divulgación

35 [0009] En este documento se describe un método para mejorar la sensibilidad a la insulina que comprende, seleccionar un sujeto con diabetes y administrar un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido de 12-30 nucleobases en longitud que se dirige a ApoCIII mejorando así la sensibilidad a la insulina. En ciertos casos, la sensibilidad a la insulina es la sensibilidad periférica a la insulina. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada.

40 [0010] Se describe aquí un método para disminuir los ácidos grasos libres que comprende la selección de un sujeto con diabetes y administración de un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido de 12-30 nucleobases de longitud de segmentación ApoCIII, lo que reduce los ácidos grasos libres. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada.

45 [0011] Se describe aquí un método para reducir la deposición de triglicéridos intramiocelulares que comprende la selección de un sujeto con diabetes y la administración de un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido de 12-30 nucleobases de longitud de segmentación ApoCIII, reduciendo de ese modo la deposición de triglicéridos intramiocelulares. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada.

50 [0012] Se describe aquí un método para mejorar un perfil de lípidos de un sujeto que comprende la administración de un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido 12-30 nucleobases de longitud de segmentación ApoCIII, en la que ácidos grasos libres, triglicéridos, no-HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contiene VLDL, ApoB y LDL-C se reducen y aumenta HDL-C, mejorando así el perfil lipídico del sujeto.

55 [0013] Se describe aquí un método para mejorar un perfil de la diabetes de un sujeto que comprende administrar un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido 12-30 nucleobases de longitud de segmentación ApoCIII, en donde el índice de sensibilidad a la insulina, tasa de eliminación de glucosa, glucosa MCR, metabolismo de la glucosa: ración insulina se mejora en donde los ácidos grasos libres, la deposición de triglicéridos intramiocelulares, los triglicéridos, no HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contiene VLDL, ApoB y LDL-C se reducen y aumenta el HDL-C, mejorando así el perfil de diabetes del sujeto.

60 [0014] En ciertos casos, el sujeto está en una dosis estable de metformina.

65 [0015] En ciertos casos, el sujeto tiene niveles de triglicéridos de ayuno de ≥ 200 y ≤ 500 mg/dl.

[0016] En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido tiene una secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias establecidas en el N° de Acceso GenBank NM_000040.1 (incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 1), n° de acceso GenBank NT_033899.8 truncado de los nucleótidos 20262640 a 20266603 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 2), y n° de acceso GenBank NT_035088.1 truncado de los nucleótidos 6238608 a 6242565 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 3). En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido es al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 100% complementario a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

[0017] En ciertas realizaciones, los comprende oligonucleótidos antisentido de al menos 8 nucleobases de la secuencia de SEQ ID NO: 4. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido consiste de la secuencia de SEQ ID NO: 4.

[0018] En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 nucleobases contiguas de una secuencia seleccionada de cualquier secuencia dada a conocer en la patente US 7.598.227, la patente US 7.750.141, la Publicación PCT WO 2004/093783 o la Publicación PCT WO 2012/149495. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido tiene una secuencia seleccionada de cualquier secuencia descrita en la Patente de Estados Unidos 7.598.227, la Patente de Estados Unidos 7.750.141, la Publicación PCT WO 2004/093783 o la Publicación PCT WO 2012/149495.

Descripción detallada de la invención

[0019] En este documento, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. Como se usa en este documento, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluido", así como otras formas, como "incluye" e "incluido", no es limitante. Además, términos como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Definiciones

[0020] A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son los bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Se pueden usar técnicas estándar para la síntesis química y el análisis químico.

[0021] A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

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

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

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

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

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

"Acerca de" significa dentro de \pm 10% de un valor. Por ejemplo, si se indica, "un marcador puede incrementarse en aproximadamente un 50%", se implica que el marcador puede incrementarse entre 45% - 55%.

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

"Región diana activa" o "región diana" significa una región a la que se dirige uno o más compuestos antisentido activos.

"Compuestos antisentido activos" se refiere a los compuestos antisentido que reducen los niveles de ácido nucleico o los niveles de proteína diana.

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

"Administrar" significa proporcionar un agente farmacéutico a un individuo 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 para su uso según la invención. Por ejemplo, un primer agente puede ser un oligonucleótido antisentido dirigido a ApoCIII.

5 "Segundo agente" significa un segundo compuesto terapéutico para usar de acuerdo con la invención (por ejemplo, un segundo oligonucleótido antisentido dirigido a ApoCIII) y/o un compuesto terapéutico dirigido a no ApoCIII.

"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 puede determinarse mediante medidas subjetivas u objetivas, que son conocidas por los expertos en la materia.

10 "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 medible atribuible a la hibridación de un compuesto antisentido a su ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, la actividad antisentido es una disminución en la cantidad o expresión de un ácido nucleico o proteína diana codificado por dicho ácido nucleico diana.

15 "Compuesto antisentido" significa un compuesto oligomérico que es capaz de experimentar hibridación con un ácido nucleico diana a través de enlaces de hidrógeno. Los ejemplos de compuestos antisentido incluyen compuestos monocatenarios y bicatenarios, tales como oligonucleótidos antisentido, siARNs, shARNs, ssARNi y compuestos basados en la ocupación.

20 "Inhibición antisentido" significa la reducción de los niveles de ácido nucleico diana o los niveles de proteína diana en presencia de un compuesto antisentido complementario a un ácido nucleico diana en comparación con los niveles de ácido nucleico diana o los niveles de proteína diana en ausencia del compuesto antisentido. Oligonucleótido antisentido significa un oligonucleótido monocatenario que tiene una secuencia de nucleobase que permite la hibridación a una región o segmento correspondiente de un ácido nucleico diana. Como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido antisentido" abarca derivados farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en el presente documento.

25 "ApoCIII", "Apolipoproteína C-III" o "ApoC3" significa cualquier secuencia de ácido nucleico o proteína que codifica ApoCIII. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ApoCIII incluye una secuencia de ADN que codifica ApoCIII, una secuencia de ARN transcrita a partir de ADN que codifica ApoCIII (que incluye ADN genómico que comprende intrones y exones), una secuencia de ARNm que codifica ApoCIII o una secuencia de péptidos que codifica ApoCIII.

30 "Inhibidor específico de ApoCIII" se refiere a cualquier agente capaz de inhibir específicamente la expresión de ARNm de ApoCIII y/o la expresión o actividad de la proteína ApoCIII a nivel molecular. Por ejemplo, los inhibidores específicos de ApoCIII incluyen ácidos nucleicos (incluidos compuestos antisentido), péptidos, anticuerpos, moléculas pequeñas y otros agentes capaces de inhibir la expresión de ARNm de ApoCIII y/o proteína ApoCIII. En ciertos casos de la divulgación, el ácido nucleico es un compuesto antisentido. El compuesto antisentido es un oligonucleótido dirigido a ApoCIII. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido dirigido a ApoCIII es un oligonucleótido modificado dirigido a ApoCIII. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido dirigido a ApoCIII tiene una secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 4 u otra secuencia, por ejemplo, como las descritas en la Patente de Estados Unidos 7.598.227, Patente de Estados Unidos 7.750.141, Publicación PCT WO 2004/093783 o Publicación PCT WO 2012/149495. En ciertas realizaciones, modulando específicamente el nivel de ARNm de ApoCIII y/o la expresión de la proteína ApoCIII, los inhibidores específicos de ApoCIII pueden afectar los componentes de la ruta lipogénica o glucogénica. De manera similar, en ciertas realizaciones, los inhibidores específicos de ApoCIII pueden afectar otros procesos moleculares en un animal.

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

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

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

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

55 "Enfermedad cardiovascular" o "trastorno cardiovascular" se refiere a un grupo de afecciones relacionadas con el corazón, los vasos sanguíneos o la circulación. Los ejemplos de enfermedades cardiovasculares incluyen, entre otros, aneurisma, angina, arritmia, aterosclerosis, enfermedad cerebrovascular (accidente cerebrovascular), enfermedad coronaria, hipertensión, dislipidemia, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia.

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

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

"Colesterol" es una molécula de esteroides que se encuentra en las membranas celulares de todos los tejidos

animales. El colesterol debe ser transportado en el plasma sanguíneo de un animal por lipoproteínas que incluyen lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de densidad intermedia (IDL), lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL).

"Colesterol en plasma" se refiere a la suma de todas las lipoproteínas (VLDL, IDL, LDL, HDL) colesterol esterificado y/o no esterificado presente en el plasma o suero.

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

"Administración conjunta" significa la administración de dos o más agentes a un individuo. Los dos o más agentes pueden estar en una única composición farmacéutica, o pueden estar en composiciones farmacéuticas separadas. Cada uno de los dos o más agentes se puede administrar a través de la misma o diferentes vías de administración. La coadministración abarca la administración paralela o secuencial.

"Complementariedad" significa la capacidad de emparejamiento entre nucleobases de un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico. En ciertas realizaciones, la complementariedad entre el primer y el segundo ácido nucleico puede estar entre dos cadenas de ADN, entre dos cadenas de ARN, o entre una cadena de ADN y una de ARN. En ciertas realizaciones, algunas de las nucleobases en una cadena están adaptadas a una base de enlace de hidrógeno complementaria en la otra cadena. En ciertas formas de realización, todas las nucleobases en una cadena se hacen coincidir con una base de enlaces de hidrógeno complementario en la otra hebra. En ciertas realizaciones, un primer ácido nucleico es un compuesto antisentido y un segundo ácido nucleico es un ácido nucleico diana. En ciertas de tales realizaciones, un oligonucleótido antisentido es un primer ácido nucleico y un ácido nucleico diana es un segundo ácido nucleico.

"Nucleobases contiguas" significa nucleobases inmediatamente adyacentes entre sí.

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

"Reactivo cruzado" significa que un compuesto oligomérico dirigido a una secuencia de ácido nucleico puede hibridarse con una secuencia de ácido nucleico diferente. Por ejemplo, en algunos casos, un oligonucleótido antisentido dirigido a ApoCIII humano puede reaccionar de forma cruzada con un ApoCIII murino. El hecho de que un compuesto oligomérico reaccione de forma cruzada con una secuencia de ácido nucleico distinta de su objetivo designado depende del grado de complementariedad que tenga el compuesto con la secuencia de ácido nucleico no objetivo. Cuanto mayor sea la complementariedad entre el compuesto oligomérico y el ácido nucleico no diana, es más probable que el compuesto oligomérico reaccione de forma cruzada con el ácido nucleico.

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

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

"Diabetes mellitus" o "diabetes" es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por un metabolismo desordenado y un nivel de azúcar en sangre anormalmente alto (hiperglucemia) como resultado de niveles insuficientes de insulina o sensibilidad reducida a la insulina. Los síntomas característicos son la producción excesiva de orina (poliuria) debido a los altos niveles de glucosa en la sangre, la sed excesiva y el aumento de la ingesta de líquidos (polidipsia) que intentan compensar el aumento de la micción, visión borrosa debido a los altos efectos de la glucosa en la sangre en la óptica del ojo, pérdida de peso inexplicable y letargo. Hay 3 formas principales de diabetes: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y diabetes gestacional. Diabetes tipo 1 es el resultado de la incapacidad del cuerpo para producir insulina, y actualmente requiere que la persona se inyecte insulina o use una bomba de insulina. Esta forma se denominaba anteriormente "diabetes mellitus insulino dependiente" (IDDM) o "diabetes juvenil". Diabetes tipo 2 es el resultado de la resistencia a la insulina, una condición en la cual las células no usan la insulina adecuadamente, a veces combinada con una deficiencia absoluta de insulina. Esta forma se denominaba anteriormente diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM) o "diabetes de inicio en adultos". La tercera forma principal, la diabetes gestacional ocurre cuando las mujeres embarazadas sin un diagnóstico previo de diabetes desarrollan un nivel alto de glucosa en la sangre. Puede preceder al desarrollo de diabetes tipo 2. La diabetes se puede medir mediante varios parámetros: porcentaje de albúmina glicosilada, fructosamina y porcentaje de niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c). Como se usa en este documento, un sujeto tiene "diabetes bien controlada" o "prediabetes" si el nivel de HbA1c está por debajo del 7%, "diabetes moderadamente controlada" o "diabetes moderada" si el nivel de HbA1c está entre aproximadamente el 7-9% y "no controlado diabetes" o "diabetes grave" si el nivel de HbA1c es superior al 9%.

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

"Perfil diabético" o "perfil de diabetes" significa un resumen del estado diabético de un sujeto medido por un panel de marcadores fisiológicos. Los marcadores fisiológicos que pueden evaluarse como parte de un perfil diabético incluyen, entre otros, porcentaje de albúmina glicosilada, niveles de fructosamina, porcentaje de hemoglobina glicosilada (HbA1c), índice de sensibilidad a la insulina, sensibilidad a la insulina periférica, sensibilidad a la insulina hepática, sensibilidad a la insulina pancreática, tasa de eliminación de glucosa, glucosa MCR, metabolismo de la glucosa: ración de insulina, ácidos grasos libres, triglicéridos, no HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contiene VLDL, apoB y LDL-C; y HDL-C. Un "perfil diabético mejorado" puede incluir uno o más de: índice de sensibilidad a la insulina mejorado, sensibilidad a la insulina periférica, sensibilidad

a la insulina hepática, sensibilidad a la insulina pancreática, tasa de eliminación de glucosa, MCR de glucosa, metabolismo de la glucosa: ración de insulina; ácidos grasos libres reducidos, triglicéridos, no HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contiene VLDL, apoB, LDL-C, porcentaje de albúmina glicosilada, niveles de fructosamina, porcentaje de hemoglobina glicosilada (HbA1c); y aumento de HDL.

5 "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.

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

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

20 "Dosis" significa una cantidad especificada de un agente farmacéutico proporcionado en una sola administración, o en un período de tiempo especificado. En ciertas realizaciones, una dosis puede administrarse en uno, dos o más bolos, tabletas o inyecciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones donde se desea la administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen que no se acomoda fácilmente con una sola inyección, por lo tanto, se pueden usar dos o más inyecciones para lograr la dosis deseada. En ciertas realizaciones, el agente farmacéutico se administra por infusión durante un período de tiempo prolongado o de forma continua. Las dosis se pueden indicar como la cantidad de agente farmacéutico por hora, día, semana o mes. Las dosis también se pueden establecer como mg/kg o g/kg.

25 "Cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" significa 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 los individuos dependiendo de la salud y la condición física del individuo a ser tratado, el grupo taxonómico de los individuos a ser tratados, la formulación de la composición, la evaluación de la condición médica del individuo y otros factores relevantes.

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

35 "Gápmero" significa un compuesto antisentido quimérico en donde una región interna que tiene una pluralidad de nucleósidos que soportan la escisión de RNasa H se coloca entre regiones externas que tienen uno o más nucleósidos, en donde los nucleósidos que comprenden la región interna son químicamente distintos del nucleósido o nucleósidos que comprenden las regiones externas. La región interna puede denominarse "espacio" o "segmento de espacio" y las regiones externas pueden denominarse "alas" o "segmentos de ala".

40 "Ampliado por espacio" significa un compuesto antisentido quimérico que tiene un segmento de espacio de 12 o más 2'-desoxirribonucleósidos contiguos colocados entre e inmediatamente adyacentes a segmentos de ala 5' y 3' que tienen de uno a seis nucleósidos.

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

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

45 "Lipoproteína de alta densidad" o "HDL" se refiere a un complejo macromolecular de lípidos (colesterol, triglicéridos y fosfolípidos) y proteínas (apolipoproteínas (apo) y enzimas). La superficie de HDL contiene principalmente apolipoproteínas A, C y E. La función de algunas de estas apoproteínas es dirigir el HDL desde los tejidos periféricos al hígado. Los niveles séricos de HDL pueden verse afectados por causas genéticas subyacentes (Weissglas-Volkov y Pajukanta, J Lipid Res, 2010, 51: 2032-2057). Los estudios epidemiológicos han indicado que los niveles elevados de HDL protegen contra las enfermedades cardiovasculares o las enfermedades coronarias (Gordon et al., Am. J. Med. 1977, 62: 707-714). Estos efectos de HDL son independientes de las concentraciones de triglicéridos y LDL. En la práctica clínica, un HDL bajo en plasma se asocia más comúnmente con otros trastornos que aumentan los triglicéridos en plasma, por ejemplo, obesidad central, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad renal (insuficiencia renal crónica o proteinuria nefrótica) (Kashyap. Am. J. Cardiol. 1998, 82: 42U-48U).

55 "Colesterol-lipoproteína de alta densidad" o "HDL-C" significa colesterol asociado con partículas de lipoproteína de alta densidad. La concentración de HDL-C en suero (o plasma) generalmente se cuantifica en mg/dL o nmol/L.

"HDL-C" y "plasma HDL-C" significan HDL-C en suero y plasma, respectivamente.

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

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

"Hiperlipidemia" o "hiperlipemia" es una afección caracterizada por lípidos séricos elevados o lípidos

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

"Hipertrigliceridemia" significa una condición caracterizada por niveles elevados de triglicéridos. La hipertrigliceridemia es la consecuencia del aumento de la producción y/o catabolismo reducido o retrasado de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG): VLDL y, en menor medida, quilomicrones (CM). Su etiología incluye factores primarios (es decir, causas genéticas) y secundarios (otras causas subyacentes como diabetes, síndrome metabólico/resistencia a la insulina, obesidad, inactividad física, tabaquismo, exceso de alcohol y una dieta muy alta en carbohidratos) o, con mayor frecuencia, una combinación de ambos (Yuan et al. *CMAJ*, 2007, 176: 1113-1120). La hipertrigliceridemia es un rasgo clínico común asociado con un mayor riesgo de enfermedad cardiometabólica (Hegele et al. 2009, *Hum Mol Genet*, 18: 4189-4194; Hegele y Pollex 2009, *Mol Cell Biochem*, 326: 35-43), así como de aparición de pancreatitis aguda en las formas más graves (Toskes 1990, *Gastroenterol Clin North Am*, 19: 783-791; Gaudet et al. 2010, *Atherosclerosis Supplements*, 11: 55-60; Catapano et al. 2011, *Atherosclerosis*, 217S: S1 -S44; Tremblay et al. 2011, *J Clin Lipidol*, 5: 37-44). Los ejemplos de enfermedad cardiometabólica incluyen, entre otros, diabetes, síndrome metabólico/resistencia a la insulina y trastornos genéticos como la quilomiconemia familiar, hiperlipidemia familiar combinada e hipertrigliceridemia familiar. Altos niveles límite de TG (150-199 mg/dL) se encuentran comúnmente en la población general y son un componente común de los estados de resistencia/síndrome de insulina metabólicos. Lo mismo es cierto para los niveles altos de TG (200-499 mg/dL), excepto que a medida que aumentan los niveles de TG en plasma, los factores genéticos subyacentes juegan un papel etiológico cada vez más importante. Los niveles muy altos de TG (≥ 500 mg/dL) también se asocian con mayor frecuencia con niveles elevados de CM, y se acompañan de un mayor riesgo de pancreatitis aguda. El riesgo de pancreatitis se considera clínicamente significativo si los niveles de TG superan los 880 mg/dL (> 10 mmol) y las directrices de la común (EAS/ESC) 2011 establecen que las acciones para prevenir la pancreatitis aguda son obligatorias (Catapano et al. 2011, *Atherosclerosis*, 217S: S1-S44). De acuerdo con las directrices de EAS/ESC 2011, la hipertrigliceridemia es la causa de aproximadamente el 10% de todos los casos de pancreatitis, y el desarrollo de pancreatitis puede ocurrir a niveles de TG entre 440-880 mg/dL. Según las pruebas de los estudios clínicos que demuestran que los niveles elevados de TG son un factor de riesgo independiente para la ECV ateroesclerótica, las directrices del National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP 2002, *Circulation*, 106: 3143-421) y la American Diabetes Association (ADA 2008, *Diabetes Care*, 31: S12-S54) recomiendan un nivel diana de TG inferior a 150 mg/dL para reducir el riesgo cardiovascular.

"Identificar" o "diagnosticar" un animal con una enfermedad, trastorno o afección nombrada significa identificar, por métodos conocidos en la técnica, un sujeto propenso o que tiene la enfermedad, trastorno o afección nombrada. Por ejemplo, la identificación de sujetos con una enfermedad puede realizarse mediante un examen del historial médico del sujeto junto con cualquier técnica de detección conocida en la técnica, por ejemplo, detección genética o detección de niveles de glucosa o hemoglobina glucosilada (HbA1c). Identificar o diagnosticar un animal con enfermedad metabólica o cardiovascular significa identificar a un sujeto propenso o que tiene una enfermedad metabólica, una enfermedad cardiovascular o un síndrome metabólico; o, identificar a un sujeto que tenga algún síntoma de una enfermedad metabólica, enfermedad cardiovascular o síndrome metabólico que incluya, entre otros, hipercolesterolemia, hiperglucemia, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, hipertensión, aumento de la resistencia a la insulina, disminución de la sensibilidad a la insulina, disminución del peso corporal por encima de lo normal, y/o por encima del contenido normal de grasa corporal o cualquier combinación de los mismos. Dicha identificación se puede lograr mediante cualquier método, que incluye, entre otros, pruebas o evaluaciones clínicas estándar, como medir el suero o el colesterol circulante (plasma), medir el suero o la glucosa en sangre circulante (plasma), medir el suero o circular (plasma) HbA1c, que mide los triglicéridos en suero o en circulación (plasma), mide la presión sanguínea, mide el contenido de grasa corporal, mide el peso corporal y similares.

"Resultado cardiovascular mejorado" significa una reducción en la ocurrencia de eventos cardiovasculares adversos, o el riesgo de los mismos. Los ejemplos de eventos cardiovasculares adversos incluyen, entre otros, muerte, reinfarto, accidente cerebrovascular, shock cardiogénico, edema pulmonar, paro cardíaco y disritmia auricular.

"Resultado metabólico mejorado", "trastorno metabólico mejorado" o "enfermedad metabólica mejorada" significa una reducción en la aparición de eventos metabólicos adversos, o el riesgo de los mismos. Los ejemplos de eventos metabólicos adversos incluyen, sin limitación, niveles elevados de glucosa, niveles elevados de HbA1c, aumento de la resistencia a la insulina, disminución de la sensibilidad a la insulina y mayor riesgo o desarrollo de diabetes.

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

"Aumentar HDL" o "alzar HDL" significa aumentar el nivel de HDL en un animal después de la administración de al menos un compuesto para su uso según la invención, en comparación con el nivel de HDL en un animal al que no se le administró ningún compuesto. "Individual" o "sujeto" o "animal" significa un animal humano o

no humano seleccionado para tratamiento o terapia.

"Inducir", "inhibir", "potenciar", "elevar", "aumentar", "disminuir", "reducir" o similares denotan diferencias cuantitativas entre dos estados. Por ejemplo, "una cantidad eficaz para inhibir la actividad o expresión de ApoCIII" significa que el nivel de actividad o expresión de ApoCIII en una muestra tratada será diferente del nivel de actividad o expresión de ApoCIII en una muestra no tratada. Dichos términos se aplican, por ejemplo, a niveles de expresión y niveles de actividad.

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

"Resistencia a la insulina" se define como la condición en la cual las cantidades normales de insulina son inadecuadas para producir una respuesta normal a la insulina de las células de grasa, músculo e hígado. La resistencia a la insulina en las células grasas produce la hidrólisis de los triglicéridos almacenados, lo que eleva los ácidos grasos libres en el plasma sanguíneo. La resistencia a la insulina en el músculo reduce la absorción 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 la diabetes tipo 2.

"Sensibilidad a la insulina" es una medida de la eficacia con que un individuo procesa la glucosa. Un individuo que tiene alta sensibilidad a la insulina procesa efectivamente la glucosa, mientras que un individuo con baja sensibilidad a la insulina no procesa efectivamente la glucosa. Los diversos tipos de sensibilidad a la insulina (que incluyen, por ejemplo, "sensibilidad a la insulina hepática", "sensibilidad a la insulina periférica" y "sensibilidad a la insulina pancreática") se refieren al tipo de tejido en donde se produce la sensibilidad a la insulina. La sensibilidad a la insulina en un tipo de tejido no necesariamente indica sensibilidad a la insulina en otro tipo de tejido (Faerch et al., J Physiol., 2010, 588: 759-764). Una disminución en la sensibilidad periférica a la insulina puede afectar el control de la glucosa en pacientes con diabetes moderada más que la sensibilidad hepática a la insulina. Una disminución en la sensibilidad a la insulina hepática puede estar afectando el control de la glucosa en pacientes con diabetes severa más que la sensibilidad periférica a la insulina. En consecuencia, un medicamento que afecta más específicamente a un tipo de sensibilidad a la insulina puede ser útil para tratar la diabetes moderada versus severa. Por ejemplo, un medicamento que aumenta la sensibilidad periférica a la insulina puede ser más útil para mejorar la diabetes moderada en un paciente, mientras que un medicamento que aumenta la sensibilidad a la insulina hepática puede ser más útil para mejorar la diabetes severa en un paciente porque el hígado juega un papel más importante en causar hiperglucemia en ayunas en pacientes con diabetes severa en comparación con aquellos con diabetes leve a moderada.

"Enlace internucleosídico" se refiere al enlace químico entre nucleósidos.

"Administración intravenosa" significa administración en una vena. Nucleósidos unidos significa nucleósidos adyacentes que están unidos entre sí.

"Reducción de lípidos" significa una reducción en uno o más lípidos en un sujeto.

"Aumento de lípidos" significa un aumento de un lípido (p. ej., HDL) en un sujeto. La disminución o aumento de lípidos puede ocurrir con una o más dosis con el tiempo.

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

"Perfil lipídico" significa un resumen del estado lipídico de un sujeto medido por un panel de marcadores fisiológicos. Los marcadores fisiológicos que pueden evaluarse como parte de un perfil lipídico incluyen, pero no se limitan a, TG, no HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contiene VLDL, ApoB, LDL-C y HDL-C. Un "perfil lipídico mejorado" puede incluir uno o más de: disminución de TG, no HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contiene VLDL, ApoB y LDL-C; y aumento de HDL.

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

"Lipasa de lipoproteína" o "LPL" se refiere a una enzima que hidroliza los TG que se encuentran en las lipoproteínas, como CM o VLDL, en ácidos grasos libres y monoacilglicerol. LPL requiere apo C-II como cofactor para funcionar en la hidrolización de TG. La LPL se produce principalmente en el músculo esquelético, el tejido adiposo y el músculo cardíaco. La hidrólisis y la eliminación de TG de CM y VLDL normalmente protegen contra el aumento posprandial excesivo de la masa de CM y TG.

"Lipoproteína-colesterol de baja densidad (LDL-C)" significa colesterol transportado en partículas de lipoproteína de baja densidad. La concentración de LDL-C en suero (o plasma) generalmente se cuantifica en mg/dL o nmol/L.

"LDL-C en suero" y "LDL-C en plasma" significan LDL-C en suero y plasma, respectivamente. Los "principales factores de riesgo" se refieren a factores que contribuyen a un alto riesgo de una enfermedad o afección en particular. Por ejemplo, los principales factores de riesgo para la enfermedad coronaria incluyen, entre otros, fumar cigarrillos, hipertensión, baja HDLC, antecedentes familiares de enfermedad coronaria, edad y otros factores descritos en este documento.

"Trastorno metabólico" o "enfermedad metabólica" se refiere a una afección caracterizada por una alteración o alteración de la función metabólica. "Metabólico" y "metabolismo" son términos bien conocidos en la técnica y generalmente incluyen toda la gama de procesos bioquímicos que ocurren dentro de un organismo vivo.

5 Los trastornos o enfermedades metabólicas incluyen, pero no se limitan a, hiperglucemia, prediabetes, diabetes (tipo 1 y tipo 2), obesidad, resistencia a la insulina, síndrome metabólico y dislipidemia debido a la diabetes tipo 2.

"Síndrome metabólico" significa una condición caracterizada por una agrupación de factores de riesgo cardiovascular lípidos y no lípidos de origen metabólico. En ciertos casos de la divulgación, el síndrome metabólico se identifica por la presencia de 3 de los siguientes factores: circunferencia de la cintura mayor de 102 cm en hombres o mayor de 88 cm en mujeres; triglicéridos séricos de al menos 150 mg/dL; HDL-C

10 menos de 40 mg/dL en hombres 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 pueden medirse fácilmente en la práctica clínica (JAMA, 2001, 285: 2486-2497).

"No coincidencia" o "nucleobase no complementaria" se refiere al caso en que una nucleobase de un primer ácido nucleico no es capaz de emparejarse con la nucleobase correspondiente de un segundo ácido nucleico u objetivo.

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

"Enlace internucleosídico modificado" se refiere a una sustitución o cualquier cambio de un enlace internucleosídico natural. Por ejemplo, un enlace de fosforotioato es un enlace internucleosídico modificado.

20 Nucleobase modificada se refiere a cualquier nucleobase distinta de adenina, citosina, guanina, timidina o uracilo. Por ejemplo, la 5-metilcitosina es una nucleobase modificada.

"Nucleobase no modificada" significa las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U).

"Nucleósido modificado" significa un nucleósido que tiene al menos un resto de azúcar modificado, y/o nucleobase modificada.

25 "Nucleótido modificado" significa un nucleótido que tiene al menos un resto de azúcar modificado, enlace internucleosídico modificado y/o nucleobase 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. Por ejemplo, un azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo es un azúcar modificado.

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

"Enlace internucleosídico 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).

"Ácido nucleico" se refiere a moléculas compuestas de nucleótidos monoméricos. Un ácido nucleico incluye

35 ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos nucleicos monocatenarios (ADNss), ácidos nucleicos bicatenarios (dsADN), pequeños ácidos ribonucleicos interferentes (siARN) y microARNs (miARN). Un ácido nucleico también puede comprender una combinación de estos elementos en una sola molécula.

"Nucleobase" significa un resto heterocíclico capaz de emparejarse con una base de otro nucleico ácido.

40 "Complementariedad de nucleobase" se refiere a una nucleobase que es capaz de emparejar bases con otra nucleobase. Por ejemplo, en el ADN, la adenina (A) es complementaria a la timina (T). Por ejemplo, en el ARN, la adenina (A) es complementaria a uracilo (U). En ciertas realizaciones, nucleobase complementaria se refiere a una nucleobase de un compuesto antisentido que es capaz de emparejarse con una nucleobase de su ácido nucleico diana. Por ejemplo, si una nucleobase en una determinada posición de un compuesto

45 antisentido es capaz de unirse por hidrógeno con una nucleobase en una determinada posición de un ácido nucleico diana, entonces el oligonucleótido y el ácido nucleico diana se consideran complementarios en ese par de nucleobases.

"Secuencia de nucleobase" significa el orden de nucleobases contiguas independientes de cualquier azúcar, enlace o modificación de nucleobase.

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

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

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

"Mimético de nucleótidos" 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).

60 "Compuesto oligomérico" u "oligómero" significa un polímero de subunidades monoméricas unidas que es capaz de hibridarse con una región de una molécula de ácido nucleico. En ciertos casos de la divulgación, los compuestos oligoméricos son oligonucleósidos. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos. En ciertos casos de la divulgación, los compuestos oligoméricos son compuestos antisentido. En ciertos casos de la divulgación, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos antisentido.

65 En ciertos casos de la divulgación, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos quiméricos.

"Oligonucleótido" significa un polímero de nucleósidos unidos, cada uno de los cuales puede modificarse o

no modificarse, independientemente uno del otro.

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

"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, un oligonucleótido antisentido dirigido a ApoCIII es un agente farmacéutico.

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

"Vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un medio o diluyente que no interfiere con la estructura del compuesto. Algunos de estos vehículos permiten formular composiciones farmacéuticas como, por ejemplo, tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lodos, suspensiones y pastillas para la ingestión oral de un sujeto. Ciertos de dichos vehículos permiten formular composiciones farmacéuticas para inyección, infusión o administración tópica. Por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser una solución acuosa estéril. "Derivado farmacéuticamente aceptable" o "sales" abarca derivados de los compuestos descritos en el presente documento tales como solvatos, hidratos, ésteres, profármacos, polimorfos, isómeros, variantes marcadas isotópicamente, sales farmacéuticamente aceptables y otros derivados conocidos en la técnica.

"Sales farmacéuticamente aceptables" significa sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de compuestos antisentido, es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparten efectos toxicológicos no deseados al mismo. El término "sal farmacéuticamente aceptable" o "sal" incluye una sal preparada a partir de ácidos o bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables, que incluyen ácidos y bases inorgánicas u orgánicas. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en este documento pueden prepararse por métodos bien conocidos en la técnica. Para una revisión de las sales farmacéuticamente aceptables, consulte 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 están bien aceptadas para la administración terapéutica en humanos. Por consiguiente, en una realización, los compuestos descritos en el presente documento están en forma de una sal de sodio.

"Enlace de fosforotioato" significa un enlace entre nucleósidos donde el enlace fosfodiéster se modifica al reemplazar uno de los átomos de oxígeno que no forman puentes con un átomo de azufre. Un enlace de fosforotioato es un enlace internucleosídico modificado. Porción significa un número definido de nucleobases contiguas (es decir, unidas) de un ácido nucleico. En ciertas realizaciones, una porción es un número definido de nucleobases contiguas de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, una porción es un número definido de nucleobases 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 una forma inactiva que se convierte en una forma activa (es decir, un medicamento) dentro del cuerpo o las células del mismo por la acción de enzimas endógenas u otras sustancias químicas o afecciones.

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

"Relación de TG a HDL" significa los niveles de TG en relación con los niveles de HDL. La aparición de TG alto y/o HDL bajo se ha relacionado con la incidencia, los resultados y la mortalidad de la enfermedad cardiovascular.

"Mejorar la relación de TG a HDL" significa disminuir TG y/o elevar los niveles de HDL.

"Reducir" significa reducir en menor medida, tamaño, cantidad o número. Por ejemplo, reducir los niveles de triglicéridos en plasma significa reducir la cantidad de triglicéridos en el plasma. "Región" o "región diana" se define como una porción del ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identificable. Por ejemplo, una región diana puede abarcar una UTR 3', una UTR 5', un exón, un intrón, una unión exón/intrón, una región de codificación, una región de iniciación de la traducción, una región de terminación de la traducción u otra región definida de ácido nucleico. Las regiones estructuralmente definidas para ApoCIII pueden obtenerse mediante el número de acceso a partir de bases de datos de secuencias tales como NCBI. En ciertas realizaciones, una región diana puede abarcar la secuencia desde un sitio diana 5' de un segmento diana dentro de la Región diana hasta un sitio diana 3' de otro segmento diana dentro de la región diana.

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

"Segundo agente" o "segundo agente terapéutico" significa un agente que puede usarse en combinación con un "primer agente". Un segundo agente terapéutico puede incluir, entre otros, un ARNip o un oligonucleótido antisentido que incluye oligonucleótidos antisentido dirigidos a ApoCIII. Un segundo agente también puede incluir anticuerpos anti-ApoCIII, inhibidores del péptido ApoCIII, inhibidores de DGAT1, agentes reductores

del colesterol, agentes reductores de lípidos, agentes reductores de glucosa y agentes antiinflamatorios.

"Segmentos" se definen como sub-porciones más pequeñas de regiones dentro de un ácido nucleico. Por ejemplo, un "segmento diana" significa la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico diana al que se dirige uno o más compuestos antisentido. "Sitio diana 5'" se refiere al nucleótido más 5' de un segmento diana.

"Sitio diana 3'" se refiere al nucleótido más 3' de un segmento diana.

Las versiones "acortadas" o "truncadas" de oligonucleótidos antisentido o ácidos nucleicos diana enseñados en el presente documento tienen uno, dos o más nucleósidos eliminados.

"Efectos secundarios" significa respuestas fisiológicas atribuibles a un tratamiento distinto de los efectos deseados. En ciertas realizaciones, los efectos secundarios incluyen reacciones en el lugar de inyección, anomalías de la prueba de función hepática, anomalías de la función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anomalías del sistema nervioso central, miopatías y malestar general. Por ejemplo, el aumento de los niveles de aminotransferasa en suero puede indicar toxicidad hepática o anomalía de la función hepática. Por ejemplo, el aumento de la bilirrubina puede indicar toxicidad hepática o anomalía de la función hepática. Oligonucleótido monocatenario significa un oligonucleótido que no se hibrida con una cadena complementaria.

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

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

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

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

"Dirigir" 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 "transcripción de ARN diana" se refieren a un ácido nucleico capaz de ser objetivo de compuestos antisentido.

"Cambio terapéutico en el 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 cardiovasculares y/o metabólicas, e incluye recomendaciones para la ingesta dietética de calorías diarias totales, grasas totales, grasas saturadas, grasas poliinsaturadas, grasas monoinsaturadas, carbohidratos, proteínas, colesterol, fibra insoluble, así como Recomendaciones para la actividad física.

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

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

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

"Nucleótido no modificado" significa un nucleótido compuesto de nucleobases, restos de azúcar y enlaces internucleosídicos de origen natural. En ciertas realizaciones, un nucleótido no modificado es un nucleótido de ARN (es decir, β -D-ribonucleósidos) o un nucleótido de ADN (es decir, β -D-desoxirribonucleósido).

"Segmento de ala" significa uno o una pluralidad de nucleósidos modificados para impartir a propiedades de oligonucleótidos tales como actividad inhibidora mejorada, mayor afinidad de unión por un ácido nucleico diana o resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*.

Ciertas formas de realización

[0022] Se describe aquí un inhibidor específico ApoCIII. En ciertos casos de la divulgación, el inhibidor específico de ApoCIII es un ácido nucleico capaz de inhibir la expresión de ApoCIII. En ciertos casos de la divulgación, el ácido nucleico es un compuesto antisentido dirigido a ApoCIII. El compuesto antisentido para su uso según la invención es un oligonucleótido antisentido de 12-30 nucleobases en longitud que se dirige a ApoCIII. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido modificado. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido tiene una secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias establecidas en el N° de acceso GENBANK NM_000040.1 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 1), N° de acceso GENBANK NT_033899.8 truncado de los nucleótidos 20262640 a 20266603 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 2), y N° de acceso GenBank NT_035088.1 truncado de los nucleótidos 6238608 a 6242565 (incorporado aquí como SEQ ID NO: 3). En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido es al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 100% complementario a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. En ciertos casos de la divulgación, los inhibidores específicos de ApoCIII se usan en un sujeto para tratar, prevenir, retrasar y/o mejorar la diabetes. Según la invención, el compuesto antisentido se usa en un método de tratamiento de un sujeto diabético

o un sujeto en riesgo de diabetes mejorando el perfil de diabetes del sujeto en donde el índice de sensibilidad a la insulina, la tasa de eliminación de glucosa, la MCR de glucosa, el metabolismo de la glucosa: insulina la relación se mejora; en donde los ácidos grasos libres, triglicéridos, no HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contienen VLDL, ApoB y LDL-C se reducen y HDL-C aumenta o trata a un sujeto diabético mejorando la sensibilidad a la insulina. En ciertas realizaciones, el sujeto es prediabético. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada. En ciertos casos de la divulgación, los inhibidores específicos de ApoCIII se usan en un sujeto para mejorar la sensibilidad periférica a la insulina, disminuir los ácidos grasos libres, reducir la deposición de triglicéridos intramiocelulares, mejorar el perfil de lípidos y/o mejorar el perfil diabético.

[0023] En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido contiene al menos 8 nucleobases de la secuencia de SEQ ID NO: 4. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido consiste de la secuencia de SEQ ID NO: 4. En ciertos casos de la divulgación, el compuesto antisentido se usa en un sujeto para tratar, prevenir, retrasar y/o mejorar la diabetes. En ciertas realizaciones, el sujeto es prediabético. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido es para uso en un sujeto a mejorar la sensibilidad periférica a la insulina, disminuir los ácidos grasos libres, reducir el depósito de triglicéridos intramiocelulares, mejorar el perfil lipídico y/o mejorar el perfil diabético.

[0024] En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 contiguos nucleobases de una secuencia seleccionada de cualquier secuencia dada a conocer en la patente US 7.598.227, la patente US 7.750.141, la publicación PCT WO 2004/093783 o la Publicación PCT WO 2012/149495. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido tiene una secuencia seleccionada de cualquier secuencia descrita en la patente de los Estados Unidos 7.598.227, la patente de los Estados Unidos 7.750.141, la publicación PCT WO 2004/093783 o la publicación PCT WO 2012/149495. En ciertos casos de la divulgación, el compuesto antisentido se usa en un sujeto para tratar, prevenir, retrasar y/o mejorar la diabetes. En ciertas realizaciones, el sujeto es prediabético. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido se usa en un sujeto para mejorar la sensibilidad periférica a la insulina, disminuir los ácidos grasos libres, reducir la deposición de triglicéridos intramiocelulares, mejorar el perfil de lípidos, y/o mejorar el perfil diabético.

[0025] En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido es oligonucleótido monocatenario modificado. En ciertos casos de la divulgación, el compuesto antisentido se usa en un sujeto para tratar, prevenir, retrasar y/o mejorar la diabetes. En ciertas realizaciones, el sujeto es prediabético. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido se usa en un sujeto para mejorar la sensibilidad periférica a la insulina, disminuir los ácidos grasos libres, reducir la deposición de triglicéridos intramiocelulares, mejorar un perfil lipídico y/o mejorar un perfil diabético.

[0026] En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido consiste en 12-30 nucleósidos enlazados. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido consta de 20 nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido consiste en 20 nucleósidos unidos con la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 4. En ciertos casos de la divulgación, el compuesto antisentido se usa en un sujeto para tratar, prevenir, retrasar y/o mejorar la diabetes. En ciertas realizaciones, el sujeto es prediabético. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido se usa en un sujeto para mejorar la sensibilidad periférica a la insulina, disminuir los ácidos grasos libres, reducir la deposición de triglicéridos intramiocelulares, mejorar un perfil lipídico y/o mejorar un perfil diabético.

[0027] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido comprenden al menos un enlace internucleosídico modificado. En ciertas realizaciones, el enlace internucleosídico modificado es un enlace internucleosídico de fosforotioato (PS). En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico de fosforotioato. En ciertos casos de la divulgación, el compuesto antisentido se usa en un sujeto para tratar, prevenir, retrasar y/o mejorar la diabetes. En ciertas realizaciones, el sujeto es prediabético. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido se usa en un sujeto para mejorar la sensibilidad periférica a la insulina, disminuir los ácidos grasos libres, reducir la deposición de triglicéridos intramiocelulares, mejorar un perfil lipídico y/o mejorar un perfil diabético.

[0028] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido comprenden al menos un nucleósido que comprende un azúcar modificado. En ciertas realizaciones, el al menos un azúcar modificado es un azúcar bicíclico. En ciertas realizaciones, el al menos un azúcar modificado comprende un 2'-O-metoxietilo. En ciertas realizaciones, el al menos un azúcar modificado comprende un cEt. En ciertos casos de la divulgación, el compuesto antisentido se usa en un sujeto para tratar, prevenir, retrasar y/o mejorar la diabetes. En ciertas realizaciones, el sujeto es prediabético. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido se usa en un sujeto para mejorar la sensibilidad periférica a la insulina, disminuir los ácidos grasos libres, reducir la deposición de triglicéridos

intramiocelulares, mejorar un perfil lipídico y/o mejorar un perfil diabético.

[0029] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido comprenden al menos un nucleósido que comprende una nucleobase modificada. En ciertas realizaciones, la nucleobase modificada es una 5-metilcitosina. En ciertos casos de la divulgación, el compuesto antisentido se usa en un sujeto para tratar, prevenir, retrasar y/o mejorar la diabetes. En ciertas realizaciones, el sujeto es prediabético. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido se usa en un sujeto para mejorar la sensibilidad periférica a la insulina, disminuir los ácidos grasos libres, reducir la deposición de triglicéridos intramiocelulares, mejorar un perfil lipídico y/o mejorar un perfil diabético.

[0030] En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido antisentido que comprende: (i) un segmento de brecha que consiste en desoxinucleósidos enlazados; (ii) un segmento de ala 5' que consiste en nucleósidos unidos; y (iii) un segmento de ala 3' que consiste en nucleósidos unidos; en donde el segmento de separación se posiciona inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3' y en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado. En ciertos casos de la divulgación, el compuesto antisentido se usa en un sujeto para tratar, prevenir, retrasar y/o mejorar la diabetes. En ciertas realizaciones, el sujeto es prediabético. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido se usa en un sujeto para mejorar la sensibilidad periférica a la insulina, disminuir los ácidos grasos libres, reducir la deposición de triglicéridos intramiocelulares, mejorar un perfil lipídico y/o mejorar un perfil diabético.

[0031] En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido antisentido que comprende: (i) un segmento de hueco que consiste en 8-12 desoxinucleósidos enlazados; (ii) un segmento de ala 5' que consiste en 1-6 nucleósidos unidos; y (iii) un segmento de ala 3' que consiste en 1-6 nucleósidos unidos; en donde el segmento de separación se coloca inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, en donde cada citosina es una 5'-metilcitosina, y en donde cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato. En ciertos casos de la divulgación, el oligonucleótido antisentido se usa en un sujeto para tratar, prevenir, retrasar y/o mejorar la diabetes. En ciertas realizaciones, el sujeto es prediabético. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido se usa en un sujeto para mejorar la sensibilidad periférica a la insulina, disminuir los ácidos grasos libres, reducir la deposición de triglicéridos intramiocelulares, mejorar un perfil de lípidos y/o mejorar un perfil diabético.

[0032] En el presente documento se describe un método para mejorar la sensibilidad a la insulina que comprende, seleccionar un sujeto pre-diabético y administrar un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido 12-30 nucleobases en longitud que se dirige a ApoCIII mejorando así la sensibilidad a la insulina. En ciertos casos, la sensibilidad a la insulina es la sensibilidad periférica a la insulina. En ciertos casos, el sujeto tiene altos niveles de TG.

[0033] Se describe aquí un método para mejorar la sensibilidad a la insulina, la selección de un sujeto con diabetes y la administración de un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido 12-30 nucleobases de longitud de orientación ApoCIII mejorando de este modo la sensibilidad a la insulina. En ciertos casos, la sensibilidad a la insulina es la sensibilidad periférica a la insulina. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada. En ciertos casos, el sujeto tiene altos niveles de TG.

[0034] Se describe aquí un método para mejorar la sensibilidad a la insulina en un sujeto que comprende la selección de un sujeto pre-diabético y la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un antisentido oligonucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4 en donde el oligonucleótido antisentido comprende:

- (a) un segmento de separación que consiste en 10 desoxinucleósidos unidos;
- (b) un segmento de ala 5' que consiste en 5 nucleósidos unidos;
- (c) un segmento de ala 3' que consiste en 5 nucleósidos unidos;

en donde el segmento de separación se coloca inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, en donde cada citosina es una 5'-metilcitosina, en donde cada enlace internucleosídico es un enlace de fosforotioato, y en donde la sensibilidad a la insulina mejora en el sujeto. En ciertos casos, la sensibilidad a la insulina es la sensibilidad periférica a la insulina. En ciertos casos, el sujeto tiene altos niveles de TG.

[0035] Se describe aquí un método para mejorar la sensibilidad a la insulina en un sujeto que comprende la selección de un sujeto con diabetes y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un antisentido oligonucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4 en donde el antisentido el oligonucleótido comprende:

- (a) un segmento de separación que consiste en 10 desoxinucleósidos unidos;
- (b) un segmento de ala 5' que consiste en 5 nucleósidos unidos;

(c) un segmento de ala 3' que consiste en 5 nucleósidos unidos;

en donde el segmento de separación se coloca inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, en donde cada citosina es una 5' -metilcitosina, en donde cada enlace internucleosídico es un enlace de fosforotioato, y en donde la sensibilidad a la insulina mejora en el sujeto. En ciertos casos, la sensibilidad a la insulina es la sensibilidad periférica a la insulina. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada. En ciertos casos, el sujeto tiene altos niveles de TG.

10 **[0036]** Se describe aquí un método para disminuir los ácidos grasos libres que comprende la selección de un sujeto pre-diabético y administración de un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido de 12-30 nucleobases de longitud de segmentación ApoCIII, lo que reduce los ácidos grasos libres. En ciertos casos, el sujeto tiene altos niveles de TG.

15 **[0037]** Se describe aquí un método para disminuir los ácidos grasos libres que comprende la selección de un sujeto con diabetes y administración de un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido de 12-30 nucleobases de longitud de segmentación ApoCIII, lo que reduce los ácidos grasos libres. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada. En ciertos casos, el sujeto tiene altos niveles de TG.

20 **[0038]** Se describe aquí un método para disminuir los ácidos grasos libres en un sujeto que comprende, al seleccionar un sujeto pre-diabético y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4, en donde el oligonucleótido antisentido comprende:

- 25
- (a) un segmento de separación que consiste en 10 desoxinucleósidos unidos;
 - (b) un segmento de ala 5' que consiste en 5 nucleósidos unidos;
 - (c) un segmento de ala 3' que consiste en 5 nucleósidos unidos;

30 en donde el segmento de separación se coloca inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, en donde cada citosina es una 5' -metilcitosina, en donde cada enlace internucleosídico es un enlace de fosforotioato, y en donde los ácidos grasos libres se reducen en el sujeto. En ciertos casos, el sujeto tiene altos niveles de TG.

35 **[0039]** Se describe aquí un método para disminuir los ácidos grasos libres en un sujeto que comprende la selección de un sujeto con diabetes y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un antisentido oligonucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4 en donde el oligonucleótido antisentido comprende:

- 40
- (a) un segmento de separación que consiste en 10 desoxinucleósidos unidos;
 - (b) un segmento de ala 5' que consiste en 5 nucleósidos unidos;
 - (c) un segmento de ala 3' que consiste en 5 nucleósidos unidos;

45 en donde el segmento de separación se coloca inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, en donde cada citosina es una 5' -metilcitosina, en donde cada enlace internucleosídico es un enlace de fosforotioato, y en donde los ácidos grasos libres se reducen en el sujeto. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada. En ciertos casos, el sujeto tiene altos niveles de TG.

50 **[0040]** Se describe aquí un método para reducir la deposición de triglicéridos intramiocelulares que comprende la selección de un sujeto prediabético y administración de un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido de 12-30 nucleobases de longitud de segmentación ApoCIII, reduciendo de ese modo la deposición de triglicéridos intramiocelulares. En ciertos casos, el sujeto tiene altos niveles de TG.

55 **[0041]** Se describe aquí un método para reducir la deposición de triglicéridos intramiocelulares que comprende la selección de un sujeto con diabetes y la administración de un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido de 12-30 nucleobases de longitud de segmentación ApoCIII, reduciendo de ese modo la deposición de triglicéridos intramiocelulares. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada. En ciertos casos, el sujeto tiene altos niveles de TG.

60 **[0042]** Se describe aquí un método para reducir la deposición de triglicéridos intramiocelulares en un sujeto que comprende la selección de un sujeto pre-diabético y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4, en donde el oligonucleótido antisentido comprende:

- 65
- (a) un segmento de separación que consiste en 10 desoxinucleósidos unidos;

- (b) un segmento de ala 5' que consiste en 5 nucleósidos unidos;
- (c) un segmento de ala 3' que consiste en 5 nucleósidos unidos;

5 en donde el segmento de separación se coloca inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, en donde cada citosina es una 5' -metilcitosina, en donde cada enlace internucleosídico es un enlace de fosforotioato, y en donde la deposición de triglicéridos intramiocelulares se reduce en el sujeto. En ciertos casos, el sujeto tiene altos niveles de TG.

10 **[0043]** Se describe aquí un método para reducir la deposición de triglicéridos intramiocelulares en un sujeto que comprende la selección de un sujeto con diabetes y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4 en donde el oligonucleótido antisentido comprende:

- 15 (a) un segmento de separación que consiste en 10 desoxinucleósidos unidos;
- (b) un segmento de ala 5' que consiste en 5 nucleósidos unidos;
- (c) un segmento de ala 3' que consiste en 5 nucleósidos unidos;

20 en donde el segmento de separación se coloca inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, en donde cada citosina es una 5' -metilcitosina, en donde cada enlace internucleosídico es un enlace de fosforotioato, y en donde la deposición de triglicéridos intramiocelulares se reduce en el sujeto. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada. En ciertos casos, el sujeto tiene altos niveles de TG.

25 **[0044]** Se describe aquí un método para mejorar un perfil de lípidos de un sujeto que comprende la administración de un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido 12-30 nucleobases de longitud de segmentación ApoCIII, en donde ácidos grasos libres, triglicéridos, no-HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contiene VLDL, ApoB y LDL-C se reducen y aumenta HDL-C, mejorando así el perfil lipídico del sujeto. En ciertos casos, el sujeto tiene altos niveles de TG. En ciertos casos, el sujeto tiene bajos niveles de HDL. En ciertos casos, el sujeto es pre-diabético. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada.

30 **[0045]** Se describe aquí un método para mejorar un perfil de lípidos de un sujeto que comprende la administración de un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4, en donde ácidos grasos libres, triglicéridos, no-HDL-C, VLDL C, ApoCIII que contiene VLDL, ApoB y LDL-C se reducen y HDL-C se incrementa y en donde el oligonucleótido antisentido comprende:

- 35 (a) un segmento de separación que consta de 10 desoxinucleósidos unidos;
- (b) un segmento de ala 5' que consiste en 5 nucleósidos unidos;
- 40 (c) un segmento de ala 3' que consiste en 5 nucleósidos unidos;

45 en donde el segmento de separación se coloca inmediatamente adyacente a y entre el segmento del ala 5' y el segmento del ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento del ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, en donde cada citosina es una 5' -metilcitosina, en donde cada enlace internucleosídico es un enlace de fosforotioato, y en donde el perfil lipídico se mejora en el sujeto. En ciertos casos, el sujeto tiene altos niveles de TG. En ciertos casos, el sujeto tiene bajos niveles de HDL. En ciertos casos, el sujeto es pre-diabético. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertos casos, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada.

50 **[0046]** Marcadores fisiológicos que pueden evaluarse como parte de un perfil de lípidos incluyen, pero no se limitan a, TG, colesterol no-C, VLDL-C, ApoCIII que contiene VLDL, ApoB, LDL-C y HDL-C. En ciertas realizaciones, un perfil lipídico mejorado puede incluir uno o más de: TG disminuido, no HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contiene VLDL, ApoB y LDL-C; y aumento de HDL.

55 **[0047]** Ciertas realizaciones proporcionan un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido 12-30 nucleobases en longitud de orientación ApoCIII para su uso en un método de tratamiento de un sujeto diabético o un sujeto en riesgo de diabetes mediante la mejora de un perfil de la diabetes de un sujeto, en donde índice de sensibilidad a la insulina, tasa de eliminación de glucosa, glucosa MCR, metabolismo de la glucosa: mejora la ración de insulina; en donde los ácidos grasos libres, triglicéridos, no HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contienen VLDL, ApoB y LDL-C se reducen y HDL-C aumenta, mejorando así el perfil de diabetes del sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto es prediabético. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene altos niveles de TG.

60 **[0048]** Ciertas realizaciones proporcionan un oligonucleótido antisentido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4 para uso en un método para mejorar un perfil de la diabetes de un sujeto, en donde el índice de sensibilidad a la insulina, la tasa de eliminación de glucosa, glucosa MCR, metabolismo de la glucosa:ración insulina es mejorado; en donde los ácidos grasos libres, triglicéridos, no HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contienen VLDL, ApoB y LDL-C se reducen y HDL-

C se incrementa y en donde el oligonucleótido antisentido comprende:

- (a) un segmento de separación que consta de 10 desoxinucleósidos unidos;
- (b) un segmento de ala 5' que consiste en 5 nucleósidos unidos;
- (c) un segmento de ala 3' que consiste en 5 nucleósidos unidos;

en donde el segmento de separación se coloca inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, en donde cada citosina es una 5'-metilcitosina, en donde cada enlace internucleosídico es un enlace de fosforotioato, y en donde el perfil de diabetes mejora en el sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto es prediabético. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene diabetes tipo II moderadamente controlada. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene altos niveles de TG.

[0049] Marcadores fisiológicos que pueden ser evaluados como parte de un perfil diabético incluyen, pero no se limitan a, el por ciento de albúmina glicosilada, los niveles de fructosamina, el por ciento de hemoglobina glicosilada (HbA1c), el índice de sensibilidad a la insulina, sensibilidad periférica a la insulina, la sensibilidad a la insulina hepática, sensibilidad pancreática a la insulina, tasa de eliminación de glucosa, MCR de glucosa, metabolismo de la glucosa: ración de insulina, ácidos grasos libres, triglicéridos, no HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contiene VLDL, apoB y LDL-C; y HDL-C. En ciertas realizaciones, un perfil diabético mejorado puede incluir uno o más de: índice de sensibilidad a la insulina mejorado, sensibilidad a la insulina periférica, sensibilidad a la insulina hepática, sensibilidad a la insulina pancreática, tasa de eliminación de glucosa, MCR de glucosa, metabolismo de la glucosa: ración de insulina; ácidos grasos libres reducidos, triglicéridos, no HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contiene VLDL, apoB, LDL-C, porcentaje de albúmina glicosilada, niveles de fructosamina, porcentaje de hemoglobina glicosilada (HbA1c); y aumento de HDL.

[0050] En ciertas realizaciones, el sujeto está en una dosis estable de metformina.

[0051] En ciertas realizaciones el sujeto ha de ayuno los niveles de triglicéridos ≥ 200 y ≤ 500 mg/dl.

[0052] En ciertas realizaciones, el sujeto o animal es humano.

[0053] En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido se administra parenteralmente. En realizaciones adicionales, la administración parenteral es subcutánea.

[0054] En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido se co-administra con un segundo agente o terapia. En ciertas realizaciones, el segundo agente es un agente de disminución de ApoCIII, agente de disminución de Apo C-II, agente de disminución de DGAT1, agente agente de crecimiento de LPL, agente reductor del colesterol, reductores de lípidos no-HDL, agente de disminución de LDL, agente de disminución de TG, HDL gasificante, aceite de pescado, niacina (ácido nicotínico), fibrato, estatina, DCCR (sal de diazóxido), agente reductor de glucosa o agente antidiabético. En ciertas realizaciones, la segunda terapia es la restricción de grasas en la dieta. En ciertas realizaciones, el segundo agente es metformina.

[0055] En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido y el segundo agente se administran concomitantemente o secuencialmente.

[0056] En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido es una forma de sal. En realizaciones adicionales, el compuesto antisentido comprende además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0057] Se describe aquí un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido específico antisentido ApoCIII para uso en la preparación de un medicamento.

[0058] Se describe aquí un compuesto que comprende un oligonucleótido específico antisentido ApoCIII para su uso en un sujeto a:

- a. mejorar la sensibilidad a la insulina;
- b. mejorar la sensibilidad periférica a la insulina;
- c. ácidos grasos libres inferiores;
- d. reducir la deposición de triglicéridos intramiocelulares;
- e. mejorar un perfil lipídico;
- f. tratar, prevenir, retrasar y/o mejorar la diabetes; y/o
- g. mejorar un perfil diabético.

Compuestos antisentido

[0059] Los compuestos oligoméricos incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos, compuestos antisentido, oligonucleótidos antisentido, y siARNs. Un compuesto oligomérico puede ser "antisentido" para un ácido nucleico diana, lo que significa que es capaz de

someterse a hibridación con un ácido nucleico diana a través de enlaces de hidrógeno.

[0060] Los compuestos antisentido divulgados en el presente documento se refieren a compuestos oligoméricos capaces de experimentar la hibridación con un ácido nucleico diana a través de puentes de hidrógeno. Los ejemplos de compuestos antisentido incluyen compuestos monocatenarios y bicatenarios, tales como oligonucleótidos antisentido, siARNs, shARNs y miARNs.

[0061] En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobases que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana al que está dirigido. En ciertas realizaciones de este tipo, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobase que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana al que se dirige.

[0062] Un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico ApoCIII para su uso en la presente invención es de 12 a 30 nucleótidos de longitud. En otras palabras, los compuestos antisentido son de 12 a 30 nucleobases unidas. En otras realizaciones, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12-301 nucleobases enlazadas. En ciertas de tales realizaciones, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleobases unidas en longitud, o un rango definido por cualquiera de los dos valores anteriores. El compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido.

[0063] En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado acortado o truncado. El oligonucleótido modificado acortado o truncado puede tener uno o más nucleósidos eliminados del extremo 5' (truncamiento 5'), uno o más nucleósidos eliminados del extremo 3' (truncamiento 3') o uno o más nucleósidos eliminados de la porción central. Alternativamente, los nucleósidos eliminados pueden dispersarse por todo el oligonucleótido modificado, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene un nucleósido eliminado del extremo 5' y un nucleósido eliminado del extremo 3'.

[0064] Cuando un único nucleósido adicional está presente en un oligonucleótido alargado, el nucleósido adicional puede ubicarse en la porción central, extremo 5' o 3' del oligonucleótido. Cuando están presentes dos o más nucleósidos adicionales, los nucleósidos añadidos pueden estar adyacentes entre sí, por ejemplo, en un oligonucleótido que tiene dos nucleósidos añadidos a la porción central, al extremo 5' (adición 5'), o alternativamente al extremo 3' (adición 3'), del oligonucleótido. Alternativamente, los nucleósidos añadidos pueden dispersarse por todo el compuesto antisentido, por ejemplo, en un oligonucleótido que tiene un nucleósido añadido al extremo 5' y una subunidad añadida al extremo 3'.

[0065] Es posible aumentar o disminuir la longitud de un compuesto antisentido, tal como un oligonucleótido antisentido, y/o introducir bases de desajuste sin eliminar la actividad. Por ejemplo, en Woolf et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 7305-7309, 1992), se probó una serie de oligonucleótidos antisentido de 13-25 nucleobases de longitud para determinar su capacidad para inducir la escisión de un ARN diana en un modelo de inyección de ovocitos. Los oligonucleótidos antisentido de 25 nucleobases de longitud con 8 u 11 bases de falta de coincidencia cerca de los extremos de los oligonucleótidos antisentido pudieron dirigir la escisión específica del ARNm diana, aunque en menor medida que los oligonucleótidos antisentido que no contenían desajustes. De manera similar, se logró la escisión específica del objetivo usando oligonucleótidos antisentido de 13 nucleobases, incluidos aquellos con 1 o 3 desajustes.

[0066] Gautschi et al (J. Natl Cancer Inst 93:463-471, marzo de 2001) demostró la capacidad de un oligonucleótido que tiene 100% de complementariedad con el ARNm de bcl-2 y que tiene 3 desapareamientos con el ARNm de bcl-xL para reducir la expresión de bcl-2 y bcl-xL *in vitro* e *in vivo*. Además, este oligonucleótido demostró una potente actividad antitumoral *in vivo*.

[0067] Maher y Dolnick (Nuc Acid Res 16: 3341-3358,1988) probó una serie de 14 oligonucleótidos tándem de nucleobases antisentido, y 28 y 42 oligonucleótidos antisentido de nucleobases compuestos de la secuencia de dos o tres de los oligonucleótidos antisentido tándem, respectivamente, por 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 nucleobases solo fue capaz de inhibir la traducción, aunque a un nivel más modesto que los 28 o 42 oligonucleótidos antisentido de nucleobase.

Antisentido Motifs compuestos

[0068] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico ApoCIII han modificado químicamente subunidades dispuestas en patrones, o motivos, para conferir a las propiedades de los compuestos antisentido tales como actividad inhibitora mejorada, aumento de la afinidad de unión por un ácido nucleico diana, o resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*.

[0069] Compuestos antisentido quiméricos contienen típicamente al menos una región modificada de modo que confieren mayor resistencia a la degradación por nucleasas, aumento de la captación celular, aumento de la afinidad

de unión para el ácido nucleico diana, y/o aumento de la actividad inhibidora. Una segunda región de un compuesto antisentido quimérico puede servir opcionalmente como sustrato para la endonucleasa celular RNasa H, que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN: ADN.

5 **[0070]** Compuestos antisentido que tienen un motivo gápmero se consideran compuestos antisentido quiméricos. En un gápmero, una región interna que tiene una pluralidad de nucleótidos que soporta la escisión de RNasa H 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 Gápmero, el segmento gap generalmente sirve como sustrato para la escisión de la endonucleasa, mientras que los segmentos del ala comprenden nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, las regiones de un gápmero 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 gápmero pueden incluir en algunas realizaciones 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 nucleósidos bicíclicos modificados en el azúcar (tales nucleósidos bicíclicos modificados en el azúcar pueden incluir los que tienen un puente 4'-(CH₂)_n-O-2', donde n = 1 o n = 2) Preferiblemente, cada región distinta comprende restos de azúcar uniformes. El motivo ala-espacio-ala se describe con frecuencia como "X-Y-Z", donde "X" representa la longitud de la región del ala 5' , "Y" representa la longitud de la región del espacio, y "Z" representa la longitud de la región 3' del ala. Como se usa en el presente documento, un separador descrito como "X-Y-Z" tiene una configuración tal que el segmento de separación se coloca inmediatamente adyacente a cada uno de los segmentos del ala 5' y el segmento del ala 3'. Por lo tanto, no existen nucleótidos intermedios entre el segmento de ala 5' y el segmento de separación, o el segmento de separación y el segmento de ala 3'. Cualquiera de los compuestos antisentido descritos en este documento puede tener un motivo gápmero. En algunas realizaciones, X y Z son iguales; en otras realizaciones son diferentes. En una realización preferida, Y tiene entre 8 y 15 nucleótidos. X, Y o Z pueden ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más nucleótidos. Por lo tanto, los gápmeros incluyen, entre otros, por ejemplo 5-10-5, 4-8-4, 4-12-3, 4-12-4, 3-14-3, 2-13-5, 2-16-2, 1-18-1, 3-10-3, 2-10-2, 1-10-1, 2-8-2, 6-8-6, 5-8-5, 1-8 -1, 2-6-2, 2-13-2, 1-8-2, 2-8-3, 3-10-2, 1-18-2 o 2-18-2.

30 **[0071]** En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido como un motivo "wingmer", que tiene un ala-hueco o configuración de brecha de ala, es decir, una configuración X-Y o Y-Z como se describió anteriormente para la configuración de gápmero. Por lo tanto, las configuraciones de wingmer incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo 5-10, 8-4, 4-12, 12-4, 3-14, 16-2, 18-1, 10-3, 2-10, 1-10, 8-2, 2-13 o 5-13.

35 **[0072]** En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico ApoCIII poseen un motivo de gápmero 5-10-5.

[0073] En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico ApoCIII tiene un motivo de GAP-ensanchado.

40 *Ácidos nucleicos diana, regiones diana y secuencias de nucleótidos*

45 **[0074]** Las secuencias de nucleótidos que codifican ApoCIII incluyen, sin limitación, los siguientes: n^o de Acceso GenBank NM_000040.1 (incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 1), n^o de acceso GenBank NT_033899.8 truncado de los nucleótidos 20262640 a 20266603 (incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 2), y n^o de Acceso GenBank NT_035088.1 truncado de los nucleótidos 6.238.608 a 6.242.565 (incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 3).

50 **[0075]** Se entiende que la secuencia establecida en cada SEQ ID NO en los ejemplos contenidos en este documento es independiente de cualquier modificación a un resto de azúcar, un enlace internucleosídico o una nucleobase. Como tal, los compuestos antisentido definidos por una SEQ ID NO pueden comprender, independientemente, una o más modificaciones a un resto de azúcar, un enlace internucleosídico o una nucleobase. Los compuestos antisentido descritos por número de Isis (n^o de Isis) indican una combinación de secuencia de nucleobase y motivo.

55 **[0076]** En ciertas realizaciones, una región diana es una región estructuralmente definida del ácido nucleico diana. Por ejemplo, una región diana puede abarcar una UTR 3', una UTR 5' , un exón, un intrón, una unión exón/intrón, una región de codificación, una región de iniciación de la traducción, una región de terminación de la traducción u otra región definida de ácido nucleico. Las regiones estructuralmente definidas para ApoCIII pueden obtenerse mediante el número de acceso a partir de bases de datos de secuencias como NCBI. En ciertas realizaciones, una región diana puede abarcar la secuencia desde un sitio diana 5' de un segmento diana dentro de la región diana hasta un sitio diana 3' de otro segmento diana dentro de la región diana.

60 **[0077]** En ciertas realizaciones, un "segmento diana" es una sub-parte más pequeña de una región diana dentro de un ácido nucleico. Por ejemplo, un segmento diana puede ser la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico diana al que se dirigen uno o más compuestos antisentido. "Sitio diana 5' " se refiere al nucleótido más 5' de un segmento diana. "Sitio diana 3'" se refiere al nucleótido más 3' de un segmento diana.

65

[0078] Una región diana puede contener uno o más segmentos diana. Múltiples segmentos diana dentro de una región diana pueden estar superpuestos. Alternativamente, pueden no superponerse. En ciertas realizaciones, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por no más de aproximadamente 300 nucleótidos. En ciertas realizaciones, los segmentos diana dentro de una región diana están separados por una cantidad de nucleótidos que es, es aproximadamente, no es más que, no es más que aproximadamente, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 o 10 nucleótidos en el ácido nucleico diana, o es un rango definido por cualquiera de los dos valores anteriores. 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 regiones diana definidas por un intervalo que tiene un ácido nucleico inicial que es cualquiera de los sitios diana 5' o sitios diana 3' enumerados, en este documento.

[0079] Segmentación incluye la determinación de al menos un segmento diana al que un compuesto antisentido hibrida, de tal manera que se produce un efecto deseado. En ciertas realizaciones, el efecto deseado es una reducción en 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.

[0080] Segmentos diana adecuados se pueden encontrar dentro de un 5' UTR, una región codificante, una 3' UTR, un intrón, un exón, o un exón/intrón de conexiones. Los segmentos diana que contienen un codón de inicio o un codón de parada también son segmentos diana adecuados. Un segmento diana adecuado puede excluir específicamente una determinada región estructuralmente definida, como el codón de inicio o el codón de detención.

[0081] La determinación de segmentos diana adecuados pueden incluir una comparación de la secuencia de un ácido nucleico diana a otras secuencias de 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 hibridarse de una manera no específica a secuencias distintas de un ácido nucleico diana seleccionado (es decir, secuencias no diana o fuera de diana).

[0082] 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 de ApoCIII son indicativas de inhibición de la expresión de ApoCIII. Las reducciones en los niveles de una proteína ApoCIII pueden ser indicativas de inhibición de la expresión de ARNm diana. Además, los cambios fenotípicos pueden ser indicativos de inhibición de la expresión de ApoCIII. Por ejemplo, un aumento en el nivel de HDL, disminución en el nivel de LDL o disminución en el nivel de TG se encuentran entre los cambios fenotípicos que pueden analizarse para la inhibición de la expresión de ApoCIII. También se pueden evaluar otras indicaciones fenotípicas, por ejemplo, síntomas asociados con una enfermedad cardiovascular o metabólica; por ejemplo angina; dolor de pecho; falta de aliento; palpitaciones; debilidad; mareo; náusea; transpiración; taquicardia; bradicardia arritmia; fibrilación auricular; hinchazón en las extremidades inferiores; cianosis; fatiga; desmayo; entumecimiento de la cara; entumecimiento de las extremidades; claudicación o calambres musculares; hinchazón del abdomen; o fiebre.

Hibridación

[0083] En algunas realizaciones, la hibridación se produce entre un compuesto antisentido descrito en el presente documento y un ácido nucleico ApoCIII. El mecanismo más común de hibridación implica el enlace de hidrógeno (por ejemplo, Watson-Crick, Hoogsteen o enlace de hidrógeno de Hoogsteen invertido) entre las nucleobases complementarias de las moléculas de ácido nucleico.

[0084] La hibridación puede producirse bajo condiciones variables. Las condiciones estrictas dependen de la secuencia y están determinadas por la naturaleza y la composición de las moléculas de ácido nucleico que se hibridarán.

[0085] Los métodos para determinar si una secuencia es específicamente hibridable con un ácido nucleico diana son bien conocidos en la técnica (Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3^a Ed, 2001, CSHL Press). En ciertos casos, los compuestos antisentido descritos en este documento son específicamente hibridables con un ácido nucleico ApoCIII.

Complementariedad

[0086] Un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana son complementarios entre sí cuando un número suficiente de nucleobases del compuesto antisentido pueden unirse por hidrógeno con las correspondientes nucleobases del ácido nucleico diana, tal que se produzca un efecto deseado (por ejemplo, inhibición antisentido de un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico ApoCIII).

[0087] Un compuesto antisentido puede hibridar sobre uno o más segmentos de una ApoCIII de ácido nucleico de tal manera que segmentos intervinientes o adyacentes no están involucrados en el evento de hibridación (por ejemplo, una estructura de bucle, falta de coincidencia o estructura de horquilla).

[0088] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para uso proporcionados en este documento, o una porción especificada de la misma, son, o son al menos, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% complementario a un ácido nucleico ApoCIII, una región diana, un segmento diana o porción especificada de los mismos. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con un ácido nucleico diana se puede determinar utilizando métodos de rutina.

[0089] Por ejemplo, un compuesto antisentido en donde 18 de 20 nucleobases del compuesto antisentido son complementarias a una región diana, y por lo tanto específicamente hibridan, representaría el 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, las restantes nucleobases no complementarias pueden ser agrupadas o intercaladas con nucleobases complementarias y necesidad de no ser contiguas entre sí o a nucleobases complementarias. Como tal, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleobases de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleobases no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de completa complementariedad con el ácido nucleico diana tendría 77,8% de complementariedad global con el ácido nucleico diana. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente utilizando programas BLAST (herramientas básicas de búsqueda de alineación local) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656). El porcentaje de homología, identidad de secuencia o complementariedad se puede determinar, por ejemplo, mediante 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 algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489).

[0090] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para uso proporcionados en este documento, o partes especificadas de los mismos, son totalmente complementarios (es decir, 100% complementarios) a un ácido nucleico ApoCIII, o una región diana, o un segmento diana o secuencia diana del mismo. Como se usa en el presente documento, "completamente complementario" significa que cada nucleobase de un compuesto antisentido es capaz de emparejar bases precisas con las nucleobases correspondientes de un ácido nucleico diana. Por ejemplo, un compuesto antisentido de 20 nucleobases es completamente complementario a una secuencia diana que tiene una longitud de 400 nucleobases, siempre que haya una porción correspondiente de 20 nucleobases del ácido nucleico diana que sea completamente complementaria al compuesto antisentido. Completamente complementario también puede usarse en referencia a una porción especificada del primer y/o el segundo ácido nucleico. Por ejemplo, una porción de 20 nucleobases de un compuesto antisentido de 30 nucleobases puede ser "completamente complementaria" a una secuencia diana que tiene una longitud de 400 nucleobases. La porción de 20 nucleobases del oligonucleótido de 30 nucleobases es completamente complementaria a la secuencia diana si la secuencia diana tiene una porción correspondiente de 20 nucleobases en donde cada nucleobase es complementaria a la porción de 20 nucleobases del compuesto antisentido. Al mismo tiempo, el compuesto antisentido de 30 nucleobases completo puede o no ser completamente complementario a la secuencia diana, dependiendo de si las 10 nucleobases restantes del compuesto antisentido también son complementarias a la secuencia diana.

[0091] La ubicación de una nucleobase no complementaria puede estar en el extremo 5' o extremo 3' del compuesto antisentido. Alternativamente, las nucleobases no complementarias pueden estar en una posición interna del compuesto antisentido. Cuando están presentes dos o más nucleobases no complementarias, pueden ser contiguas (es decir, unidas) o no contiguas. En una realización, una nucleobase no complementaria está ubicada en el segmento del ala de un oligonucleótido antisentido de gámpero.

[0092] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido que son, o son de hasta, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases de longitud comprenden no más de 4, no más de 3, no más de 2, o no más de 1 nucleobase no complementarias con respecto a un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico ApoCIII, o una porción especificada del mismo.

[0093] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido que son, o son de hasta, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleobases de longitud comprenden no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2, o no más de 1 nucleobase(s) no complementaria(s) en relación con un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico ApoCIII, o una porción especificada del mismo.

[0094] Los compuestos antisentido divulgados en el presente documento también incluyen los que son complementarios a una porción de una diana de ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, "porción" se refiere a un número definido de nucleobases contiguas (es decir, unidas) dentro de una región o segmento de un ácido nucleico diana. Una "porción" también puede referirse a un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 8 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 10 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 12 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una porción de 15 nucleobases de un segmento diana. También se contemplan compuestos antisentido que son complementarios de al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más porciones de nucleobase de un segmento diana, o un rango definido por cualquiera de estos dos valores.

Identidad

[0095] Los compuestos antisentido para uso proporcionados en este documento también pueden tener un porcentaje de identidad definido a una particular secuencia de nucleótidos, SEQ ID NO, o la secuencia de un compuesto representado por un número Isis específico, o porción del mismo. Como se usa en el presente documento, un compuesto antisentido es idéntico a la secuencia descrita en el presente documento si tiene la misma capacidad de emparejamiento de nucleobase. Por ejemplo, un ARN que contiene uracilo en lugar de timidina en una secuencia de ADN descrita se consideraría idéntico a la secuencia de ADN ya que tanto el uracilo como la timidina se emparejan con adenina. También se contemplan versiones acortadas y alargadas de los compuestos antisentido descritos en el presente documento, así como los compuestos que tienen bases no idénticas con respecto a los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento. Las bases no idénticas pueden ser adyacentes entre sí o dispersas por todo el compuesto antisentido. El porcentaje de identidad de un compuesto antisentido se calcula de acuerdo con el número de bases que tienen un emparejamiento de bases idéntico en relación con la secuencia con la que se compara.

[0096] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido, o porciones de los mismos, son al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100 % idénticos a uno o más de los compuestos antisentido o SEQ ID NO, o una porción de los mismos, descritos aquí.

Modificaciones

[0097] Un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La porción de nucleobase (también conocida como base) del nucleósido es normalmente un resto de base heterocíclica. Los nucleótidos son nucleósidos que además incluyen un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede unirse al resto hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. Los oligonucleótidos se forman a través del enlace covalente de nucleósidos adyacentes entre sí, para formar un oligonucleótido polimérico lineal. Dentro de la estructura oligonucleotídica, los grupos fosfato se denominan comúnmente formando los enlaces internucleosídicos del oligonucleótido.

[0098] Las modificaciones a compuestos antisentido abarcan sustituciones o modificaciones de enlaces internucleosídicos, restos de azúcar, o nucleobases. Los compuestos antisentido modificados a menudo se prefieren a las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad mejorada por la diana de ácido nucleico, mayor estabilidad en presencia de nucleasas o mayor actividad inhibitoria.

[0099] Nucleósidos químicamente modificados también se pueden emplear para aumentar la afinidad de unión de un oligonucleótido antisentido acortada o truncada por su ácido nucleico diana. En consecuencia, a menudo se pueden obtener resultados comparables con compuestos antisentido más cortos que tienen tales nucleósidos modificados químicamente.

Enlaces internucleosídicos modificados

[0100] El enlace internucleosídico natural de ARN y ADN es un enlace fosfodiéster de 3' a 5'. Los compuestos antisentido que tienen uno o más enlaces internucleosídicos modificados, es decir, de origen no natural, a menudo se seleccionan sobre los compuestos antisentido que tienen enlaces internucleosídicos de origen natural debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, una mayor captación celular, una mayor afinidad por los ácidos nucleicos diana y un aumento de estabilidad en presencia de nucleasas.

[0101] 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. Los enlaces internucleosídicos que contienen fósforo representativos incluyen, pero no se limitan a, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidato y fosforotioatos. Los métodos de preparación de enlaces que contienen fósforo y no fósforo son bien conocidos.

[0102] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de ApoCIII comprenden uno o más enlaces internucleosídicos modificados. En ciertas realizaciones, los enlaces internucleosídicos modificados son enlaces de fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico de un compuesto antisentido es un enlace internucleosídico de fosforotioato.

Restos de azúcar modificados

[0103] Compuestos antisentido para uso de acuerdo con la invención pueden contener opcionalmente uno o más nucleósidos en donde el grupo azúcar se ha modificado. Dichos nucleósidos modificados con azúcar pueden impartir mayor estabilidad de la nucleasa, mayor afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, los nucleósidos comprenden restos de anillo de ribofuranosa químicamente modificados. Los ejemplos de anillos de ribofuranosa modificados químicamente incluyen, sin limitación, la adición de grupos sustituyentes (incluidos grupos sustituyentes 5' y 2', puente de átomos de anillo no geminal para

formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA), reemplazo del átomo de oxígeno del anillo de ribosilo con S, N(R) o C(R₁) (R₂) (R, R₁ y R₂ son cada uno independientemente H, C₁-C₁₂ alquilo o un grupo protector) y combinaciones de los mismos. Ejemplos de azúcares modificados químicamente incluyen 2'-F-5'-nucleósido sustituido con metilo (véase la solicitud internacional PCT WO 2008/101157 publicada el 8/21/08 para otros nucleósidos 5' ,2'-bis sustituidos descritos) o la sustitución del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S con sustitución adicional en la posición 2' (véase la solicitud de patente de EE.UU. publicada US2005-0130923, publicada el 16 de junio de 2005) o, alternativamente, sustitución 5' de un BNA (véase la solicitud internacional PCT WO 2007/134181 publicada el 11/22/07 en donde LNA está sustituido con, por ejemplo, un extremo 5' metilo o un grupo 5'-vinilo).

[0104] Ejemplos de nucleósidos que tienen restos de azúcar modificados incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden 5'-vinilo, 5'-metilo (*R* o *S*), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃, 2'-OCH₂CH₃, 2'-OCH₂CH₂F y 2'-O(CH₂)₂OCH₃ grupos sustituyentes. El sustituyente en la posición 2' también se puede seleccionar de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, OC₁-C₁₀ alquilo, OCF₃, OCH₂F, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂-ON(R_m)(R_n), O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n) y O-CH₂-C(=O)-N(R₁)-(CH₂)₂-N(R_m)(R_n), donde cada R₁, R_m y R_n es, independientemente, H o C₁-C₁₀ alquilo sustituido o no sustituido.

[0105] Como se usa en este documento, "nucleósidos bicíclicos" se refieren a nucleósidos modificados que comprenden un resto de azúcar bicíclico. Los ejemplos de ácidos nucleicos bicíclicos (BNA) incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo ribosilo 4' y 2'. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido para uso proporcionados en el presente documento incluyen uno o más nucleósidos de BNA en los que el puente comprende 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 sus análogos, véase la Patente de Estados Unidos 7.399.845, emitida el 15 de julio de 2008); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (y análogos de los mismos ver PCT/US2008/068922 publicada como WO/2009/006478, publicada en enero 8, 2009); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (y análogos de los mismos ver PCT/US2008/064591 publicada como WO/2008/150729, publicada de diciembre de 11, 2008); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (ver publicada solicitud de patente US US2004-0171570, publicada el 2 de septiembre del 2004); 4'-CH₂-N(R)-O-2', en donde R es H, C₁-C₁₂ alquilo, o un grupo protector (véase la patente de EE.UU. 7.427.672, expedida el 23 de septiembre de 2008); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (ver Chattopadhyaya et al, J. Org Chem, 2009, 74, 118-134); y 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (y análogos de los mismos ver PCT/US2008/066154 publicado como WO 2008/154401, publicado el 8 de diciembre de 2008).

[0106] Otros nucleósidos bicíclicos que han sido reportados en la literatura publicada (véase, por ejemplo: Srivastava et al, J. Am. Chem. Soc., 2007, 129 (26) 8362-8379; Frieden et al, Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372; Elayadi et al., Curr. Opinion Invens. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; Orum et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 2000, 97, 5633-5638; Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org Chem, 1998, 63, 10035-10039; Patentes de Estados Unidos N^{os.}: 7.399,845; 7.053.207; 7.034.133; 6.794.499; 6.770.748; 6.670.461; 6.525.191; 6.268.490; publicación de Patente de Estados Unidos N^o: US2008-0039618; US2007-0287831; US2004-0171570; Solicitudes de patentes de EE.UU., Números de serie: 12/129,154; 61/099,844; 61/097,787; 61/086,231; 61/056,564; 61/026,998; 61/026,995; 60/989,574; Solicitudes internacionales WO 2007/134181; WO 2005/021570; WO 2004/106356; WO 94/14226; y PCT Solicitudes Internacionales N^{os.}: PCT/US2008/068922; PCT/US2008/066154; y PCT/US2008/064591). Cada uno de los nucleósidos bicíclicos anteriores se puede preparar con una o más configuraciones de azúcar estereoquímicas que incluyen, 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 WO 99/14226).

[0107] Como se usa en este documento, "nucleósidos monocíclicos" se refieren a nucleósidos que comprenden restos de azúcar modificados que no son restos de azúcares bicíclicos. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar, o análogo de resto de azúcar, de un nucleósido puede modificarse o sustituirse en cualquier posición.

[0108] 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 dos átomos de carbono del anillo de furanosa conecta el átomo de carbono 2' y el átomo de carbono 4' del anillo de azúcar.

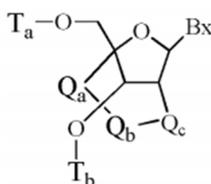
[0109] En ciertas realizaciones, los restos de azúcar bicíclicos de nucleósidos de BNA incluyen, pero no se limitan a, compuestos que tienen al menos un puente entre los átomos de carbono 4' y 2' del resto de azúcar pentofuranosilo que incluyen, sin limitación, puentes que comprenden 1 o de 1 a 4 grupos enlazados seleccionados independientemente de -[C(R_a)(R_b)]_n-, -C(R_a)=C(R_b)-, -C(R_a)=N-, -C(=NR_a)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R_a)₂-, -S(=O)_x-, y -N(R_a)-; en donde: x es 0, 1 o 2; n es 1, 2, 3 o 4; cada R_a y R_b es, independientemente, H, un grupo protector, hidroxilo, C₁-C₁₂ alquilo, alquilo C₁-C₁₂ alquilo sustituido, C₂-C₁₂ alqueno, C₂-C₁₂ alqueno sustituido, C₂-C₁₂ alquino, C₂-C₁₂ alquino sustituido, C₅-C₂₀ arilo, C₅-C₂₀ arilo sustituido, heterociclo radical, heterociclo radical sustituido, heteroarilo, sustituido heteroarilo, radical C₅-C₇ alicíclico, radical C₅-C₇ alicíclico sustituido, halógeno, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, CN, sulfonilo (S(=O)₂-J₁), o sulfoxilo (S(=O)-J₁); y cada J₁ y J₂ es, independientemente, H, C₁-C₁₂ alquilo, C₁-C₁₂ alquilo sustituido, C₂-C₁₂ alqueno, C₂-C₁₂ alqueno sustituido, C₂-C₁₂ alquino, C₂-C₁₂ alquino sustituido, C₅-C₂₀ arilo, C₅-C₂₀ arilo sustituido, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, C₁-C₁₂ aminoalquilo, C₁-C₁₂ aminoalquilo sustituido o una protección de grupo.

[0110] En ciertas realizaciones, el puente de un resto de azúcar bicíclico es, $-[C(R_a)(R_b)]_{n-}$, $-[C(R_a)(R_b)]_{n-O-}$, $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$ o $-C(R_aR_b)-O-N(R)-$. En ciertas realizaciones, el puente es $4'-CH_2-2'$, $4'-(CH_2)_2-2'$, $4'-(CH_2)_3-2'$, $4'-CH_2-O-2'$, $4'-(CH_2)_2-O-2'$, $4'-CH_2-O-N(R)-2'$ y $4'-CH_2-N(R)-O-2'$ en donde cada R es, independientemente, H, un protector de grupo o C₁-C₁₂ alquilo.

[0111] En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos se definen adicionalmente por configuración isomérica. Por ejemplo, un nucleósido que comprende un puente $4'-(CH_2)-O-2'$, puede estar en la configuración α -L o en la configuración β -D. Anteriormente, α -L-metilenoxi ($4'-CH_2-O-2'$) BNA de se han incorporado en oligonucleótidos antisentido que mostraban actividad antisentido (Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372).

[0112] En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos incluyen aquellos que tienen un puente de 4' a 2' en donde dichos puentes incluyen, sin limitación, α -L-4'-(CH₂)-O-2', β -D-4'-CH₂-O-2', $4'-(CH_2)_2-O-2'$, $4'-CH_2-O-N(R)-2'$, $4'-CH_2-N(R)-O-2'$, $4'-CH(CH_3)-O-2'$, $4'-CH_2-S-2'$, $4'-CH_2-N(R)-2'$, $4'-CH_2-CH(CH_3)-2'$, y $4'-(CH_2)_3-2'$, en donde R es H, un grupo protector o C₁-C₁₂ alquilo.

[0113] En cierta realización, los nucleósidos bicíclicos tienen la fórmula:



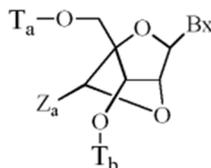
en donde:

Bx es un resto de base heterocíclico;

$-Q_a-Q_b-Q_c-$ es $-CH_2-N(R_c)-CH_2-$, $-C(=O)-N(R_c)-CH_2-$, $-CH_2-O-N(R_c)-$, $-CH_2-N(R_c)-O-$ o $-N(R_c)-O-CH_2-$;

R_c es C₁-C₁₂ alquilo o un grupo protector de amino; y T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte.

[0114] En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos tienen la fórmula:



en donde:

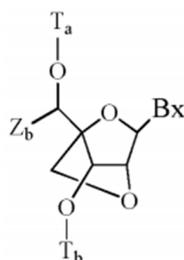
Bx es un resto de base heterocíclico;

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

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

[0115] En una realización, cada uno de los grupos sustituidos está, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, oxo, hidroxilo, OJ_c, NJ_cJ_d, SJ_c, N₃, OC(=X)J_c, y NJ_eC(=X)NJ_cJ_d, en donde cada J_c, J_d y J_e es, independientemente, H, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido y X es O o NJ_c.

[0116] En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos tienen la fórmula:



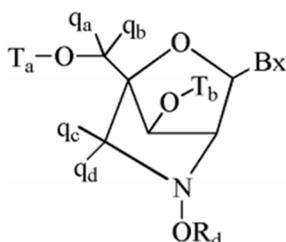
en donde:

Bx es un resto de base heterocíclico;

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

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

[0117] En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos tienen la fórmula:



en donde:

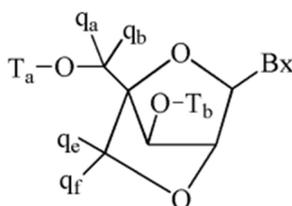
Bx es un resto de base heterocíclico;

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

R_d es C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquilo sustituido, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquenilo sustituido, C₂-C₆ alquinilo o C₂-C₆ alquinilo sustituido;

cada q_a, q_b, q_c y q_d es, independientemente, H, halógeno, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquilo sustituido, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquenilo sustituido, C₂-C₆ alquinilo o C₂-C₆ alquinilo sustituido, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ alcoxi sustituido, acilo, acilo sustituido, C₁-C₆ aminoalquilo o C₁-C₆ aminoalquilo sustituido;

[0118] En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos tienen la fórmula:



en donde:

Bx es un resto de base heterocíclico;

T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de 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, C₁-C₁₂ alquilo, C₁-C₁₂ alquilo sustituido, C₂-C₁₂ alquenilo, C₂-C₁₂ alquenilo sustituido, C₂-C₁₂ alquinilo, C₂-C₁₂ alquinilo sustituido, C₁-C₁₂ alcoxi, C₁-C₁₂ alcoxi sustituido, OJ_i, SJ_j, SOJ_j, SO₂J_j, NJ_jJ_k, N₃, CN, C(=O)OJ_i, C(=O)NJ_jJ_k, C(=O)J_i, OC(=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;

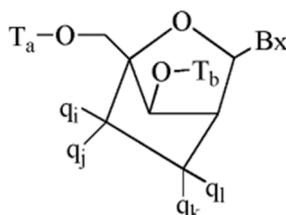
o q_e y q_f juntos son = C(q_g)(q_h);

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

[0119] La síntesis y la preparación de nucleósidos bicíclicos de adenina, citosina, guanina, 5-metil-citosina, timina y uracilo que tienen un puente 4'-CH₂-O-2', junto con su oligomerización y se han descrito las propiedades de reconocimiento de ácidos nucleicos (Koshkin et al., *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630). La síntesis de nucleósidos bicíclicos también se ha descrito en los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226.

[0120] También se han preparado análogos de varios nucleósidos bicíclicos que tienen grupos puente de 4' a 2' tales como 4'-CH₂-O-2' y 4'-CH₂-S-2' (Kumar et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222). También se ha descrito la preparación de dúplex de oligodesoxirribonucleótidos que comprenden nucleósidos bicíclicos para su uso como sustratos para polimerasas de ácido nucleico (Wengel et al., WO 99/14226). Además, la síntesis de 2'-amino-BNA, un análogo novedoso de oligonucleótido de alta afinidad restringido conformacionalmente se ha descrito en la técnica (Singh y col., *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039). Además, se han preparado 2'-amino- y 2'-metilamino-BNA y se ha informado previamente sobre la estabilidad térmica de sus dúplex con hebras complementarias de ARN y ADN.

[0121] En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos tienen la fórmula:



en donde:

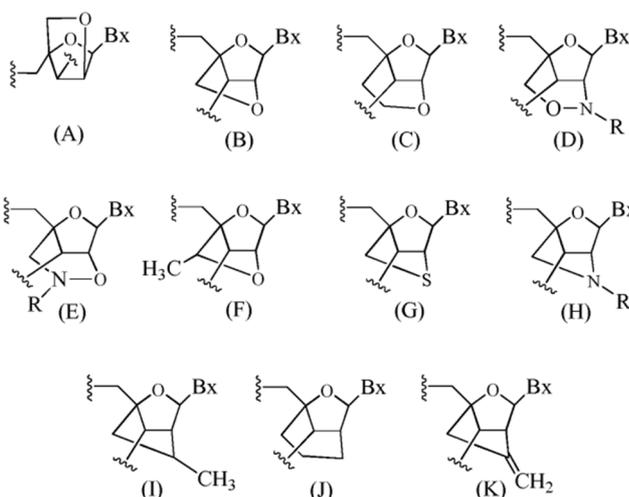
Bx es un resto de base heterocíclica; Ta y Tb son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;

cada qi, qj, qk y ql es, independientemente, H, halógeno, C₁-C₁₂ alquilo, C₁-C₁₂ alquilo sustituido, C₂-C₁₂ alqueno, C₂-C₁₂ alqueno sustituido, C₂-C₁₂ alquino, C₂-C₁₂ alquino sustituido, C₁-C₁₂ alcoxilo, C₁-C₁₂ alcoxilo sustituido, OJ_i, SJ_i, SO₂J_i, SO₂J_j, NJ_iJ_k, N₃, CN, C(=O)OJ_i, C(=O)NJ_iJ_k, C(=O)J_i, OC(=O)NJ_iJ_k, N(H)C(=NH)NJ_iJ_k, N(H)C(=O)NJ_iJ_k o N(H)C(=S)NJ_iJ_k; y

qi y qj o qi y qk juntos son =C(q_g)(q_h), en donde q_g y q_h son cada uno, independientemente, H, halógeno, C₁-C₁₂ alquilo o C₁-C₁₂ alquilo sustituido.

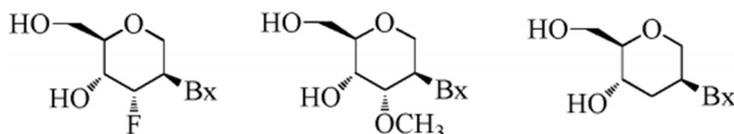
[0122] Se ha descrito un nucleósido carbocíclico bicíclico que tiene un puente 4'-(CH₂)₃-2' y el puente análogo de alqueno 4'-CH=CH-CH₂-2' (Frier et al., *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (22), 4429-4443 y Albaek et al., *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 7731-7740). También se ha descrito la síntesis y preparación de nucleósidos bicíclicos carbocíclicos junto con su oligomerización y estudios bioquímicos (Srivastava et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129 (26), 8362-8379).

[0123] En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos que 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 (también denominado como acetato de constreñido o CET), (G) de metileno-tio (4'-CH₂-S-2') BNA, (H) metileno-amino (4'-CH₂-N(R)-2') BNA, (I) metilo carbocíclico (4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA, (J) propileno carbocíclico (4'-(CH₂)₃-2') BNA y (K) vinilo BNA como se muestra a continuación.

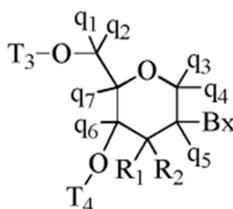


en donde Bx es el resto de base y R es, independientemente, H, un grupo protector, C₁-C₆ alquilo o C₁-C₆ alcoxi.

[0124] Como se usa en el presente documento, el término "nucleósido de tetrahidropirano modificado" o "nucleósido de THP modificado" significa un nucleósido que tiene un "azúcar" de tetrahidropirano de seis miembros sustituido por el residuo de pentofuranosilo en nucleósidos normales y puede denominarse azúcar sustituido. Los nucleósidos de THP modificados incluyen, entre otros, lo que se conoce en la técnica como ácido nucleico de hexitol (HNA), ácido nucleico de anitol (ANA), ácido nucleico de manitol (MNA) (véase Leumann, *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, 10, 841-854) o fluoro HNA (F-HNA) que tiene un sistema de anillo de tetrahidropirano como se ilustra a continuación.



[0125] En cierta realización, los sustitutos de azúcar se seleccionan con la fórmula:



en donde:

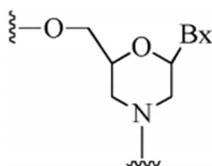
Bx es un resto de base heterocíclico; T₃ y T₄ son cada uno, independientemente, un grupo de enlace internucleosídico que une el análogo de nucleósido de tetrahidropirano al compuesto oligomérico o uno de T₃ y T₄ es un grupo de enlace internucleosídico que une el análogo de nucleósido de tetrahidropirano a un compuesto u oligonucleótido oligomérico 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, C₁-C₆ alquilo, alquilo C₁-C₆ alquilo sustituido, C₂-C₆ alquenoilo, C₂-C₆ alquenoilo sustituido, C₂-C₆ alquinoilo o C₂-C₆ alquinoilo sustituido; y

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

[0126] En ciertas realizaciones, q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ son cada una H. En ciertas realizaciones, al menos uno de q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ es diferente de H. En ciertas realizaciones, al menos uno de q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ es metilo. En ciertas realizaciones, los nucleósidos de THP se proporcionan en donde uno de R₁ y R₂ es F. En algunas realizaciones, R₁ es fluoro y R₂ es H; R₁ es metoxi y R₂ es H, y R₁ es metoxietoxi y R₂ es H.

[0127] En ciertas realizaciones, los sustitutos de azúcar comprenden anillos que tienen más de 5 átomos y más de un heteroátomo. Por ejemplo, se han informado nucleósidos que comprenden restos de azúcar morfolino y su uso en compuestos oligoméricos (véase, por ejemplo: Braasch et al., *Biochemistry*, 2002, 41, 4503-4510; y las patentes de los Estados Unidos 5.698.685; 5.166.315; 5.185.444; y 5.034.506). Como se usa aquí, el término "morfolino" significa un sustituto de azúcar que tiene la siguiente fórmula:

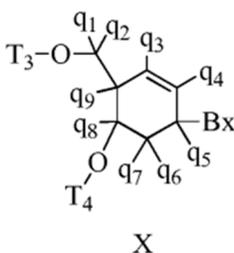


[0128] En ciertas realizaciones, los morfolinos pueden modificarse, por ejemplo, añadiendo o alterando varios grupos sustituyentes de la estructura de morfolino anterior. Dichos sustitutos del azúcar se denominan en el presente documento "morfolinos modificados".

[0129] También se proporcionan combinaciones de modificaciones, sin limitación, tales como nucleósidos sustituidos con 2'-F-5'-metilo (véase la solicitud internacional PCT WO 2008/101157 publicada el 21/08/08 para otros 5',2'-bis nucleósidos sustituidos) y el reemplazo del átomo de oxígeno del anillo de ribosilo con S y la sustitución adicional en la posición 2' (ver Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada US2005-0130923, publicada el 16 de junio de

2005) o alternativamente la sustitución 5' de un bicíclico ácido nucleico (ver la Solicitud Internacional PCT WO 2007/134181, publicada el 11/22/07 en donde un 4'-CH₂-O-2' nucleósido bicíclico está sustituido adicionalmente en la posición 5' con un extremo 5' metilo o un 5'-vinilo). También se ha descrito la síntesis y preparación de nucleósidos bicíclicos carbocíclicos junto con su oligomerización y estudios bioquímicos (véase, por ejemplo, Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc. 2007, 129 (26), 8362-8379).

[0130] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido comprenden uno o más nucleósidos de ciclohexenilo modificados, que es un nucleósido que tiene un ciclohexenilo de seis miembros en lugar del residuo de pentofuranosilo en nucleósidos de origen natural. Los nucleósidos de ciclohexenilo modificados incluyen, entre otros, los descritos en la técnica (véase, por ejemplo, la solicitud PCT publicada de propiedad común WO 2010/036696, publicada el 10 de abril de 2010, Robeyns et al., J. Am. Chem. Soc., 2008, 130 (6), 1979-1984; Horváth et al., Tetrahedron Letters, 2007, 48, 3621-3623; Nauwelaerts et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129 (30), 9340-9348; Gu et al., Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2005, 24 (5-7), 993-998; Nauwelaerts et al., Nucleic Acids Research, 2005, 33 (8), 2452-2463; Robeyns et al., Acta Crystallographica, Sección F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2005, F61 (6), 585-586; Gu et al., Tetrahedron, 2004, 60 (9), 2111-4123; Gu et al., Oligonucleotides, 2003, 13 (6), 479-489; Wang et al., J. Org. Chem., 2003, 68, 4499-4505; Verbeure et al., Nucleic Acids Research, 2001, 29 (24), 4941-4947; Wang y col., J. Org. Chem., 2001, 66, 8478-82; Wang y col., Nucleósidos, Nucleótidos y Ácidos Nucleicos, 2001, 20 (4-7), 785-788; Wang y col., J. Am. Chem., 2000, 122, 8595-8602; Solicitud PCT publicada, WO 06/047842; y la solicitud PCT publicada WO 01/049687). Ciertos nucleósidos de ciclohexenilo modificados tienen Fórmula X.



X

en donde independientemente para cada uno de dichos al menos un análogo de nucleósido de ciclohexenilo de Fórmula X:

Bx es un resto de base heterocíclico;

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

q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆, q₇, q₈ y q₉ son cada uno, independientemente, H, C₁-C₆ alquilo, alquilo C₁-C₆ alquilo sustituido, C₂-C₆ alqueno, C₂-C₆ alqueno sustituido, C₂-C₆ alquino, C₂-C₆ alquino sustituido u otro grupo sustituyente de azúcar.

[0131] Muchos otros sistemas de anillos monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos son conocidos en la técnica y son adecuados como sustitutos del azúcar que pueden usarse para modificar nucleósidos para su incorporación en compuestos oligoméricos como se proporciona en este documento (véase, por ejemplo, el artículo de revisión: Leumann, Christian J. Bioorg. y Med. Chem., 2002, 10, 841-854). Dichos sistemas de anillo pueden sufrir varias sustituciones adicionales para mejorar aún más su actividad.

[0132] Como se usa en este documento, "modificado en 2' del azúcar" significa un azúcar de furanosilo modificado en la posición 2'. En ciertas realizaciones, tales modificaciones incluyen sustituyentes seleccionados de: 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 2' se seleccionan de sustituyentes que incluyen, pero no se limitan a: O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nF, O(CH₂)_nONH₂, OCH₂C(=O)N(H)CH₃ y O(CH₂)_nON[(CH₂)CH₃]₂, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros grupos 2'-sustituyentes también pueden seleccionarse a partir de: C₁-C₁₂ alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, o-alcarilo o o-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, F, CF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un compuesto antisentido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. En ciertas realizaciones, los nucleósidos modificados comprenden una cadena lateral 2'-MOE (Baker y col., J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000). Dicha sustitución de 2'-MOE se ha descrito 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 uso *in vivo* (Martin, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann et al., 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).

[0133] Como se usa en el presente documento, "modificado en 2'" o "sustituido en 2'" 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 limitación, 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 nucleósidos con sustituyentes 2 no puente, tales como alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-C₁-C₁₀ alquilo, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-ON(R_m)(R_n) u O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), donde cada R_m y R_n es, independientemente, H o C₁-C₁₀ alquilo 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 nucleobase.

[0134] Como se usa en el presente documento, "2'-F" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo flúor en la posición 2' del anillo de azúcar.

[0135] Como se usa en este documento, "2'-OMe" o "2'-OCH₃", "2'-O-metilo" o "2' metoxi" se refieren a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo -OCH₃ en la posición 2' del anillo de azúcar.

[0136] Como se usa en este documento, "MOE" o "2'-MOE" o "2'-OCH₂CH₂OCH₃" o "2'-O-metoxietilo" cada uno se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo -OCH₂CH₂OCH₃ en la posición 2' del anillo de azúcar.

[0137] Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para la preparación de azúcares modificados. Algunas patentes representativas de EE.UU. que enseñan la preparación de dichos azúcares modificados incluyen, entre otras, las US: 4,981,957; 5.118,800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393,878; 5,446,137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567,811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639,873; 5.646.265; 5.670.633; 5.700.920; 5.792,847 y 6.600.032 y la solicitud internacional PCT/US2005/019219, presentada el 2 de junio de 2005 y publicada como WO 2005/121371 el 22 de diciembre de 2005.

[0138] Como se usa en el presente documento, "oligonucleótido" se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, se modifica uno o más de la pluralidad de nucleósidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido comprende uno o más ribonucleósidos (ARN) y/o desoxirribonucleósidos (ADN).

[0139] En los nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados, los restos de nucleobase (naturales, modificados o una combinación de los mismos) se mantienen para la hibridación con una diana de ácido nucleico apropiado.

[0140] En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido comprenden uno o más nucleósidos que tienen restos de azúcar modificados. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar modificado es 2'-MOE. En ciertas realizaciones, los nucleósidos modificados con 2'-MOE están dispuestos en un motivo gámpero. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar modificado es un nucleósido bicíclico que tiene una (4'-CH(CH₃)-O-2') grupo puente. En ciertas realizaciones, los nucleósidos modificados (4'-CH(CH₃)-O-2') están dispuestos a lo largo de las alas de un motivo gámpero.

Nucleobases modificadas

[0141] Las modificaciones o sustituciones de nucleobase (o base) son estructuralmente distinguibles, pero funcionalmente intercambiables con nucleobases no modificadas de origen natural o sintético. Tanto las nucleobases naturales como las modificadas son capaces de participar en enlaces de hidrógeno. Dichas modificaciones de nucleobase pueden impartir estabilidad de nucleasa, afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a compuestos antisentido. Las nucleobases modificadas incluyen nucleobases sintéticas y naturales tales como, por ejemplo, 5-metilcitosina (5-me-C). Ciertas sustituciones de nucleobase, incluidas las 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 de ácido nucleico en 0,6-1,2 ° C (Sanghvi, YS, Crooke, ST y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278).

[0142] Nucleobases modificadas adicionales incluyen 5-hidroximetilo citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinilo (-C≡C-CH₃) uracilo y citosina y otros derivados alquínilo de bases pirimidínicas, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos 5-sustituidos 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.

[0143] Restos de bases heterocíclicas pueden incluir aquellos en los que la base de purina o pirimidina se reemplaza con otros heterociclos, por ejemplo 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Las

nucleobases que son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos antisentido incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas N-2, N-6 y O-6, que incluyen 2 aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilocitosina.

- 5 **[0144]** En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico ApoCIII comprenden una o más nucleobases modificadas. En ciertas realizaciones, la nucleobase modificada es 5-metilcitosina. En ciertas realizaciones, cada citosina es una 5-metilcitosina.

Composiciones y métodos para formular composiciones farmacéuticas

- 10 **[0145]** Los compuestos antisentido pueden mezclarse con una sustancia activa o inerte farmacéuticamente aceptable para la preparación de composiciones o formulaciones farmacéuticas. Las composiciones y los métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas dependen de una serie de criterios, que incluyen, entre otros, la vía de administración, el alcance de la enfermedad o la dosis a administrar.

- 15 **[0146]** Los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico ApoCIII pueden utilizarse en composiciones farmacéuticas combinando el compuesto antisentido con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado.

- 20 **[0147]** En ciertas realizaciones, el "vehículo farmacéutico" o "excipiente" es un disolvente, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte farmacéuticamente aceptable para administrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y puede seleccionarse, teniendo en cuenta la forma de administración planificada, para proporcionar el volumen, la consistencia, etc. deseados, cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica dada. Los vehículos farmacéuticos típicos incluyen, pero no se limitan a, agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); cargas (p. ej., lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliácridatos o fosfato de hidrógeno y calcio, etc.); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.); desintegrantes (por ejemplo, almidón, almidón glicolato de sodio, etc.); y agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, etc.).

- 30 **[0148]** Los excipientes farmacéuticamente aceptables orgánicos o inorgánicos, que no reaccionan perjudicialmente con ácidos nucleicos, adecuados para la administración parenteral o no parenteral también se pueden utilizar para formular las composiciones para uso de acuerdo con la presente invención. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

- 35 **[0149]** Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye solución salina tamponada con fosfato (PBS). PBS es un diluyente adecuado para su uso en composiciones para ser administradas por vía parenteral. Por consiguiente, en una realización, empleada en los métodos descritos en el presente documento es una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de ApoCIII y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, el diluyente farmacéuticamente aceptable es PBS. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido.

- 40 **[0150]** Las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos antisentido abarcan cualquier sal, éster o sal farmacéuticamente aceptable de dichos ésteres, o un oligonucleótido que, tras la administración a un animal, incluido un humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo de los mismos. Por consiguiente, por ejemplo, la divulgación también se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de compuestos antisentido, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales de sodio y potasio.

- 45 **[0151]** Un profármaco puede incluir la incorporación de nucleósidos adicionales en uno o ambos extremos de un compuesto antisentido que son escindidos por nucleasas endógenas dentro del cuerpo, para formar el compuesto antisentido activo.

Compuestos antisentido conjugados

- 50 **[0152]** Los compuestos antisentido se pueden unir covalentemente a uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular de los oligonucleótidos antisentido resultantes. Los grupos conjugados típicos incluyen restos de colesterol y restos de lípidos. Los grupos conjugados adicionales incluyen carbohidratos, fosfolípidos, biotina, fenazina, ácido fólico, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes.

- 55 **[0153]** Los compuestos antisentido también se pueden modificar para tener uno o más grupos estabilizadores que

están generalmente unidos a uno o ambos extremos terminales de compuestos antisentido para mejorar las propiedades tales como, por ejemplo, la estabilidad de la nucleasa. Se incluyen en los grupos estabilizadores las estructuras de tapa. Estas modificaciones terminales protegen el compuesto antisentido de la degradación de exonucleasa y pueden ayudar en el suministro y/o localización dentro de una célula. La tapa puede estar presente en el terminal 5' (tapa 5'), o en el terminal 3' (tapa 3'), o puede estar presente en ambas terminales. Las estructuras de tapones son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, tapones desoxi abásicos invertidos. Otros grupos estabilizadores 3' y 5' que pueden usarse para tapar uno o ambos extremos de un compuesto antisentido para impartir estabilidad nucleasa incluyen los descritos en el documento WO 03/004602 publicado el 16 de enero de 2003.

10 *Cultivo celular y tratamiento de compuestos antisentido*

[0154] Los efectos de los compuestos antisentido sobre el nivel, la actividad o la expresión de los ácidos nucleicos o proteínas ApoCIII se pueden probar in vitro en una variedad de tipos de células. Los tipos de células utilizados para tales análisis están disponibles en proveedores comerciales (por ejemplo, American Type Culture Collection, Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walkersville, MD) y las células se cultivan de acuerdo con las instrucciones del proveedor utilizando reactivos disponibles comercialmente (por ejemplo, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Los tipos de células ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, células HepG2, células Hep3B, células Huh7 (carcinoma hepatocelular), hepatocitos primarios, células A549, fibroblastos GM04281 y células LLCMK2.

20 *Pruebas in vitro de oligonucleótidos antisentido*

[0155] En este documento se describen métodos para el tratamiento de células con oligonucleótidos antisentido, que pueden modificarse apropiadamente para el tratamiento con otros compuestos antisentido.

[0156] En general, las células se tratan con oligonucleótidos antisentido cuando las células alcanzan aproximadamente 60-80% de confluencia en cultivo.

[0157] Un reactivo comúnmente usado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye el reactivo de transfección de lípidos catiónicos LIPOFECTIN® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los oligonucleótidos antisentido se mezclan con LIPOFECTIN® en OPTI-MEM® 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para lograr la concentración final deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración de LIPOFECTIN® que típicamente varía de 2 a 12 ug/mL por oligonucleótido antisentido 100 nM.

[0158] Otro reactivo usado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye LIPOFECTAMINE 2000® (Invitrogen, Carlsbad, CA). El oligonucleótido antisentido se mezcla con LIPOFECTAMINE 2000® en medio sérico reducido OPTI-MEM® 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para lograr la concentración deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración de LIPOFECTAMINE® que generalmente varía de 2 a 12 ug/mL por 100 nM antisentido oligonucleótido.

[0159] Otro reactivo usado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye Cytofectin® (Invitrogen, Carlsbad, CA). El oligonucleótido antisentido se mezcla con Cytofectin® en medio sérico reducido OPTI-MEM® 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para lograr la concentración deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración de Cytofectin® que generalmente varía de 2 a 12 ug/ml por oligonucleótido antisentido 100 nM.

[0160] Otro reactivo utilizado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye Oligofectamine™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). El oligonucleótido antisentido se mezcla con Oligofectamine™ en Opti-MEM™-1 medio sérico reducido (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) para lograr la concentración deseada de oligonucleótido con una relación de Oligofectamine™ a oligonucleótido de aproximadamente 0,2 a 0,8 µL por 100 nM.

[0161] Otro reactivo utilizado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye FuGENE 6 (Roche Diagnostics Corp., Indianápolis, IN). El compuesto oligomérico antisentido se mezcló con FuGENE 6 en 1 ml de RPMI sin suero para lograr la concentración deseada de oligonucleótido con una relación de FuGENE 6 a compuesto oligomérico de 1 a 4 µL de FuGENE 6 por 100 nM.

[0162] Otra técnica utilizada para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye electroporación (Sambrook y Russell en Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Tercera Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. 2001).

[0163] Las células se tratan con oligonucleótidos antisentido por métodos de rutina. Las células se cosechan típicamente 16-24 horas después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido, momento en el cual los niveles de ARN o proteína de los ácidos nucleicos diana se miden por métodos conocidos en la técnica y descritos en este documento (Sambrook y Russell en Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Tercera Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001). En general, cuando los tratamientos se realizan en múltiples repeticiones, los datos se presentan como el promedio de los tratamientos replicados.

[0164] La concentración de oligonucleótidos antisentido varía utilizados de la línea celular a línea celular. Los métodos para determinar la concentración óptima de oligonucleótidos antisentido para una línea celular particular son bien conocidos en la técnica (Sambrook y Russell en Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Tercera Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. 2001). Los oligonucleótidos antisentido se usan típicamente en concentraciones que varían de 1 nM a 300 nM cuando se transfectan con LIPOFECTAMINE2000® (Invitrogen, Carlsbad, CA), Lipofectin® (Invitrogen, Carlsbad, CA) o Cytofectin™ (Genlantis, San Diego, CA). Los oligonucleótidos antisentido se usan en concentraciones más altas que varían de 625 a 20.000 nM cuando se transfectan mediante electroporación.

10 *Aislamiento de ARN*

[0165] El análisis de ARN se puede realizar sobre el ARN celular total o poli(A)+ ARNm. Los métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica (Sambrook and Russell in Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Tercera Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. 2001). El ARN se prepara utilizando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando el reactivo TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con los protocolos recomendados por el fabricante.

Análisis de inhibición de niveles diana o expresión

[0166] La inhibición de los niveles o la expresión de un ácido nucleico ApoCIII puede ensayarse en una variedad de formas conocidas en la técnica (Sambrook y Russell in Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Tercera Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001). Por ejemplo, los niveles de ácido nucleico diana pueden cuantificarse mediante, por ejemplo, análisis de transferencia Northern, reacción en cadena de polimerasa competitiva (PCR) o PCR cuantitativa en tiempo real. El análisis de ARN se puede realizar en ARN celular total o poli(A)+ ARNm. Los métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. El análisis de transferencia Northern también es una rutina en la técnica. La PCR cuantitativa en tiempo real puede realizarse convenientemente utilizando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7600, 7700 o 7900 disponible en el mercado, disponible en PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y utilizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

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

[0167] La cuantificación de los niveles de ARN diana se puede lograr mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando el sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7600, 7700 o 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante. Los métodos de PCR cuantitativa en tiempo real son bien conocidos en la técnica.

[0168] 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. Los reactivos de RT y PCR en tiempo real se obtienen de Invitrogen (Carlsbad, CA). Las reacciones de RT y PCR en tiempo real se llevan a cabo mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

[0169] Las cantidades diana de genes (o ARN) obtenidas por PCR en tiempo real pueden normalizarse usando el nivel de expresión de un gen cuya expresión es constante, tal como ciclofilina A, o cuantificando ARN total usando RIBOGREEN® (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA). La expresión de ciclofilina A se cuantifica por PCR en tiempo real, ejecutándose simultáneamente con la diana, multiplexando o por separado. El ARN total se cuantifica usando el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA). Los métodos de cuantificación de ARN por RIBOGREEN® se enseñan en Jones, LJ y otros (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374). Se utiliza un instrumento CYTOFLUOR® 4000 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) para medir la fluorescencia RIBOGREEN®.

[0170] Las sondas y cebadores se diseñan para hibridar con un ácido nucleico ApoCIII. Los métodos para diseñar sondas y cebadores de PCR en tiempo real son bien conocidos en la técnica, y pueden incluir el uso de software como PRIMER EXPRESS® Software (Applied Biosystems, Foster City, CA).

[0171] Las cantidades diana del gen obtenidas por RT, PCR en tiempo real pueden usar el nivel de expresión de GAPDH o ciclofilina A, genes cuya expresión es constante, o cuantificando el ARN total usando RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). La expresión de GAPDH o ciclofilina A se puede cuantificar por RT, PCR en tiempo real, ejecutándose simultáneamente con la diana, multiplexando o por separado. El ARN total se cuantificó usando el reactivo de cuantificación de ARN RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR).

Análisis de los niveles de proteína

[0172] La inhibición antisentido de los ácidos nucleicos de ApoCIII se puede evaluar midiendo los niveles de proteína de ApoCIII. Los niveles de proteína de ApoCIII pueden evaluarse o cuantificarse de varias maneras bien conocidas en

la técnica, tales como inmunoprecipitación, análisis de transferencia Western (inmunotransferencia), ensayo de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA), ensayos cuantitativos de proteínas, ensayos de actividad de proteínas (por ejemplo, ensayos de actividad de caspasa), inmunohistoquímica, inmunocitoquímica o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) (Sambrook y Russell en Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Tercera Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. 2001). Los anticuerpos dirigidos a una diana pueden identificarse y obtenerse de una variedad de fuentes, como el catálogo de anticuerpos MSRS (Aerie Corporation, Birmingham, MI), o pueden prepararse mediante métodos convencionales de generación de anticuerpos monoclonales o policlonales bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos útiles para la detección de ApoCIII humano y de ratón están disponibles comercialmente.

Pruebas in vivo de compuestos antisentido

[0173] Los compuestos antisentido, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, se prueban en animales para evaluar su capacidad para inhibir la expresión de ApoCIII y producir cambios fenotípicos. Las pruebas se pueden realizar en animales normales o en modelos 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 parenterales de administración. El cálculo de la dosificación de oligonucleótidos antisentido y la frecuencia de dosificación dependen de factores tales como la vía de administración y el peso corporal del animal. Después de un período de tratamiento con oligonucleótidos antisentido, se aísla el ARN del tejido y se miden los cambios en la expresión de ácido nucleico de ApoCIII. Los cambios en los niveles de proteína ApoCIII también se miden.

Ciertas indicaciones

[0174] En ciertos casos, se describen en el presente documento compuestos y métodos mejorados para tratar a un sujeto que tiene diabetes, en riesgo de tener diabetes, o un síntoma de la misma. En ciertos casos, la diabetes, un síntoma de la misma, mejora. En ciertos casos, el riesgo de tener diabetes disminuye. En ciertos casos, el compuesto comprende un compuesto antisentido dirigido a un ApoCIII.

[0175] En ciertas realizaciones, la administración de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico ApoCIII a un sujeto da como resultado la reducción de la expresión de ApoCIII 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 rango definido por cualquiera de estos dos valores. En ciertas realizaciones, la expresión de ApoCIII se reduce a ≤ 50 mg/L, ≤ 60 mg/L, ≤ 70 mg/L, ≤ 80 mg/L, ≤ 90 mg/L, ≤ 100 mg/L, ≤ 110 mg/L, ≤ 120 mg/L, ≤ 130 mg/L, ≤ 140 mg/L, ≤ 150 mg/L, ≤ 160 mg/L, ≤ 170 mg/L, ≤ 180 mg/L, ≤ 190 mg/L o ≤ 200 mg/l.

[0176] En ciertas realizaciones, los compuestos dirigidos a ApoCIII como se describe en la presente memoria mejora un perfil diabético y/o un perfil lipídico modulando marcadores fisiológicos o fenotipos en un sujeto. En algunos de los experimentos, los compuestos pueden aumentar o disminuir los marcadores fisiológicos o fenotipos en comparación con los sujetos no tratados. En ciertas realizaciones, el aumento o disminución de marcadores fisiológicos o fenotipos está asociado con la inhibición de ApoCIII por los compuestos descritos en el presente documento.

[0177] En ciertas realizaciones, los marcadores fisiológicos o el fenotipo de un perfil diabético y/o lipídico pueden cuantificarse mediante pruebas de laboratorio estándar. En ciertas realizaciones, los marcadores fisiológicos o fenotipos tales como HDL pueden incrementarse en aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99%, o un rango definido por cualquiera de estos dos valores. En ciertas realizaciones, marcadores fisiológicos o fenotipos tales como índice de sensibilidad a la insulina, nivel de glucosa, tasa de eliminación de glucosa, MCR de glucosa y/o metabolismo de glucosa: la ración de insulina mejora en aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99%, o un rango definido por cualquiera de estos dos valores. En ciertas realizaciones, los marcadores o fenotipos fisiológicos tales como ácidos grasos libres, resistencia a la insulina, TG, no HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contiene VLDL, ApoB y/o LDL-C se reducen en aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99%, o un rango definido por cualquiera de estos dos valores.

Administración

[0178] Los compuestos o composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención se puede administrar en un número de maneras, dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área a ser tratada. La administración puede ser oral o parenteral.

[0179] En ciertas realizaciones, los compuestos y composiciones como se describen en el presente documento se administran parenteralmente. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular.

[0180] En ciertas realizaciones, la administración parenteral es por infusión. La infusión puede ser crónica o continua o corta o intermitente. En ciertas realizaciones, los agentes farmacéuticos infundidos se administran con una bomba.

En ciertas realizaciones, la infusión es intravenosa.

[0181] En ciertas realizaciones, la administración parenteral es por inyección. La inyección puede administrarse con una jeringa o una bomba. En ciertas realizaciones, la inyección es una inyección en bolo. En ciertas realizaciones, la inyección se administra directamente a un tejido u órgano. En ciertas realizaciones, la administración parenteral es subcutánea.

[0182] En ciertas realizaciones, las formulaciones para administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero sin limitación, potenciadores de penetración, compuestos de soporte y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

[0183] En ciertas realizaciones, las formulaciones para la administración oral de los compuestos o composiciones para su uso de acuerdo con la invención pueden incluir, pero no se limitan a, vehículos farmacéuticos, excipientes, polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, bolsitas, tabletas o minitables. Pueden ser deseables espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, agentes dispersantes o aglutinantes. En ciertas realizaciones, las formulaciones orales son aquellas en las que los compuestos para uso según la invención se administran junto con uno o más potenciadores de la penetración, tensioactivos y quelantes.

Dosificación

[0184] En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran de acuerdo con un régimen de dosificación (por ejemplo, dosis, frecuencia de dosis y duración) en donde el régimen de dosificación se puede seleccionar para lograr un efecto deseado. El efecto deseado puede ser, por ejemplo, la reducción de ApoCIII o la prevención, reducción, mejora o ralentización de la progresión de una enfermedad o afección asociada con una enfermedad, trastorno o afección cardiovascular y/o metabólica, o síntoma de la misma.

[0185] En ciertas realizaciones, las variables del régimen de dosificación se ajustan para dar como resultado una concentración deseada de composición farmacéutica en un sujeto. La "concentración de composición farmacéutica" tal como se usa con respecto al régimen de dosis puede referirse al compuesto, oligonucleótido o ingrediente activo de la composición farmacéutica. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la dosis y la frecuencia de dosis se ajustan para proporcionar una concentración de tejido o concentración plasmática de una composición farmacéutica en una cantidad suficiente para lograr un efecto deseado.

[0186] La dosificación depende de la gravedad y la capacidad de respuesta del estado de la enfermedad a tratar, con una duración del tratamiento de varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución del estado de la enfermedad. La dosificación también depende de la potencia y el metabolismo del fármaco. En ciertas realizaciones, la dosis es de 0,01 µg a 100 mg por kg de peso corporal, o dentro de un rango de dosificación de 0,001 mg - 1000 mg, y se puede administrar una o más veces al día, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Después de un tratamiento exitoso, puede ser deseable que el sujeto se someta a una terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado de la enfermedad, en donde el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que van desde 0,01 µg a 100 mg por kg de peso corporal, una vez o más al día, a una vez cada 20 años o con una dosis de 0,001mg a 1000mg.

Ciertas terapias de combinación

[0187] En ciertas realizaciones, un primer agente que comprende el compuesto descrito en el presente documento se administra conjuntamente con uno o más agentes secundarios. En ciertas realizaciones, dichos segundos agentes están diseñados para tratar la misma enfermedad, trastorno o afección que el primer agente descrito aquí. En ciertas realizaciones, dichos segundos agentes están diseñados para tratar una enfermedad, trastorno o afección diferente como el primer agente descrito en este documento. En ciertas realizaciones, un primer agente está diseñado para tratar un efecto secundario no deseado de un segundo agente. En ciertas realizaciones, los segundos agentes se administran conjuntamente con el primer agente para tratar un efecto no deseado del primer agente. En ciertas realizaciones, dichos segundos agentes están diseñados para tratar un efecto secundario no deseado de una o más composiciones farmacéuticas como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, los segundos agentes se administran conjuntamente con el primer agente para producir un efecto combinacional. En ciertas realizaciones, los segundos agentes se administran conjuntamente con el primer agente para producir un efecto sinérgico. En ciertas realizaciones, la administración conjunta del primer y segundo agente permite el uso de dosis más bajas de las que se requerirían para lograr un efecto terapéutico o profiláctico si los agentes se administraran como terapia independiente.

[0188] En ciertas realizaciones, una o más composiciones descritas en este documento y uno o más agentes farmacéuticos adicionales se administran al mismo tiempo. En ciertas realizaciones, una o más composiciones para uso según la invención y uno o más agentes farmacéuticos adicionales se administran en diferentes momentos. En ciertas realizaciones, una o más composiciones descritas en este documento y uno o más de otros agentes

farmacéuticos se preparan juntos en una sola formulación. En ciertas realizaciones, una o más composiciones descritas en este documento y uno o más de otros agentes farmacéuticos se preparan por separado.

[0189] En ciertas realizaciones, los segundos agentes incluyen, pero no se limitan al agente reductor de ApoCIII, inhibidor de DGAT1, agente elevador de LPL, agente reductor de colesterol, agente reductor de lípidos sin HDL (por ejemplo, LDL), agente elevador de HDL, aceite de pescado, niacina (ácido nicotínico), fibrato, estatina, DCCR (sal de diazóxido), agente reductor de glucosa y/o agentes antidiabéticos. En ciertas realizaciones, el primer agente se administra en combinación con la dosis máxima tolerada del segundo agente. En ciertas realizaciones, el primer agente se administra a un sujeto que no responde a una dosis máxima tolerada del segundo agente.

[0190] Los ejemplos de agentes reductores de ApoCIII incluyen un oligonucleótido antisentido ApoCIII diferente del primer agente, un fibrato o un oligonucleótido antisentido de Apo B.

[0191] Un ejemplo de un inhibidor de DGAT1 es LCQ908 (Novartis Pharmaceuticals) que se está probando actualmente en un ensayo clínico de fase 3 para tratar el síndrome de quilomicronemia familiar.

[0192] Agentes gasificantes LPL incluyen agentes de terapia génica que elevan el nivel de LPL. Los ejemplos de tales agentes incluyen copias de genes normales que complementan la falta del gen normal. Por ejemplo, Glybera[®] aumenta los niveles de LPL al proporcionar copias normales del gen LPL para complementar la falta del gen LPL normal. En otros ejemplos, el agente de aumento de LPL incluye copias normales de ApoC-II, GPIHBP1, APOA5, LMF1 u otros genes que, cuando mutan, pueden conducir a LPL disfuncional. En ciertas realizaciones, la combinación del primer agente (por ejemplo, ApoCIII ASO) y el segundo agente (por ejemplo, Glybera) proporciona un efecto aditivo o sinérgico.

[0193] Los ejemplos de agentes reductores de la glucosa y/o antidiabéticos incluyen, entre otros, un cambio terapéutico en el estilo de vida, agonista de PPAR, un inhibidor de dipeptidilo 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, metformina, sulfonilurea, rosiglitazona, meglitinida, tiazolidinediona, inhibidor de alfa-glucosidasa y similares. La sulfonilurea puede ser acetohexamida, clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, glimepirida, una glipizida, una gliburida o una gliclazida. La meglitinida puede ser nateglinida o repaglinida. La tiazolidinediona puede ser pioglitazona o rosiglitazona. La alfa-glucosidasa puede ser acarbosa o miglitol.

[0194] El colesterol o la terapia hipolipemiente puede incluir, pero no se limita a, un cambio de estilo de vida terapéutico, las estatinas, secuestrantes de ácidos de bilis, ácido nicotínico y los fibratos. Las estatinas pueden ser atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina y similares. Los secuestrantes de ácidos biliares pueden ser colesvelam, colestiramina, colestipol y similares. Los fibratos pueden ser gemfibrozilo, fenofibrato, clofibrato y similares. El cambio de estilo de vida terapéutico puede ser la restricción de grasas en la dieta. El secuestrante de ácidos biliares puede ser colesvelam, colestiramina, colestipol o similares.

[0195] Los agentes HDL crecientes incluyen los fármacos inhibidores de la proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP) (tales como torcetrapib), peroxisomas agonistas de los receptores de proliferación activa, Apo-A1, pioglitazona y similares.

Ciertos compuestos

[0196] Hemos descrito previamente composiciones que comprenden compuestos antisentido dirigidos a ApoCIII y métodos para inhibir ApoCIII por los compuestos antisentido en los documentos US 20040208856 (Patente de Estados Unidos 7.598.227), US 20060264395 (Patente de Estados Unidos 7.750.141), WO 2004/093783 y WO 2012/149495. En estas aplicaciones, se diseñó una serie de compuestos antisentido para apuntar a diferentes regiones del ARN ApoCIII humano, utilizando secuencias publicadas (nucleótidos 6238608 a 6242565 del número de acceso GenBank NT_035088.1, que representa una secuencia genómica, incorporada aquí como SEQ ID NO: 3 y el número de acceso GenBank NM_000040.1, incorporado aquí como SEQ ID NO: 1). Los compuestos eran oligonucleótidos quiméricos ("Gámpmeros") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región "hueco" central que consta de diez 2'-desoxinucleótidos, que estaba flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por cinco nucleótidos "alas". Las alas estaban compuestas de nucleótidos 2'-O-(2-metoxietilo), también conocidas como nucleótidos (2'-MOE). Los enlaces internucleosídicos (esqueleto) fueron fosforotioato (P = S) en todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citosina fueron 5-metilcitosinas. Un compuesto ejemplar descrito en estas aplicaciones es ISIS 304801 (AGCTTCTTGCCAGCTTTAT, (SEQ ID NO: 4)).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: ISIS 304801 Ensayo clínico de fase II

[0197] Se realizó un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo para evaluar el efecto de ISIS 304801 frente a placebo en los niveles de ApoC-III, niveles altos de triglicéridos y diabetes tipo 2 (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01647308?term=isis&rank=5>). Los pacientes fueron diagnosticados con

hipertrigliceridemia y diabetes tipo 2 durante al menos 6 meses y han estado en una dosis estable de metformina (≥ 1 g/día) durante al menos 4 semanas antes del examen para el estudio. Sus niveles de triglicéridos en ayunas estaban entre aproximadamente 200 y 500 mg/dL y los niveles de HbA1C eran mayores o iguales al 7% y menores al 9%. Las características iniciales adicionales se proporcionan en la Tabla 1 a continuación.

5

Tabla 1

Características basales de los pacientes en el estudio de fase 2		
	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 7)
Género (M: F)	3:1	5:2
Edad (años)	53	57
IMC (kg/m ²)	34	34
Glucosa en ayunas (mg/dL)	185	168
HbA1c (%)	7,8	7,8
Lípidos y lipoproteínas en ayunas, mg/dL		
ApoC-III (mg/dL)	12	14
Triglicéridos (mg/dL)	223	259
HDL-C (ppt; mg/dL)	39	43
No HDL-C (calc; mg/dL)	188	178
Apo B (mg/dL)	128	115
LDL-C (ultacente; mg/dL)	147	126
Colesterol total (mg/dL)	227	221
VLDL-ApoC-III (mg/dL)	6	7
VLDL-C (mg/dL)	42	51

10

15

20

25

[0198] Los pacientes fueron asignados al azar 2:1 para el tratamiento con ISIS 304801 o placebo. Para cada paciente, el período de participación consiste en un período de selección de ≤ 4 semanas, un período de calificación de estudio/evaluación inicial de 2 días, un período de tratamiento de 13 semanas y un período de evaluación posterior al tratamiento de 13 semanas. Los medicamentos concomitantes y los eventos adversos (EA) se registrarán durante todos los períodos del estudio.

30

Estudio de Drogas y Tratamiento

35

[0199] Se proporcionó una solución de ISIS 304801 (200 mg/ml, 1,0 ml) contenida en viales de vidrio taponados de 2 mL. Fue designada como el fármaco activo.

[0200] El placebo para este estudio fue solución salina estéril al 0,9%. El fármaco activo y el placebo se conocen como fármaco de estudio.

40

[0201] La solución de ISIS 304801 y placebo se prepararon por un farmacéutico no ciego (o delegado cualificado). Los viales fueron de un solo uso. Un profesional capacitado, cegado a la identidad de la droga, administró la droga del estudio. El fármaco del estudio se administró como una inyección SC en el abdomen, muslo o área externa de la parte superior del brazo en cada día de dosificación. Cada dosis de 300 mg se administró como una única inyección SC de 1,5 ml.

45

[0202] Los pacientes recibieron 15 dosis del fármaco del estudio administrado por inyección SC durante 13 semanas (días 1, 3, 5, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 y 85).

50

[0203] Los pacientes completaron las visitas de tratamiento el día 1 ± 0 días y los días 3, 5, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 y 85 dentro de ± 1 día. Los pacientes completaron las visitas de seguimiento en los días 90-92, día 99 ± 1 día, día 127 ± 3 días, y el estudio finalizó con una visita el día 176 dentro de los ± 5 días de la fecha de visita programada.

55

[0204] Los pacientes ayunaron durante la noche y se recogieron muestras de sangre en los días -2 y -1 y durante las visitas de tratamiento en los días 1, 3, 5, 8, 15, 29 y 57, y durante las visitas de seguimiento en los días 90 91, 92, 99, 127 y 176. Los pacientes se sometieron a procedimientos de pinzamiento euglicémico hiperinsulinémico realizados en los días 1 y 92.

60

[0205] No hubo problemas de seguridad sin eventos adversos significativos relacionados con el fármaco y sin cambios clínicamente relevantes en las evaluaciones de laboratorio para los parámetros de seguridad. Específicamente, no hubo elevaciones de enzimas hepáticas clínicamente relevantes. El tratamiento fue tolerable para todos los pacientes; no hubo interrupciones y una baja incidencia de reacciones en el sitio de inyección, que fueron principalmente eritema leve. No hubo síntomas similares a los de la gripe después de la administración de las inyecciones.

65

Procedimientos clínicos y de laboratorio

Muestras biológicas

- 5 **[0206]** Se recogieron muestras de sangre y otros tejidos durante las visitas de los pacientes al centro de pruebas. Las muestras se midieron para varios biomarcadores mediante procedimientos de laboratorio estándar.

Volumen de ventas de glucosa

- 10 **[0207]** Los pacientes recibieron una infusión continua baja cebada de glucosa [6,6-2H2] para la medición de la producción de glucosa endógena. La infusión continua cebada (5 mg/kg de peso corporal inyectada durante 3 minutos, seguida de una infusión constante de 0,05 mg/kg de peso corporal/min) comenzó aproximadamente a la 1 AM antes de la pinza y continuó durante la pinza. Después de al menos un período de equilibrio de 6 horas durante el cual el enriquecimiento del marcador ha alcanzado el estado estacionario, se tomaron muestras de sangre a intervalos de 10 minutos durante un período de 30 minutos (4 muestras) para calcular la producción de glucosa endógena basal. Inmediatamente después de recolectar la última muestra de referencia, la velocidad de la infusión continua de glucosa [6,6-2H2] se redujo en un 50%, es decir, al comienzo del primer paso de la pinza. Se tomaron muestras de sangre antes del inicio de la infusión de isótopos y durante la infusión de glucosa [6,6-2H2] para determinar los enriquecimientos de glucosa en plasma que se utilizaron para calcular la producción de glucosa endógena basal. [6,6-2H2] se midieron las relaciones de isótopos de glucosa en sangre usando espectrometría de masas de relación de isótopos. La producción de glucosa endógena se calculó a partir de la dilución de glucosa [6,6-2H2] usando el método de estado no estable de Steele (Steele, R., Ann N Y Acad Sci, 1959, 82: 420-430).

Pinza hiperinsulinémica-euglicémica de dos pasos

- 25 **[0208]** Para el procedimiento de pinza de glucosa, los pacientes se conectaron al Biostator (MTB Medizintechnik, Amstetten, Alemania) durante al menos 2 horas antes del inicio del procedimiento. El Biostator calcula automáticamente la velocidad de infusión de glucosa (GIR) adecuada para mantener la glucosa en sangre al nivel diana. Los pacientes permanecieron en ayunas y en posición supina o semi supina durante toda la pinza de glucosa. A los pacientes se les permitió beber agua por toda la pinza, pero por lo demás permanecieron en ayunas.

- 35 **[0209]** Para las mediciones continuas de concentración de glucosa en sangre, se canuló una vena periférica en la mano o el antebrazo de un brazo para la inserción de un catéter de doble luz de PTFE de calibre 18, que está conectado al sensor de glucosa del Biostator. Se inyectó una solución de heparina en dosis bajas (10.000 unidades de heparina/100 ml de solución salina) en la punta de este catéter y se recogió con la sangre para evitar que la sangre se coagule en el sistema. Esta mano permaneció debajo de una almohadilla térmica durante todo el ensayo. El calentamiento de la mano resultó en una arterialización de la sangre venosa muestreada por un catéter retrógrado, debido a una apertura reflectante de las derivaciones arteriovenosas. Se tomaron muestras de sangre para análisis de insulina en suero de un segundo catéter de calibre 18 en la vena cubital del mismo brazo, manteniéndose la línea patente con solución salina 0,15 mM.

[0210] Otra vena en el antebrazo contralateral se canuló con un catéter de PTFE de calibre 18 para infusión de glucosa al 20% (D20W), [6,6-2H2] glucosa e insulina mediante bombas de infusión.

- 45 **[0211]** Se aplicaron dos velocidades de infusión de insulina en serie (Paso 1 y Paso 2) y cada fase de infusión de insulina duró aproximadamente 180 minutos. Los últimos 30 minutos de cada fase de infusión de insulina se consideraron en estado estacionario.

- 50 **[0212]** Paso 1: Supresión de la producción de glucosa hepática. Durante los pasos 1 y 2 de la abrazadera, D20W se enriqueció con 2,5-3% [6,6-2H2] glucosa. La insulina (Humulin R U100, Eli Lilly & Co., Indianápolis, IN, EE.UU.) se infundió IV por medio de una bomba de precisión durante 180 minutos a una velocidad de 30 mU/m²/min. Esto elevó la concentración de insulina en plasma a un nivel adecuado para examinar la supresión submáxima de la producción de glucosa hepática. Examinar la producción de glucosa hepática en el Paso 1 puede ilustrar el efecto de un medicamento sobre la sensibilidad a la insulina hepática.

- 55 **[0213]** Paso 2: Estimulación de la eliminación de glucosa. Después de 180 minutos (final del Paso 1), la infusión de insulina se incrementó a 150 mU/m²/min durante otros 180 minutos (Paso 2) de la pinza. Esto proporcionó concentraciones de insulina suprafisiológicas (aproximadamente 400 uU/ml) que casi eliminaron la eliminación de glucosa al máximo (principalmente en el músculo esquelético) y la producción de glucosa endógena casi suprimida al máximo. Al estimular la eliminación de glucosa en los tejidos y órganos periféricos, los marcadores fisiológicos medidos durante el Paso 2 pueden ilustrar el efecto de un medicamento sobre la sensibilidad periférica a la insulina.

- 65 **[0214]** La velocidad de infusión de glucosa (GIR; 20% v/v) requerida para mantener la glucosa en sangre venosa arterializada (método de glucosa oxidasa) en el nivel diana de 110 mg/dL se registró en toda la pinza. El período de estado estable para las mediciones de sensibilidad a la insulina se define como el tiempo de 150-180 minutos después del inicio de la infusión continua de insulina durante cada paso, y el GIR registrado durante los últimos 30 minutos

(estado estable) de cada paso de infusión de insulina fue utilizado para la determinación de la sensibilidad a la insulina.

[0215] Se extrajeron muestras de sangre para la determinación de glucosa en plasma en puntos de tiempo programados antes y durante la fijación. El Biostator se recalibró a intervalos regulares (aproximadamente cada 30 minutos y aproximadamente cada 10 minutos durante el estado estacionario) mediante un método de referencia (YSI 2300 Stat). La sangre para la medición de YSI se extrajo al mismo tiempo que el muestreo de Biostator, si es posible. Se tomaron muestras dentro de los ± 5 minutos del tiempo planificado.

[0216] El procedimiento de fijación finalizó 6 horas después del inicio del Paso 1. La infusión de insulina se interrumpió después de que se recogió la última muestra de sangre. Después de completar el procedimiento de sujeción, los pacientes fueron alimentados con un almuerzo estándar. La glucosa en sangre continuó siendo monitoreada a discreción del investigador. Se realizaron pruebas de laboratorio adicionales a discreción del investigador por razones de seguridad (por ejemplo, electrolitos, ECG, telemetría). Los signos vitales (incluida la temperatura auditiva) se monitorizaron tanto antes como después de la pinza.

Análisis intermedio del perfil lipídico

[0217] Los resultados del día 91 (considerado el punto final primario) se presentan en la Tabla 2. La línea de base se define como el promedio de todas las evaluaciones antes de la primera dosis. Los resultados de los cambios en el perfil de lípidos a lo largo del tiempo se presentan en tablas posteriores (los valores para los días 127 y 176 reflejan datos parciales disponibles durante el análisis intermedio). Los resultados indican que los niveles de proteína ApoC-III, los niveles de triglicéridos totales en ayunas y los niveles de colesterol no HDL se redujeron significativamente y los niveles de colesterol HDL aumentaron significativamente después del tratamiento con ISIS 304801. Hubo una reducción constante de los niveles de triglicéridos a menos de 100 mg/dL, con un promedio de 70 mg/dL. Hubo disminuciones rápidas, robustas y duraderas, dependientes del tratamiento, en el colesterol VLDL en ayunas y en el colesterol no HDL. Hubo un aumento rápido, robusto y duradero dependiente del tratamiento en el colesterol HDL en ayunas. En general, el tratamiento con ISIS 304801 resultó en una mejora en el perfil lipídico general de los pacientes.

Tabla 2

Análisis del perfil lipídico (% de cambio desde el inicio) en el día 91		
	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 7)
Ayuno ApoC-III	-7	-88
ApoB en ayunas	-10	-27
HDL-colesterol en ayunas	-7	40
LDL-colesterol en ayunas	-7	-9
Ayuno sin colesterol HDL	-8	-28
Colesterol total en ayunas	-7	-14
Triglicéridos en ayunas	-10	-72
VLDL-ApoC-III en ayunas	-8	-92
VLDL-C en ayunas	-13	-77

Tabla 3

Niveles de proteína ApoC-III en ayunas (% de cambio con respecto al valor basal) con el tiempo		
Día	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 7)
8	-20	-63
15	4	-74
29	-1	-86
57	-11	-86
91	-7	-88
127	-3	-80
176	26	-53

Tabla 4

Niveles de proteína ApoB en ayunas (% de cambio desde el inicio) con el tiempo		
Día	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 7)
8	-6	-20
15	3	-17
29	-2	-22
57	-4	-20
91	-10	-27
127	-9	-29
176	12	-14

Tabla 5

Niveles de colesterol HDL en ayunas (% de cambio con respecto al valor basal) con el tiempo		
Día	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 7)
8	3	19
15	6	32
29	1	45
57	-3	48
91	-7	40
127	12	45
176	0	33

Tabla 6

Niveles de colesterol LDL en ayunas (% de cambio con respecto al valor basal) con el tiempo		
Día	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 7)
8	5	-10
15	8	-7
29	-1	-7
57	2	-2
91	-7	-9
127	-9	-19
176	15	0

Tabla 7

Niveles de colesterol en ayunas sin HDL (% de cambio con respecto al valor basal) con el tiempo		
Día	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 7)
8	-3	-24
15	3	-21
29	-3	-27
57	-4	-23
91	-8	-28
127	-10	-33
176	13	-13

Tabla 8

Niveles de colesterol total en ayunas (% de cambio con respecto al valor inicial) con el tiempo			
	Día	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 7)
	8	-2	-15
	15	4	-10
	29	-2	-13
	57	-4	-8
	91	-7	-14
	127	-6	-19
	176	10	-6

Tabla 9

Niveles de triglicéridos en ayunas (% de cambio desde el inicio) con el tiempo			
	Día	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 7)
	8	-29	-55
	15	-12	-54
	29	-9	-72
	57	-24	-71
	91	-10	-72
	127	-14	-66
	176	5	-47

Tabla 10

Niveles de VLDL-ApoC-III en ayunas (% de cambio con respecto al valor inicial) con el tiempo			
	Día	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 7)
	8	-19	-60
	15	-5	-73
	29	5	-87
	57	-11	-84
	91	-8	-92
	127	-1	-85
	176	28	-51

Tabla 11

Niveles de VLDL en ayunas (% de cambio desde la línea de base) a lo largo del tiempo			
	Día	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 7)
	8	-31	-61
	15	-15	-53
	29	-9	-68
	57	-25	-80
	91	-13	-77
	127	-27	-71
	176	10	-60

Análisis intermedio del perfil de diabetes

[0218] La línea de base se define como la primera pinza antes de la primera dosis. Los valores para los días 127 y

176 reflejan datos parciales disponibles durante el análisis intermedio. Los diversos parámetros, el índice de sensibilidad a la insulina, la tasa de eliminación de glucosa durante el estado estacionario, la tasa de depuración metabólica de glucosa durante el estado estacionario, la relación del metabolismo de la glucosa a la insulina y la supresión de la producción de glucosa hepática se midieron el día 92. Los resultados de los cambios en el perfil de diabetes en el tiempo se presentan en la Tabla 12.

[0219] La glucosa en plasma, la insulina en suero, el péptido C en suero y las AUC de NEFA (área bajo la curva) durante MMTT se midieron en el día 91 y se presentan en la Tabla 13. La línea base se define como la primera prueba de tolerancia de comida mixta (MMTT) antes de la primera dosis.

[0220] Los niveles de glucosa en ayunas, albúmina glicosilada, fructosamina, hemoglobina glicosilada a lo largo del tiempo se midieron y se presentan en las Tablas 14 y 15. La línea de base, para parámetros distintos de glucosa, se define como el último valor antes de la primera dosis. La línea de base para la glucosa se define como el último valor en o antes del día -2.

[0221] Los resultados demuestran que el tratamiento ISIS 304801 redujo ácido graso libre, la albúmina glicada, fructosamina, y los niveles de HbA1c. El tratamiento también dio como resultado mejores medidas en el perfil diabético al mejorar el índice de sensibilidad a la insulina y las medidas de sensibilidad periférica a la insulina, como la tasa de eliminación de glucosa, la tasa de metabolismo de la glucosa y la relación del metabolismo de la glucosa a la insulina, y una medida de la sensibilidad a la insulina hepática (supresión de producción de glucosa hepática). Los datos indican que el tratamiento con ISIS 304801 mejoró la sensibilidad a la insulina y mejoró los síntomas de diabetes en los pacientes.

Tabla 12

Perfil de diabetes (% de cambio desde el inicio) en el día 92		
	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 4)
Índice de sensibilidad a la insulina	1,2	32,7
Tasa de eliminación de glucosa durante el estado estacionario, paso 1	5,9	25,0
Tasa de eliminación de glucosa durante el estado estacionario, paso 2	-0,3	22,6
Tasa de depuración metabólica de glucosa (MCR) durante el estado estacionario, paso 1	8,7	25,6
Tasa de depuración metabólica de glucosa (MCR) durante el estado estacionario, paso 2	-1,1	20,6
Metabolismo de la glucosa: proporción de insulina durante el estado estacionario, paso 1	2,2	18,8
Metabolismo de la glucosa: proporción de insulina durante el estado estacionario, paso 2	1,9	30,2
Supresión de la producción de glucosa hepática, paso 1	6,2	15,8
Supresión de la producción de glucosa hepática, paso 2	3,1	-5,7

Tabla 13

Perfil de AUC de varios parámetros del suero (% de cambio desde el inicio) en el día 91		
	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 7)
Péptido C en suero	-16,3	17,1
Ácidos grasos libres	9,5	-9,3
Insulina sérica	-25,6	23,4
Glucosa plasmática	0,6	-1,0

Tabla 14

Niveles de parámetros sanguíneos en ayunas (% de cambio desde el inicio)			
	Días	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 7)
Albúmina glicosilada	91	4,7	-9,5
	127	15,7	-22,2
	176	15,8	-10,6
Fructosamina	91	5,9	-13,6
	127	30,9	n.d.
	176	23,2	-0,6
Hemoglobina a1c	91	6,5	-3,3
	127	10,9	n.d.
	176	12,4	-8,4

Tabla 15

Niveles de glucosa en ayunas (% de cambio desde el inicio)		
Días	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 7)
8	-9,9	-9,2
15	-1,9	-10,2
29	-9,7	-1,5
57	-8,2	-9,9
90	9,8	-1,1
127	-0,8	-6,6
176	11,5	-13,1

[0222] Basado en estos resultados altamente favorables observados en pacientes con diabetes tipo 2, ISIS 304801 puede representar una nueva oportunidad terapéutica para el tratamiento de la resistencia a la insulina y la hipertrigliceridemia.

Ejemplo 2: Datos actualizados del ensayo clínico de fase II ISIS 304801

[0223] El ejemplo 1 revela datos de un análisis intermedio del ensayo clínico de fase II. El ejemplo 2 revela datos del mismo ensayo clínico divulgado en el Ejemplo 1 actualizado con datos de pacientes adicionales.

Tabla 1A

Características basales de los pacientes en el estudio de fase 2		
	Placebo (n = 5)	300 mg (n = 10)
Género (M:F)	2:3	2:8
Edad (años)	55	57,2
IMC (kg/m ²)	32,5	33,4
Glucosa en ayunas (mg/dL)	180,2	180,9
HbA1c (%)	7,6	8,0
Lípidos y lipoproteínas en ayunas, mg/dL		
ApoC-III (mg/dL)	11,5	13,7
Triglicéridos (mg/dL)	215,2	266,3
HDL-C (ppt; mg/dL)	38	40,9
No HDL-C (calc; mg/dL)	175,2	172,5
ApoB (mg/dL)	119,2	113,9
LDL-C (ultacente; mg/dL)	134,3	121,3
Colesterol total (mg/dL)	213,2	213,4
VLDL-ApoC-III (mg/dL)	6,0	7,2
VLDL-C (mg/dL)	40,9	51,2

Análisis del perfil lipídico

[0224] Los resultados del día 91 (considerado el punto final primario) se presentan en la Tabla 2A. La línea de base se define como el promedio de todas las evaluaciones antes de la primera dosis. Los resultados de los cambios en el perfil lipídico a lo largo del tiempo se presentan en tablas posteriores. Los resultados indican que los niveles de proteína ApoC-III, los niveles de triglicéridos totales en ayunas y los niveles de colesterol no HDL se redujeron significativamente y los niveles de colesterol HDL aumentaron significativamente después del tratamiento con ISIS 304801. Hubo una reducción constante de los niveles de triglicéridos a menos de 100 mg/dL, con un promedio de 70 mg/dL. Hubo disminuciones rápidas, robustas y duraderas dependientes del tratamiento en el colesterol VLDL en ayunas y el colesterol no HDL. Hubo un aumento rápido, robusto y duradero dependiente del tratamiento en el colesterol HDL en ayunas. En general, el tratamiento con ISIS 304801 resultó en una mejora en el perfil lipídico general de los pacientes.

Tabla 2A

Análisis del perfil lipídico (% de cambio desde el inicio) en el día 91		
	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 9)
Ayuno ApoC-III	-7	-88
ApoB en ayunas	-10	-21
HDL-colesterol en ayunas	-7	42
LDL-colesterol en ayunas	-7	-0,2
Ayuno sin colesterol HDL	-8	-22
Colesterol total en ayunas	-7	-9
Triglicéridos en ayunas	-10	-69
VLDL-ApoC-III en ayunas	-8	-90
VLDL-C en ayunas	-13	-73

Tabla 3A

Niveles de proteína ApoC-III en ayunas (% de cambio con respecto al valor basal con el tiempo)		
Día	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 9)
8	-20	-61
15	4	-75
29	-1	-86
57	-11	-87
91	-7	-88
127	-0,3	-80
176	14	-56

Tabla 4A

Niveles de proteína ApoB en ayunas (% de cambio desde el inicio) con el tiempo		
Día	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 9)
8	-6	-15
15	3	-14
29	-2	-20
57	-4	-18
91	-10	-21
127	-9	-21
176	11	-13

Tabla 5A

Niveles de colesterol HDL en ayunas (% de cambio con respecto al valor basal) con el tiempo		
Día	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 9)
8	3	21
15	6	35
29	1	47
57	-3	48
91	-7	42
127	10	56
176	1	45

Tabla 6A

Niveles de colesterol LDL en ayunas (% de cambio con respecto al valor basal) con el tiempo		
Día	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 9)
8	5	-5
15	8	-2
29	-1	-4
57	2	4 4
91	-7	-0,2
127	-10	-10
176	15	-1

Tabla 7A

Niveles de colesterol en ayunas sin HDL (% de cambio con respecto al valor basal) con el tiempo		
Día	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 9)
8	-3	-20
15	3	-18
29	-3	-25
57	-4	-19
91	-8	-22
127	-9	-28
176	11	-16

Tabla 8A

Niveles de colesterol total en ayunas (% de cambio con respecto al valor inicial) con el tiempo		
Día	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 9)
8	-2	-12
15	4	-8
29	-2	-11
57	-4	-6
91	-7	-9
127	-6	-12
176	9	-5

Tabla 9A

Niveles de triglicéridos en ayunas (% de cambio desde el inicio) con el tiempo		
Día	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 9)
8	-29	-52
15	-12	-55
29	-9	-71
57	-24	-70
91	-10	-69
127	-10	-66
176	1	-51

Tabla 10A

Niveles de VLDL-ApoC-III en ayunas (% de cambio con respecto al valor inicial) con el tiempo		
Día	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 9)
8	-19	-63
15	-5	-74
29	5,5	-88
57	-11	-85
91	-8	-90
127	-3	-86
176	12	-63

Tabla 11A

Niveles de VLDL en ayunas (% de cambio desde la línea de base) a lo largo del tiempo		
Día	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 9)
8	-31	-56
15	-15	-56
29	-9	-66
57	-25	-75
91	-13	-73
127	-14	-71
176	4	-53

Análisis del perfil de diabetes

[0225] Los resultados demuestran que el tratamiento con ISIS 304801 disminuyó los niveles de ácido graso libre, albúmina glicosilada, fructosamina y HbA1C. El tratamiento también dio como resultado mejores medidas en el perfil diabético al mejorar el índice de sensibilidad a la insulina y las medidas de sensibilidad periférica a la insulina, como la tasa de eliminación de glucosa, la tasa de metabolismo de la glucosa y la relación del metabolismo de la glucosa a la insulina, y una medida de la sensibilidad a la insulina hepática (supresión de producción de glucosa hepática). Los datos indican que el tratamiento con ISIS 304801 mejoró la sensibilidad a la insulina y mejoró los síntomas de diabetes en los pacientes.

Tabla 12A

Perfil de diabetes (% de cambio desde el inicio) en el día 92		
	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 6)
Índice de sensibilidad a la insulina	1,2	52,6
Tasa de eliminación de glucosa durante el estado estacionario, paso 1	5,8	6,3
Tasa de eliminación de glucosa durante el estado estacionario, paso 2	-0,3	12,7

(Continuación)

Perfil de diabetes (% de cambio desde el inicio) en el día 92		
	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 6)
Tasa de depuración metabólica de glucosa (MCR) durante el estado estacionario, paso 1	8,6	7,0
Tasa de depuración metabólica de glucosa (MCR) durante el estado estacionario, paso 2	-1,0	12,0
Metabolismo de la glucosa: proporción de insulina durante el estado estacionario, paso 1	2,2	1,4
Metabolismo de la glucosa: proporción de insulina durante el estado estacionario, paso 2	1,9	24,0
Supresión de la producción de glucosa hepática, paso 1	6,3	6,2
Supresión de la producción de glucosa hepática, paso 2	3,1	-2,5

Tabla 13A

Perfil de AUC de varios parámetros del suero (% de cambio desde el inicio) en el día 91		
	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 9)
Péptido C en suero	-16,3	16,6
Ácidos grasos libres	9,5	-7,0
Insulina sérica	-25,6	16,7
Glucosa plasmática	0,6	-3,5

Tabla 14A

Niveles de parámetros sanguíneos en ayunas (% de cambio desde el inicio)			
	Días	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 9)
Albúmina glicosilada	91	4,7	-10,4
	127	6,3	-14,0
	176	11,4	-13,6
Fructosamina	91	5,9	-13,8
	127	22,0	-1,8
	176	19,5	-4,0
Hemoglobina a1c	91	6,5	-3,1
	127	9,0	-3,5
	176	10,0	-5,5

Tabla 15A

Niveles de glucosa en ayunas (% de cambio desde el inicio)		
Días	Placebo (n = 4)	300 mg (n = 9)
8	-9,9	-13,1
15	-1,9	-13,2
29	-9,7	-8,0
57	-8,2	-14,3
90	9,8	-7,2
127	-9,0	-15,1
176	-0,7	-21,3

[0226] Basado en estos resultados altamente favorables observados en pacientes con diabetes tipo 2, ISIS 304801 representa una nueva oportunidad terapéutica para el tratamiento de la hipertrigliceridemia en pacientes diabéticos o pre-diabéticos.

LISTA DE SECUENCIAS

[0227]

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc.

5 <120> COMPUESTOS Y MÉTODOS PARA MODULAR LA EXPRESIÓN DE APOLIPOPROTEINA C-III PARA MEJORAR UN PERFIL DIABÉTICO

<130> BIOL0225WO

10 <140> 61/838,211
<141> 2013-06-21

<160> 4

15 <170> PatentIn versión 3,5

<210> 1

<211> 533

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

25	tgctcagttc atccctagag gcagctgctc caggaacaga ggtgccatgc agccccgggt	60
	actccttggt gttgccctcc tggcgctcct ggcctctgcc cgagcttcag aggccgagga	120
	tgcctccctt ctcagcttca tgcagggtta catgaagcac gccaccaaga cgcceaagga	180
30	tgcactgagc agcgtgcagg agtcccaggt ggcccagcag gccaggggct gggtgaccga	240
	tggcttcagt tccctgaaag actactggag caccgttaag gacaagttct ctgagttctg	300
	ggatttgac cctgaggtca gaccaacttc agccgtggct gcctgagacc tcaatacccc	360
35	aagtccacct gcctatccat cctgcgagct ccttgggtcc tgcaatctcc agggctgccc	420
	ctgtaggttg cttaaaaggg acagtattct cagtgtcttc ctaccccacc tcatgcctgg	480
40	ccccctcca ggcattgctgg cctccaata aagctggaca agaagctgct atg	533

<210> 2

<211> 3964

<212> ADN

45 <213> Homo sapiens

<400> 2

50	ctactccagg ctgtgttcag ggcttggggc tgggtggaggg aggggcctga aattccagtg	60
	tgaaaggctg agatgggccc gaggcccctg gcctatgtcc aagccatttc ccctctcacc	120
	agcctctccc tggggagcca gtcagctagg aaggaatgag ggctccccag gccaccccc	180
55	agttcctgag ctcatctggg ctgcagggtt ggccgggacag cagcgtggac tcagtctcct	240
	agggatttcc caactctccc gcccgttgc tgcattctga caccctgcct caggccctca	300
	tctccactgg tcagcaggtg acctttgccc agcgccttgg gtcctcagtg cctgctgccc	360
60	tggagatgat ataaaacagg tcagaaccct cctgcctgtc tgctcagttc atccctagag	420
	gcagctgctc caggtaatgc cctctgggga ggggaaagag gaggggagga ggatgaagag	480

65

ES 2 778 462 T3

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

gggcaagagg agctccctgc ccagcccagc cagcaagcct ggagaagcac ttgctagagc 540
 taaggaagcc tgggagctgg acgggtgccc cccaccctc atcataacct gaagaacatg 600
 gaggccccggg aggggtgtca cttgcccaaa gctacacagg ggggtgggct ggaagtggct 660
 ccaagtgcag gttccccctt cattcttcag gcttagggct ggaggaagcc ttagacagcc 720
 cagtcctacc ccagacaggg aaactgaggc ctggagaggg ccagaaatca cccaaagaca 780
 cacagcatgt tggctggact ggacggagat cagtccagac cgcaggtgcc ttgatgttca 840
 gtctggggg ttttctgctc catcccacc acctcccttt gggcctcgat ccctcgcccc 900
 tcaccagtcc cccttctgag agcccgtatt agcagggagc cggcccctac tccttctggc 960
 agaccagct aaggttctac cttaggggcc acgccacctc cccagggagg ggtccagagg 1020
 catggggacc tggggtgccc ctcacaggac acttccttgc aggaacagag gtgccatgca 1080
 gccccgggta ctcttgttg ttgccctcct ggcgctcctg gcctctgcc gtaagcactt 1140
 ggtgggactg ggctgggggc aggggtgagg caacttgggg atcccagtcc caatgggtgg 1200
 tcaagcagga gccagggct cgtccagagg ccgatccacc cactcagcc ctgctctttc 1260
 ctcaggagct tcagaggccg aggatgcctc ccttctcagc ttcagtcagg gttacatgaa 1320
 gcacgccacc aagaccgcca aggatgact gagcagcgtg caggagtccc aggtggccca 1380
 gcaggccagg tacaccgct ggcctccctc cccatcccc ctgccagctg cctccattcc 1440
 caccgcctc tgccctggtg agatcccaac aatggaatgg aggtgctcca gcctcccctg 1500
 ggcctgtgcc tcttcagcct cctctttcct cacagggcct ttgtcaggct gctgcgggag 1560
 agatgacaga gttgagactg cattcctccc aggtccctcc tttctcccc gagcagtcct 1620
 agggcgtgcc gtttagccc tcatttccat tttccttcc tttcccttc tttctcttc 1680
 tatttcttcc tttcttctt tcttcttcc tttcttctt tcttcttcc tttcttctt 1740
 tcttcttcc ctttcttct ttccttctt tcttcttcc ctttcttct ttccttctt 1800
 tcttcttct tcttcttcc ctttcttct ctttcttct cttccttct ctcttctt 1860
 cttcttctt ttttttaat ggagtctccc tctgtcacct aggctggagt gcagtgtgc 1920
 catctcggt cactgcaacc tccgtctccc gggttcaacc cattctcctg cctcagcctc 1980
 ccaagtagct gggattacag gcacgcgcca ccacaccag ctaatttttg tatttttagc 2040
 agagatgggg tttcacatg ttggccaggt tggcttgaa ttcctgacct caggggatcc 2100
 tcctgcctcg gcctccaaa gtgctgggat tacaggcatg agccactgcg cctggcccca 2160
 ttttctttt ctgaaggtct ggctagagca gtggctcctca gccttttttg caccagggac 2220
 cagttttgtg gtggacaatt tttccatggg ccagcgggga tggttttggg atgaagctgt 2280
 tccacctcag atcatcaggc attagattct cataaggagc cctccaccta gatccctggc 2340
 atgtgcagtt cacaataggg ttcacactcc tatgagaatg taaggccact tgatctgaca 2400

ES 2 778 462 T3

ggaggcggag ctcaggcggt attgctcact caccaccac tcacttcgtg ctgtgcagcc 2460
 5 cggctcctaa cagtccatgg accagtacct atctatgact tgggggttgg ggaccctgg 2520
 gctaggggtt tgccttggga ggccccacct gaccaattc aagcccgtga gtgcttctgc 2580
 tttgttctaa gacctggggc cagtgtgagc agaagtgtgt ccttcctctc ccatcctgcc 2640
 10 cctgcccac cagtactctcc tctcccctac tcccttctcc acctcacct gactggcatt 2700
 agctggcata gcagaggtgt tcataaacat tcttagtccc cagaaccggc tttggggtag 2760
 15 gtgttatttt ctactttgc agatgagaaa attgaggctc agagcgatta ggtgacctgc 2820
 cccagatcac acaactaatc aatcctcaa tgactttcca aatgagaggc tgctccctc 2880
 tgtcctaccc tgctcagagc caccagggtg tgcaactcca ggcggtgctg tttgcacaga 2940
 20 aaacaatgac agccttgacc tttcacatct ccccaccctg tcactttgtg cctcaggccc 3000
 aggggcataa acatctgagg tgacctggag atggcagggt ttgacttgtg ctggggttcc 3060
 tgcaaggata tctcttctcc cagggtggca gctgtggggg attcctgcct gaggtctcag 3120
 25 ggctgtcgtc cagtgaagtt gagaggggtg tgtggtcctg actggtgtcg tccagtgggg 3180
 acatgggtgt gggcccacatg gttgcctaca gaggagtctc catgccctgc tctgttgctt 3240
 30 cccctgactg atttaggggc tgggtgaccg atggcttcag tccctgaaa gactactgga 3300
 gcaccgtaa ggacaagttc tctgagttct gggatttggc cctgaggtc agaccaactt 3360
 cagccgtggc tgcctgagac ctcaataccc caagtccacc tgcctatcca tctgcgagc 3420
 35 tcttgggtc ctgcaatctc cagggtgcc cctgtaggtt gcttaaaag gacagtattc 3480
 tcagtgtctc cctacccac ctcatgcctg gccccctcc aggcatgtg gcctcccaat 3540
 40 aaagctggac aagaagctgc tatgagtggg ccgtcgcaag tgtgccatct gtgtctgggc 3600
 atgggaaagg gccgaggctg ttctgtgggt gggcactgga cagactccag gtcaggcagg 3660
 catggaggcc agcgtctat ccacctctg gtagctgggc agtctctggg cctcagtttc 3720
 45 ttcatctcta aggtaggaat caccctcctg accctgcctt ccttgacagc tttgtgcgga 3780
 aggtcaaaca ggacaataag tttgctgata ctttgataaa ctgtaggtg ctgcacaaca 3840
 50 tgacttgagt gtgtgccccca tgccagccac tatgctggc acttaagttg tcatcagagt 3900
 tgagactgtg tgtgtttact caaaactgtg gagctgacct cccctatcca ggccccctag 3960
 ccct 3964

55 <210> 3
 <211> 3958
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

60 <400> 3
 ctactccagg ctgtgttcag ggcttggggc tgggtggaggg agggcctga aattccagtg 60

65

ES 2 778 462 T3

5 tgaaggctg agatgggcc gagggccctg gcctatgtcc aagccatttc ccctctcacc 120
 agcctctccc tggggagcca gtcagctagg aaggaatgag ggctccccag gcccaccccc 180
 agttcctgag ctcatctggg ctgcagggct ggcgggacag cagcgtggac tcagtctcct 240
 agggatttcc caactctccc gcccgcttgc tgcctctgga caccctgcct caggccctca 300
 10 tctccactgg tcagcagggtg acctttgccc agcgccctgg gtcctcagtg cctgctgccc 360
 tggagatgat ataaaacagg tcagaaccct cctgcctgtc tgctcagttc atccctagag 420
 gcagctgctc caggtaatgc cctctgggga ggggaaagag gaggggagga ggatgaagag 480
 15 gggcaagagg agctccctgc ccagcccagc cagcaagcct ggagaagcac ttgctagagc 540
 taaggaagcc tcggagctgg acgggtgccc cccaccctc atcataacct gaagaacatg 600
 gagggccggg aggggtgtca cttgccaaa gctacatag gggtggggct ggaagtggct 660
 20 ccaagtgcag gttccccct cattctcag gcttagggct ggaggaagcc ttagacagcc 720
 cagtctacc ccagacaggg aaactgaggc ctggagaggg ccagaaatca ccaaagaca 780
 25 cacagcatgt tggctggact ggacggagat cagtccagac cgcaggtgcc ttgatgttca 840
 gtctggggg ttttctgctc catcccacc acctccctt gggcctcgat ccctcgcccc 900
 30 tcaccagtcc cccttctgag agcccgtatt agcagggagc cggcccctac tccttctggc 960
 agaccagct aaggttctac cttaggggcc acgccacct cccagggagg ggtccagagg 1020
 catggggacc tggggtgccc ctcacaggac acttccttgc aggaacagag gtgccatgca 1080
 35 gccccgggta ctcttgttg ttgccctcct ggcgctcctg gcctctgccc gtaagcactt 1140
 ggtgggactg ggctgggggc aggggtggagg caacttgggg atcccagctc caatgggtgg 1200
 40 tcaagcagga gccagggct cgtccatagg ccgatccacc ccaactcagcc ctgctctttc 1260
 ctcaggagct tcagaggccg aggatgcctc ctttctcagc ttcatgcagg gctacatgaa 1320
 gcacgccacc aagaccgcca aggatgcaact gagcagcgtg caggagtccc aggtggccca 1380
 45 gcagggcagg tacaccgct ggcctccctc cccatcccc ctgccagctg cctccattcc 1440
 caccaccccc tgcctgggtg agatcccaac aatggaatgg aggtgctcca gcctcccctg 1500
 50 ggcctgtgcc tcttcagcct cctctttcct cacagggcct ttgtcaggct gctgcgggag 1560
 agatgacaga gttgagactg cattcctccc aggtccctcc tttctccca gagcagctct 1620
 agggcgcgcc gtttagccc tcatttccat tttcctttc tttcccttc tttcccttc 1680
 55 tatttctttc tttctttctt tctttctttc tttctttctt tctttctttc tttctttctt 1740
 tctttctttc ctttctttct tctttctttt ctttctttct tctctttctt tctctttctt 1800
 tctttctttc tttccttttt ctttctttcc ctctcttctt ttctctcttt ctttctttctt 1860
 60 cttttttttt taatggagt cccctctgtc acccaggctg gagtgcagtg gtgccatctc 1920

65

ES 2 778 462 T3

ggctcactgc aacctccgtc tcccgggttc aaccattct cctgcctcag cctcccaagt 1980
 agctgggatt acaggcacgc gccaccacac ccagctaatt tttgtatfff tagcagagat 2040
 5 ggggtttcac catgttggcc aggttggctc tgaattcctg acctcagggg atcctcctgc 2100
 ctcggcctcc caaagcgctg ggattacagg catgagccac tgcgcctggc cccattttcc 2160
 10 ttttctgaag gtctggctag agcagtggtc ctcagccttt ttggcaccag ggaccagttt 2220
 tgtggtggac aatffffcca tgggccagcg gggatggttt tgggatgaag ctgttccacc 2280
 tcagatcatc aggcattaga ttctcataag gagccctcca cctagatccc tggcatgtgc 2340
 15 agttcacaac aggttcaca ctctatgag aatgtaaggc cacttgatct gacaggaggc 2400
 ggagctcagg cgtattgct cactcaccca ccaactcactt cgtgctgtgc agcccgctc 2460
 ctaacagtcc atggaccagt acctatctat gacttggggg ttggggacc ctagggctagg 2520
 20 ggtttgctt gggaggcccc acctgacctt attcaagccc gtgagtgtt ctgctttgtt 2580
 ctaagacctg gggccagtgt gacgagaagt gtgtccttcc tctccatcc tgccctgcc 2640
 25 catcagtact ctctctccc ctactccctt ctccacctca cctgactgg cattagctgg 2700
 catagcagag gtgttcataa acattcttag tccccagaac cggctttggg gtaggtgta 2760
 ttttctcact ttgcagatga gaaaattgag gctcagagcg attaggtgac ctgccccaga 2820
 30 tcacacaact aatcaatcct ccaatgactt tccaaatgag aggtgcctc cctctgtcct 2880
 acctgctca gaccaccag gttgtgcaac tccaggcggg gctgtttgca cagaaaacaa 2940
 tgacagcctt gacctttcac atctcccac cctgtcactt tgtgcctcag gccaggggc 3000
 35 ataaacatct gaggtgacct ggagatggca gggtttgact tgtgctgggg ttcttgcaag 3060
 gatctctctt ctcccagggt ggcagctgtg ggggattcct gcctgaggtc tcagggtgt 3120
 40 cgtccagtga agttgagagg gtggtgtggt cctgactggg gtcgtccagt ggggacatgg 3180
 gtgtgggtcc catggttgcc tacagaggag ttctcatgcc ctgctctgtt gcttcccctg 3240
 actgatttag gggctgggtg accgatggct tcagttccct gaaagactac tggagcaccg 3300
 45 ttaaggacaa gttctctgag ttctgggatt tggaccctga ggtcagacca acttcagccg 3360
 tggctgcctg agacctcaat accccaagtc cacctgccta tccatcctgc cagctccttg 3420
 50 ggtcctgcaa tctccagggc tgcccctgta ggttgcttaa aagggacagt attctcagtg 3480
 ctctcctacc ccacctcatg cctggccccc ctccaggcat gctggcctcc caataaagct 3540
 ggacaagaag ctgctatgag tgggccgtcg caagtgtgcc atctgtgtct gggcatggga 3600
 55 aagggccgag gctgttctgt ggggtggcac tggacagact ccaggtcagg caggcatgga 3660
 ggcagcgct ctatccacct tctggtagct gggcagtctc tgggcctcag tttcttcatc 3720
 tctaaggtag gaatcacct ccgtacctg ccttcoctga cagctttgtg cggaaggta 3780
 60 aacaggacaa taagtttgct gatactttga taaactgtta ggtgctgcac aacatgactt 3840
 gagtgtgtgc cccatgccag ccaactatgcc tggcacttaa gttgtcatca gagttgagac 3900
 65 tgtgtgtgtt tactcaaac tgtggagctg acctccccta tccaggccac ctagccct 3958

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

5

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

10

<400> 4
agcttctgt ccagcttat 20

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un compuesto que comprende un oligonucleótido antisentido 12-30 nucleobases de longitud que se dirige a ApoCIII para usar en un método de tratamiento:
- 10 (a) un sujeto diabético o un sujeto con riesgo de diabetes, en donde el tratamiento comprende mejorar el perfil de diabetes del sujeto en donde se mejora el índice de sensibilidad a la insulina, la tasa de eliminación de glucosa, la MCR de glucosa, la relación del metabolismo de la glucosa:insulina; en donde los ácidos grasos libres, triglicéridos, no HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contiene VLDL, ApoB y LDL-C se reducen y HDL-C aumenta, o
- (b) un sujeto diabético al mejorar la sensibilidad a la insulina.
- 2.** El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde el sujeto:
- 15 (a) está en una dosis estable de metformina;
- (b) tiene niveles de triglicéridos en ayunas de ≥ 200 y ≤ 500 mg/dl; y/o
- (c) tiene un nivel de HbA1c inferior al 7%, entre el 7-9% o superior al 9%.
- 3.** El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la sensibilidad a la insulina es la sensibilidad periférica a la insulina.
- 4.** El compuesto para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde:
- 25 (a) ApoCIII tiene una secuencia de ácido nucleico como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2;
- (b) el oligonucleótido antisentido consiste en un oligonucleótido modificado monocatenario; y/o
- (c) el oligonucleótido antisentido consta de 20 nucleósidos unidos.
- 5.** El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 4 (a), en donde:
- 30 (a) el oligonucleótido antisentido:
- (i) tiene una secuencia de nucleobase que comprende al menos 8 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 4; o
- 35 (ii) consiste en una secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 4; y/o
- (b) la secuencia de nucleobase del oligonucleótido antisentido es al menos 80%, al menos 90% o 100% complementaria a una secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 6.** El compuesto para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el oligonucleótido antisentido tiene al menos un enlace internucleosídico modificado, opcionalmente en donde el enlace internucleosídico modificado es un enlace internucleosídico fosforotioato, al menos un resto de azúcar modificado, opcionalmente en donde el azúcar modificado es un azúcar bicíclico o 2'-O-metoxietilo, o al menos una nucleobase modificada, opcionalmente en donde la nucleobase modificada es una 5-metilcitosina.
- 40 **7.** El compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el oligonucleótido antisentido comprende:
- (a) un segmento de separación que consiste en desoxinucleósidos unidos;
- 50 (b) un segmento de ala 5' que consiste en nucleósidos unidos;
- (c) un segmento de ala 3' que consiste en nucleósidos unidos;
- en donde el segmento de separación se coloca inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala de 3' y en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado, en donde opcionalmente el oligonucleótido antisentido comprende:
- 55 (a) un segmento de separación que consiste en 10 desoxinucleósidos unidos;
- (b) un segmento de ala 5' que consiste en 5 nucleósidos unidos;
- (c) un segmento de ala 3' que consiste en 5 nucleósidos unidos;
- 60 en donde el segmento de separación se coloca inmediatamente adyacente y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, en donde cada citosina es una 5-metilcitosina, y en donde cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato.
- 8.** Un oligonucleótido antisentido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4 para usar en un método de tratamiento de:
- 65 (a) un sujeto diabético o un sujeto con riesgo de diabetes, en donde el tratamiento comprende mejorar el perfil

de diabetes del sujeto en donde el índice de sensibilidad a la insulina, tasa de eliminación de glucosa, glucosa MCR, se mejora la proporción de metabolismo de glucosa:insulina; en donde los ácidos grasos libres, triglicéridos, no HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contienen VLDL, ApoB y LDL-C se reducen y aumenta HDL-C;

5 (b) un sujeto diabético mejorando la sensibilidad a la insulina

en donde el oligonucleótido antisentido comprende:

- 10 (a) un segmento de separación que consiste en 10 desoxinucleósidos unidos;
 (b) un segmento de ala 5' que consiste en 5 nucleósidos unidos;
 (c) un segmento de ala 3' que consiste en 5 nucleósidos unidos;

15 en donde el segmento de separación se coloca inmediatamente adyacente a y entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, en donde cada citosina es una 5-metilcitosina, en donde cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato.

9. El oligonucleótido antisentido para usar según la reivindicación 8, en donde el sujeto:

- 20 (a) está en una dosis estable de metformina;
 (b) tiene niveles de triglicéridos en ayunas de ≥ 200 y ≤ 500 mg/dl; y/o
 (c) tiene un nivel de HbA1c inferior al 7%, entre el 7-9% o superior al 9%.

25 10. El oligonucleótido antisentido para usar de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde la sensibilidad a la insulina es la sensibilidad periférica a la insulina.

11. El compuesto u oligonucleótido antisentido para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el oligonucleótido antisentido se administra por vía parenteral, en donde opcionalmente la administración parenteral es administración subcutánea.

30 12. El compuesto u oligonucleótido antisentido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende además la administración conjunta de un segundo agente, en donde opcionalmente

- 35 (a) el segundo agente se selecciona de un agente reductor de ApoCIII, agente reductor de colesterol, agente no reductor de lípidos HDL, agente reductor de LDL, agente reductor de TG, agente reductor de colesterol, agente elevador de HDL, aceite de pescado, niacina, fibrato, estatina, DCCR (sal de diazóxido), agente reductor de glucosa o agentes antidiabéticos;
 (b) el segundo agente es metformina; y/o
 (c) el segundo agente se administra de forma concomitante o secuencial con el oligonucleótido antisentido.

40 13. El compuesto u oligonucleótido antisentido para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el oligonucleótido antisentido es una forma de sal.

45 14. El compuesto u oligonucleótido antisentido para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido antisentido conjugado, opcionalmente en donde el oligonucleótido antisentido conjugado se conjuga con un grupo conjugado de carbohidrato.

50 15. Una composición que comprende el compuesto u oligonucleótido antisentido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, para usar en un método de tratamiento de:

- 55 (a) un sujeto diabético o un sujeto con riesgo de diabetes, en donde el tratamiento comprende mejorar el perfil de diabetes del sujeto en donde se mejora el índice de sensibilidad a la insulina, la tasa de eliminación de glucosa, la MCR de glucosa, la relación del metabolismo de la glucosa:insulina; en donde los ácidos grasos libres, triglicéridos, no HDL-C, VLDL-C, ApoCIII que contienen VLDL, ApoB y LDL-C se reducen y aumenta HDL-C; o
 (b) un sujeto diabético mejorando la sensibilidad a la insulina.

60

65