

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 556**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61P 3/08 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 7/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2012 E 18166477 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3401401**

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

30 Prioridad:

20.09.2011 US 201161537007 P

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

27.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 796 556 T3

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

DESCRIPCIÓN

Modulación antisentido de la expresión de GCGR

5 **Campo**

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

10 **Antecedentes**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los documentos EP1752536 y WO2005/116204 describen un polinucleótido que provoca interferencia de ARN y un método para regular la expresión génica con el uso del mismo.

El documento US 2004/023384 describe la modulación antisentido de la expresión del receptor 12 acoplado a la proteína G.

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

Sumario

La invención proporciona un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado monocatenario que consiste de 16 a 30 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprenden una parte que consiste de por lo menos 16 nucleobases contiguas complementarias a una parte de igual longitud de los nucleótidos 7267-7457 de la SEQ ID NO: 2:

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

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

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

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

Descripción detallada

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

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

Definiciones

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15 Adiposidad" u "Obesidad" se refiere al estado de estar obeso o a una cantidad excesivamente alta de grasa corporal o tejido adiposo en relación con la masa corporal magra. La cantidad de grasa corporal incluye la preocupación por la distribución de grasa en todo el cuerpo y el tamaño y la masa de los depósitos de tejido adiposo. La distribución de la grasa corporal se puede estimar mediante medidas de los pliegues cutáneos, las relaciones de la circunferencia cintura-cadera o técnicas tales como obtención de imágenes por ultrasonidos, tomografía computarizada o resonancia magnética. De acuerdo con el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, las personas con un índice de masa corporal (IMC) de 30 o más se consideran obesos. El término "Obesidad", tal como se usa en el presente documento, incluye afecciones en las que existe un aumento en la grasa corporal más allá de los requisitos físicos como resultado de la acumulación excesiva de tejido adiposo en el cuerpo. El término "obesidad" incluye, aunque sin limitaciones, las siguientes afecciones: obesidad de inicio en el adulto; obesidad alimentaria; obesidad endógena o inflamatoria; obesidad endocrina; obesidad familiar; obesidad hiperinsular; obesidad hiperplásica-hipertrófica; obesidad hipogonadal; obesidad hipotiroidea; 20 obesidad de por vida; obesidad mórbida y obesidad exógena.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Un azúcar bicíclico es un azúcar modificado.

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

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

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

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

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

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

30 "Complementariedad" significa la capacidad de apareamiento entre nucleobases de un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico.

"Nucleobases contiguas" significa nucleobases inmediatamente adyacentes entre sí.

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

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

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

50 "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.

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

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

65 "Dosis" significa una cantidad especificada de un agente farmacéutico proporcionada en una sola administración, o en un período de tiempo específico. En ciertas realizaciones, una dosis se puede administrar en uno, dos o más bolos, comprimidos o inyecciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones en las que se desea la

- 5 administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen no acomodado fácilmente por una única inyección, por lo tanto, se pueden usar dos o más inyecciones para alcanzar la dosis deseada. En ciertas realizaciones, el agente farmacéutico se administra por infusión durante un período prolongado de tiempo o continuamente. Las dosis se pueden indicar como la cantidad de agente farmacéutico por hora, día, semana o mes.
- 10 "Cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" significan la cantidad de agente farmacéutico activo suficiente para efectuar un resultado fisiológico deseado en un individuo que necesita el agente. La cantidad efectiva puede variar entre individuos dependiendo de la salud y la condición física del individuo a tratar, el grupo taxonómico de los individuos a tratar, la formulación de la composición, la evaluación de la afección médica del individuo y otros factores relevantes.
- 15 "Completamente complementario" o "10 0% complementario" significa que cada nucleobase de una secuencia de nucleobases de un primer ácido nucleico tiene una nucleobase complementaria en una segunda secuencia de nucleobases de un segundo ácido nucleico. En ciertas realizaciones, un primer ácido nucleico es un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana es un segundo ácido nucleico.
- 20 "Gapmer" significa un compuesto antisentido quimérico en el que una región interna que tiene una pluralidad de nucleósidos que soportan la escisión de ARNasa H está situada entre regiones externas que tienen uno o más nucleósidos, en el que los nucleósidos que comprenden la región interna son químicamente distintos del nucleósido o nucleósidos que comprenden las regiones externas. La región interna se puede denominar "segmento separador" y las regiones externas se pueden denominar "segmentos del ala".
- 25 "Ampliado en separador" significa un compuesto antisentido quimérico que tiene un segmento separador de 12 o más 2'-desoxiribonucleósidos contiguos colocados entre e inmediatamente adyacentes a segmentos de ala 5' y 3' que tienen de uno a seis nucleósidos.
- 30 "Receptor del glucagón" o "GCGR" significa cualquier ácido nucleico o proteína del GCGR.
- "Expresión del GCGR" significa el nivel de ARNm transcrito del gen que codifica el GCGR o el nivel de proteína traducida del ARNm. La expresión del GCGR puede determinarse por métodos conocidos en la técnica, tales como una transferencia Northern o Western.
- 35 "Ácido nucleico del GCGR" significa cualquier ácido nucleico que codifica el GCGR. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ácido nucleico de GCGR incluye, una secuencia de ADN que codifica el GCGR, una secuencia de ARN transcrita a partir de ADN que codifica el GCGR (incluyendo ADN genómico que comprende intrones y exones) y una secuencia de ARNm que codifica GCGR. "ARNm de GCDR" significa un ARNm que codifica una proteína de GCGR.
- 40 "Glucosa" es un monosacárido utilizado por las células como fuente de energía e intermediario inflamatorio. "Glucosa plasmática" se refiere a la glucosa presente en el plasma.
- 45 "Hibridación" significa la reunión de moléculas de ácido nucleico complementarias. En ciertas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico complementarias incluyen un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana.
- 50 "Hiperlipidemia" o "hiperlipemia" es una afección caracterizada por niveles elevados de lípidos séricos o lípidos circulantes (en plasma). Esta afección se manifiesta por una concentración anormalmente alta de grasas. Las fracciones de lípidos en la sangre circulante son colesterol, lipoproteínas de baja densidad, lipoproteínas de muy baja densidad y triglicéridos.
- "Hipertrigliceridemia" significa una afección caracterizada por niveles elevados de triglicéridos.
- 55 "Identificar" o "seleccionar un animal con una afección metabólica" significa identificar o seleccionar a un sujeto al que se ha diagnosticado una enfermedad metabólica o un trastorno metabólico; o, identificar o seleccionar un sujeto que tenga cualquier síntoma de una enfermedad metabólica, incluyendo, pero sin limitaciones, síndrome metabólico, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hipertensión, resistencia aumentada a la insulina, sensibilidad a la insulina disminuida, peso corporal y/o grasa corporal por encima de lo normal o cualquier combinación de los mismos. Dicha identificación puede lograrse mediante cualquier método, incluyendo, pero sin limitaciones, pruebas o evaluaciones clínicas estándar, tales como la medición de la glucosa en sangre (en plasma) o en suero, la medición de triglicéridos en suero o circulantes (plasma), la medición de la presión arterial, la medición de la grasa corporal, la medición del peso corporal y similares.
- 60 "Inmediatamente adyacente" significa que no hay elementos intermedios entre los elementos inmediatamente adyacentes.
- 65

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

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

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

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

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

"Administración intravenosa" significa administración en una vena.

"Nucleósidos enlazados" significa nucleósidos adyacentes que están unidos entre sí.

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

30 "Factores principales de riesgo" se refiere a factores que contribuyen a un alto riesgo de una enfermedad o afección concreta. En ciertas realizaciones, los factores principales de riesgo de cardiopatía coronaria incluyen, entre otros, tabaquismo, hipertensión, niveles bajos de HDL-C, antecedentes familiares de cardiopatía coronaria, la edad y otros factores divulgados en el presente documento.

35 "Enfermedad metabólica" o "trastorno metabólico" se refiere a una afección caracterizada por una alteración o interrupción de la función metabólica. "Metabólica/o" y "metabolismo" son términos bien conocidos en la técnica y generalmente incluyen toda la gama de procesos bioquímicos que se producen dentro de un organismo vivo. Enfermedades o trastornos metabólicos incluyen, entre otros, obesidad, diabetes, hiperglucemia, prediabetes, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), síndrome metabólico, resistencia a la insulina, dislipidemia diabética o hipertrigliceridemia o una combinación de los mismos.

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

50 "Apareamiento erróneo" o "nucleobase no complementaria" se refiere al caso en el que una nucleobase de un primer ácido nucleico no es capaz de aparearse con la nucleobase correspondiente de un segundo ácido nucleico diana.

55 "Dislipidemia mixta" significa una afección caracterizada por niveles elevados de colesterol y niveles elevados de triglicéridos.

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

"Nucleobase modificada" se refiere a cualquier nucleobase que no sea adenina, citosina, guanina, timidina o uracilo. Una "nucleobase no modificada" significa las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U).

65 Un "nucleósido modificado" significa un nucleósido que tiene, independientemente, un resto de azúcar

modificado o una nucleobase modificada.

"Nucleótido modificado" significa un nucleótido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado, un enlace internucleosídico modificado o una nucleobase modificada. Un "nucleósido modificado" significa un nucleótido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado o una 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.

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

"Enlace internucleosídico que se produce de forma natural" significa un enlace fosfodiéster de 3'a 5'.

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

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

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

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

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

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

"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 tal como por ejemplo miméticos de nucleósidos que tienen morfolino, ciclohexenilo, ciclohexilo, tetrahidropirano, biciclo o triciclo miméticos del azúcar, por ejemplo unidades de azúcar sin furanosa.

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

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

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

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

"Administración parenteral" significa la administración a través de inyección o infusión. La administración parenteral incluye administración subcutánea, administración intravenosa, administración intramuscular,

administración intraarterial, administración intraperitoneal o administración intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intracerebroventricular. La administración puede ser continua, crónica, corta o intermitente.

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

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

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

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

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

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

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

35 "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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

35 *Ciertas realizaciones*

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

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

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

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

55 En ciertas realizaciones, el compuesto o composición proporcionado en la presente es o comprende ISIS NO:449884 o 459157.

En ciertas realizaciones, el compuesto o composición es o comprende ISIS NO:449884.

60 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 16 a 21 nucleósidos que tienen una secuencia de nucleobases complementaria a una parte de igual longitud de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3.

65 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente consisten de 16 a 21 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de cualquiera de las SEQ ID NO: 4-115.

5 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 16 a 21 nucleósidos enlazados y que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 17, 31, 80 u 85.

10 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 16 a 21 nucleósidos enlazados y que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 11.

15 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 17 a 35 nucleósidos que tienen una secuencia de nucleobases complementaria a una parte de igual longitud de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3.

20 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 17 a 35 nucleósidos enlazados y que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de las SEQ ID NO: 4-115.

25 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 20 a 35 nucleósidos enlazados y que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de las SEQ ID NO: 11, 17, 31, 80 o 85.

30 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente pueden consistir de 17 a 35 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 11. En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 17 a 30 a nucleósidos que tienen una secuencia de nucleobases complementaria a una parte de igual longitud de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3.

35 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 17 a 30 nucleósidos enlazados y que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de las SEQ ID NO: 4-115.

40 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 17 a 30 nucleósidos enlazados y que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de las SEQ ID NO: 11, 17, 31, 80 u 85.

45 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 17 a 30 nucleósidos enlazados y que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 11.

50 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 17 a 25 nucleósidos que tienen una secuencia de nucleobases complementaria a una parte de igual longitud de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3.

55 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 17 a 25 nucleósidos enlazados y que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de las SEQ ID NO: 4-115.

60 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 17 a 25 nucleósidos enlazados y que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de las SEQ ID NO: 11, 17, 31, 80, u 85.

65 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 17 a 25 nucleósidos enlazados y que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 11.

4-115.

5 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 17 a 21 nucleósidos enlazados y que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de las SEQ ID NO: 11, 17, 31, 80, u 85.

10 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 17 a 21 nucleósidos enlazados y que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 11.

15 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 20 nucleósidos que tienen una secuencia de nucleobases complementaria a una parte de igual longitud de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3.

20 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 20 nucleósidos enlazados y que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de las SEQ ID NO: 4-115.

25 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 20 nucleósidos enlazados y que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de las SEQ ID NO: 11, 17, 31, 80, u 85.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 20 nucleósidos enlazados y que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 11.

30 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 17 nucleósidos que tienen una secuencia de nucleobases complementaria a una parte de igual longitud de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3.

35 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 17 nucleósidos enlazados y que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de las SEQ ID NO: 4-115.

40 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 17 nucleósidos enlazados y que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de las SEQ ID NO: 11, 17, 31, 80, u 85.

45 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 17 nucleósidos enlazados y que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 11.

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

50 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones proporcionados en la presente comprenden además un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

55 En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido modificado es por lo menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% complementaria a cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3 como se mide sobre la totalidad del oligonucleótido modificado.

60 En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido modificado tiene por lo menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 4-115 como se mide sobre la totalidad del oligonucleótido modificado.

En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido modificado tiene por lo menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 17, 31, 80, u 85 como se mide sobre la totalidad del oligonucleótido modificado.

65 En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido modificado tiene por lo menos un 70%,

ES 2 796 556 T3

75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID NO: 11 como se mide sobre la totalidad del oligonucleótido modificado.

5 En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido modificado tiene por lo menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID NO: 80 como se mide sobre la totalidad del oligonucleótido modificado.

10 Los compuestos antisentido u oligonucleótidos modificados de la invención se dirigen a una región de un ácido nucleico de GCGR. En ciertas realizaciones, tales compuesto u oligonucleótidos se dirigen a las siguientes regiones de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2: 7267-7280, 7267-7283, 7267-7284, 7267-7285, 7267-7286, 7267-7287, 7267-7457, 7268-7284, 7268-7285, 7268-7286, 7268-7287, 7269-7285, 7269-7286, 7269-7287, 7270-7285, 7270-7286, 7270-7287, 7271-7287, 7291-7312, 7292-7308, 7292-7309, 7292-7310, 7292-7311, 7292-7312, 7293-7309, 7293-7310, 7293-7311, 7293-7312, 7294-7310, 7294-7311, 7294-7312, 7295-7310, 7295-7311, 7295-7312, 7296-7312, 7316-7332, 7316-7333, 7316-7334, 7316-7335, 7316-7336, 7317-7333, 7317-7334, 7317-7335, 7317-7336, 7318-7334, 7318-7335, 7318-7336, 7319-7334, 7319-7335, 7319-7336, 7320-7336, 7339-7405, 7339-7406, 7339-7407, 7339-7408, 7339-7409, 7341-7354, 7341-7357, 7341-7358, 7341-7359, 7341-7360, 7341-7361, 7342-7358, 7342-7359, 7342-7360, 7342-7361, 7343-7359, 7343-7360, 7343-7361, 7344-7360, 7344-7361, 7345-7361, 7347-7456, 7365-7381, 7365-7382, 7365-7383, 7365-7384, 7365-7385, 7366-7382, 7366-7383, 7366-7384, 7366-7385, 7367-7383, 7367-7384, 7367-7385, 7368-7383, 7368-7384, 7368-7385, 7369-7385, 7388-7382, 7389-7407, 7389-7408, 7389-7409, 7390-7406, 7390-7407, 7390-7408, 7390-7409, 7391-7407, 7391-7408, 7391-7409, 7392-7407, 7392-7408, 7392-7409, 7393-7409, 7413-7433, 7414-7430, 7414-7431, 7414-7432, 7414-7433, 7415-7431, 7415-7432, 7415-7433, 7416-7432, 7416-7433, 7417-7433, 7437-7453, 7437-7454, 7437-7455, 7437-7456, 7437-7457, 7438-7454, 7438-7455, 7438-7456, 7438-7457, 7439-7455, 7439-7456, 7439-7457, 7440-7455, 7440-7456, 7440-7457, o 7441-7457. En ciertas realizaciones, tales compuestos u oligonucleótido se dirigen a las siguientes regiones de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2: 7267-7287, 7270-7286, 7292-7312, 7295-7311, 7316-7336, 7319-7335, 7341-7361, 7344-7360, 7365-7385, 7368-7384, 7389-7409, 7392-7408, 7416-7432, 7437-7457, o 7440-7456

25 En ciertas realizaciones, tales compuestos u oligonucleótido se dirigen a las siguientes regiones de la SEQ ID NO: 2: 7270-7286, 7295-7311, 7319-7335, 7344-7360, 7368-7384, 7392-7408, 7416-7432, o 7440-7456.

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

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

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

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

50 En la presente se divulgan compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 17 nucleósidos enlazados en donde los nucleósidos enlazados comprenden por lo menos una parte de 8 nucleobases contiguas que es complementaria a una parte de nucleobases de igual longitud dentro de una región seleccionada de los nucleótidos 7270-7286, 7295-7311, 7319-7335, 7344-7360, 7368-7384, 7392-7408, 7416-7432, 7440-7456 o 10716-10734 de la SEQ ID NO: 2.

55 En ciertas realizaciones de la divulgación, el oligonucleótido antisentido tiene una parte de por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 11, por lo menos 12, por lo menos 13, por lo menos 14, por lo menos 15, o por lo menos 16 nucleobases contiguas que es complementaria a una parte de igual longitud dentro de la región seleccionada de los nucleótidos 7270-7286, 7295-7311, 7319-7335, 7344-7360, 7368-7384, 7392-7408, 7416-7432, 7440-7456 o 10716-10734 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones el oligonucleótido modificado es un 90%, 95%, 99%, o 100% complementaria a un ácido nucleico que codifica GCGR humano, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2.

60 En la presente se divulgan compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de por lo

7344-7360, 7368-7384, 7392-7408, 7416-7432, y 7440-7456 de la SEQ ID NO: 2.

5 En ciertas realizaciones de la divulgación, tales compuestos u oligonucleótidos dirigidos a una región de ácido nucleico de GCGR tienen una parte de nucleobases contiguas que es complementaria a una parte de nucleobases de igual longitud de la región 7270-7286, 7295-7311, 7319-7335, 7344-7360, 7368-7384, 7392-7408, 7416-7432, 7440-7456 o 10718-10734 de la SEQ ID NO: 2.

10 En ciertas realizaciones de la divulgación, las siguientes regiones de oligonucleótidos de la SEQ ID NO: 2, cuando están dirigidas por compuestos u oligonucleótidos antisentido, muestran por lo menos un 65% de inhibición: 7267-7287, 7270-7286, 7292-7312, 7295-7311, 7316-7336, 7319-7335, 7341-7361, 7344-7360, 7365-7385, 7368-7384, 7389-7409, 7392-7408, 7416-7432, 7437-7457, 7440-7456, 7783-7799, 8133-8152, 8144-8160, 9804-9823, 10718-10734, o 15743-15762.

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

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

25 En ciertas realizaciones de la divulgación, los compuestos proporcionados en la presente tienen un potencial terapéutico mayor que los ISIS NO: 315163, 325568 y 310457 (divulgados en la Patente de Estados Unidos N° 7.399.853 y la Solicitud de Patente de Estados Unidos Publicada N° US2007-0087987). En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados en la presente tienen mejor inhibición *in vivo* con respecto a los ISIS NO: 315163, 325568 y 310457. En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados en la presente tienen mejor perfil de tolerabilidad que los ISIS NO: 315163, 325568 y 310457.

30 En ciertas realizaciones, el compuesto proporcionado en la presente consiste de un oligonucleótido modificado monocatenario.

35 El oligonucleótido modificado de la invención consiste de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleósidos enlazados. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste de 21 nucleósidos enlazados. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste de 20 nucleósidos enlazados. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste de 19 nucleósidos enlazados. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste de 18 nucleósidos enlazados. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste de 17 nucleósidos enlazados. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste de 16 nucleósidos enlazados.

40 En ciertas realizaciones, por lo menos un enlace internucleosídico del oligonucleótido modificado es un enlace internucleosídico modificado. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico de fosforotioato.

45 En ciertas realizaciones, por lo menos un nucleósido de dicho oligonucleótido modificado comprende una nucleobase modificada. En ciertas realizaciones, la nucleobase modificada es una 5-metilcitosina.

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

55 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste de 20 nucleósidos enlazados, el segmento separador consiste de diez desoxinucleósidos enlazados, el segmento de ala 5' consiste de cinco nucleósidos enlazados, el segmento de ala 3' consiste de cinco nucleósidos enlazados, cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada citosina es una 5-metilcitosina.

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

65 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste de 21 nucleósidos enlazados, el segmento separador

consiste de diez desoxinucleósidos enlazados, el segmento de ala 5' consiste de cinco nucleósidos enlazados, el segmento de ala 3' consiste de seis nucleósidos enlazados, cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada citosina es una 5-metilcitosina.

5 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones proporcionados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 17 nucleósidos enlazados que tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 16 nucleobases contiguas de SEQ ID NO: 11, en donde el oligonucleótido modificado comprende: a) un segmento separador que consiste de diez desoxinucleósidos enlazados; b) un segmento de ala en
10 5' que consiste de cuatro nucleósidos enlazados; y c) un segmento de ala en 3' que consiste de cuatro nucleósidos enlazados. El segmento separador está situado entre el segmento del ala 5' y el segmento del ala 3', en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina.

15 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones proporcionados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 21 nucleósidos enlazados que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 20 nucleobases contiguas de las SEQ ID NO: 85 y 96, en donde el oligonucleótido modificado comprende: a) un segmento separador que consiste de diez desoxinucleósidos enlazados; b) un segmento de ala en 5' que consiste de cinco nucleósidos enlazados; y c) un segmento de ala en 3' que consiste de
20 seis nucleósidos enlazados. El segmento separador está situado entre el segmento del ala 5' y el segmento del ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina.

25 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones proporcionados en la presente comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 21 nucleósidos enlazados que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 85, en donde el oligonucleótido modificado comprende: a) un segmento separador que consiste de diez desoxinucleósidos enlazados; b) un segmento de ala en 5' que consiste de cinco nucleósidos enlazados; y c) un segmento de ala en 3' que consiste de seis nucleósidos enlazados. El segmento separador está situado entre el segmento del ala 5' y el segmento del ala 3', en donde cada
30 nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina.

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

35 Ciertas realizaciones de la divulgación son métodos para reducir la expresión de GCGR en un animal que comprenden administrar al animal un compuesto como se describe en la presente. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 18 a 21 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a GCGR. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 17 a 25 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a GCGR. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 17 a 24 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a GCGR. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 17 a 23 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a GCGR. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 17 a 22 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a GCGR. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 17 a 21 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a GCGR. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 17 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a GCGR. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 20 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a GCGR. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 21 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a GCGR.

50 Ciertas realizaciones de la divulgación son métodos para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad metabólica en un animal que comprenden administrar al animal un compuesto como se describe en la presente. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 17 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a GCGR. Ejemplos de enfermedades o trastornos metabólicos incluyen, pero no están limitados a, diabetes, hiperglicemia, prediabetes, obesidad, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), síndrome metabólico, resistencia a la insulina, dislipidemia diabética o hipertrigliceridemia o una combinación de los mismos.
55

Ciertas realizaciones de la divulgación son métodos para prevenir, mejorar o tratar la obesidad en un animal que comprenden administrar al animal un compuesto como se describe en la presente. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 17 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a GCGR. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 20 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a GCGR. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 21 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a GCGR. En ciertas realizaciones, el compuesto o composición comprende el compuesto de ISIS NO: 449884, 459014, 398471, 448766, o 459157. En ciertas realizaciones, el compuesto o composición comprende el compuesto de ISIS NO: 449884.
60

65

5 Ciertas realizaciones de la divulgación son métodos para prevenir, mejorar o tratar la diabetes en un animal que comprende administrar al animal un compuesto como se describe en la presente. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 17 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a GCGR. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 20 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a GCGR. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 21 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a GCGR. En ciertas realizaciones, el compuesto o composición comprende el compuesto de ISIS NO: 449884, 459014, 398471, 448766, o 459157. En ciertas realizaciones, el compuesto o composición comprende el compuesto de ISIS NO: 449884.

10 Ciertas realizaciones de la divulgación son métodos para reducir el peso corporal en un animal que comprende administrar al animal un compuesto como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 12 a 30 nucleósidos enlazados de longitud dirigido al GCGR. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 17 nucleósidos enlazados de longitud dirigido al GCGR. En ciertas realizaciones, la reducción del peso corporal en un animal

15 previene, mejora o trata una enfermedad metabólica. En ciertas realizaciones, la reducción del peso corporal en un animal previene, mejora o trata la diabetes. En ciertas realizaciones, la reducción del peso corporal en un animal previene, mejora o trata la obesidad. En ciertas realizaciones, la reducción del peso corporal en un animal previene, mejora o trata el síndrome metabólico. En ciertas realizaciones, la reducción del peso corporal en un animal previene, mejora o trata la resistencia a la insulina. En ciertas realizaciones, la reducción del peso corporal en un

20 animal previene, mejora o trata la hiperglucemia. En ciertas realizaciones, la reducción del peso corporal en un animal previene, mejora o trata la NAFLD. En ciertas realizaciones, la reducción del peso corporal en un animal previene, mejora o trata la NAFLD. En ciertas realizaciones, los niveles de glucosa se reducen en al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %.

25 Ciertas realizaciones de la divulgación son métodos para reducir los niveles de glucosa en un animal que comprende administrar al animal un compuesto como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 17 nucleósidos enlazados de longitud dirigido al GCGR. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, mejora o trata una enfermedad

30 metabólica. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, mejora o trata la diabetes. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, mejora o trata la obesidad. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, mejora o trata el síndrome metabólico. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, mejora o trata la resistencia a la insulina. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal

35 previene, mejora o trata la hiperglucemia. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, mejora o trata la hiperglucemia. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, mejora o trata la NAFLD. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, mejora o trata la dislipidemia diabética. En ciertas realizaciones, el nivel de glucosa se reduce en al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %.

40 En ciertas realizaciones, el GCGR tiene la secuencia humana, tal como se expone en cualquiera de los Números de acceso de GENBANK: Número de acceso de GENBANK NM_000160.3 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 1) o Número de acceso de GENBANK: NW_926918.1 truncado de los nucleótidos 16865000 a 16885000 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 2). En ciertas realizaciones, el GCGR tiene la secuencia del mono

45 rhesus como se expone en la SEQ ID NO: 3. En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones proporcionados en la presente comprenden una sal de los mismos, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones de la divulgación, la composición comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 17 a 35 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos

50 17 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobases enumerada en las SEQ ID NO: 11, 17, 31, 80, u 85 o una sal del mismo y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones de la divulgación, la composición comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 20 a 25 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 20 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobases enumerada en las SEQ ID NO: 11, 17, 31, 80, u 85 o una sal del mismo y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones de la divulgación, la composición comprende un

55 oligonucleótido modificado que consiste de 20 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 20 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobases enumerada en las SEQ ID NO: 11, 17, 31, 80, u 85 o una sal del mismo y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

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

65

- 5 Ciertas realizaciones de la divulgación son métodos para tratar un animal con una enfermedad o afección relacionada con el GCGR, que comprenden: a) identificar dicho animal con una enfermedad o afección relacionada con el GCGR, y b) administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 12 a 30 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases al menos un 90% complementaria de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1–3 como medido sobre la totalidad de dicho oligonucleótido modificado. En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto administrado al animal trata o reduce la enfermedad o afección relacionada con el GCGR, o un síntoma de la misma, en el animal. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección relacionada con el GCGR es obesidad. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección relacionada con el GCGR es diabetes.
- 10 Ciertas realizaciones de la divulgación son métodos para tratar un animal con una enfermedad o afección relacionada con el GCGR, que comprenden: a) identificar dicho animal con una enfermedad o afección relacionada con el GCGR, y b) administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste de de 17 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases al menos un 100 % complementaria de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1–3 como medido sobre la totalidad de dicho oligonucleótido modificado. En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto administrado al animal trata o reduce la enfermedad o afección relacionada con el GCGR, o un síntoma de la misma, en el animal. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección relacionada con el GCGR es obesidad. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección relacionada con el GCGR es diabetes.
- 15 Ciertas realizaciones de la divulgación son métodos para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad metabólica. En ciertas realizaciones, la enfermedad metabólica es obesidad, diabetes, hiperglucemia, prediabetes, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), síndrome metabólico, resistencia a la insulina, dislipidemia diabética o hipertrigliceridemia o una combinación de los mismos.
- 20 Ciertas realizaciones de la divulgación son métodos que comprenden administrar un compuesto como se describe en la presente a un animal. En ciertas realizaciones, el método comprende administrar a un animal un oligonucleótido modificado que consiste de 17 a 35 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 20 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobases enumerada en las SEQ ID NO: 11, 17, 31, 80, u 85.
- 25 Ciertas realizaciones de la divulgación son métodos que comprenden administrar un compuesto como se describe en la presente a un animal. En ciertas realizaciones, el método comprende administrar a un animal un oligonucleótido modificado que consiste de 17 a 35 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 17 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobases enumerada en las SEQ ID NO: 1, 17, 31, 80, u 85.
- 30 Ciertas realizaciones de la divulgación son métodos que comprenden administrar un compuesto como se describe en la presente a un animal. En ciertas realizaciones, el método comprende administrar a un animal un oligonucleótido modificado que consiste de 17 a 35 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 17 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobases seleccionada de entre las secuencias de nucleobases enumeradas en la SEQ ID NO: 11.
- 35 En ciertas realizaciones, el animal es un ser humano.
- 40 En ciertas realizaciones, la administración previene, trata, mejora o ralentiza la progresión de una enfermedad metabólica como se describe en el presente documento.
- 45 En ciertas realizaciones, la administración previene, trata, mejora o ralentiza la progresión de la obesidad como se describe en el presente documento.
- 50 En ciertas realizaciones, la administración previene, trata, mejora o ralentiza la progresión de la diabetes como se describe en el presente documento.
- 55 En ciertas realizaciones, el compuesto se coadministra con un segundo agente.
- En ciertas realizaciones, el compuesto y el segundo agente se administran de forma concomitante.
- 60 En determinadas realizaciones, la administración es administración parenteral.
- 65 Ciertas realizaciones de la divulgación son métodos para reducir la expresión de ARNm o proteína del GCGR en un animal que comprende administrar al animal un compuesto o composición como se describe en el presente documento para reducir la expresión de ARNm o proteína del GCGR en el animal. En ciertas realizaciones, el animal es un ser humano. En ciertas realizaciones, la reducción de la expresión de ARNm o proteína del GCGR previene, trata, mejora o ralentiza la progresión de la enfermedad metabólica. En ciertas realizaciones, la afección o

enfermedad metabólica es diabetes. En ciertas realizaciones, la afección o enfermedad metabólica es obesidad.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65 Se divulga adicionalmente un método para reducir la velocidad de progresión de un síntoma asociado con diabetes,

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

5 También se divulgan métodos y compuestos para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora de la enfermedad metabólica.

10 También se divulgan métodos y compuestos para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora de la obesidad.

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

15 También se divulgan métodos y compuestos para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora del síndrome metabólico.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65

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

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

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

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

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

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

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

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

Compuestos antisentido

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

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

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

55 En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado acortado o truncado. El oligonucleótido modificado acortado o truncado puede tener un único nucleósido eliminado del extremo 5' (truncamiento 5'), o alternativamente del extremo 3' (truncamiento 3'). Un oligonucleótido acortado o truncado puede tener dos nucleósidos eliminados del extremo 5', o alternativamente puede tener dos subunidades eliminadas del extremo 3'. Alternativamente, los nucleósidos eliminados pueden estar dispersos a lo largo del oligonucleótido modificado, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene un nucleósido eliminado del extremo 5' y un nucleósido eliminado del extremo 3'.

65 Cuando solo hay un único nucleósido adicional en un oligonucleótido alargado, el nucleósido adicional puede estar situado en el extremo 5' o 3' del oligonucleótido. Cuando hay dos o más nucleósidos adicionales, los nucleósidos

añadidos pueden estar adyacentes entre sí, por ejemplo, en un oligonucleótido que tiene dos nucleósidos añadidos en el extremo 5' (adición 5'), o alternativamente en el extremo 3' (adición 3') del oligonucleótido. Alternativamente, el nucleósido añadido puede estar disperso a lo largo del compuesto antisentido, por ejemplo, en un oligonucleótido que tiene un nucleósido añadido en el extremo 5' y una subunidad añadida en el extremo 3'.

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

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

20 Maher y Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358, 1988) analizaron en una serie de oligonucleótidos antisentido de 14 nucleobases en tándem y oligonucleótidos antisentido de 28 y 42 nucleobases compuestos por la secuencia de dos o tres de los oligonucleótidos antisentido en tándem, respectivamente, su capacidad para detener la traducción de DHFR humano en un ensayo de reticulocitos de conejo. Cada uno de los tres oligonucleótidos antisentido de 14 nucleobases pudo inhibir la traducción, aunque a un nivel más modesto que los oligonucleótidos antisentido de 28 o 25 42 nucleobases.

Motivos de compuestos antisentido

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

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

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

55 Cada región distinta puede comprender restos azúcar uniformes, variantes o restos de azúcar alternos. El motivo de ala-separador-ala se describe con frecuencia como "X-Y-Z", en el que "X" representa la longitud de la región del ala en 5', "Y" representa la longitud de la región separadora y "Z" representa la longitud de la región del ala en 3'. "X" y "Z" pueden comprender restos de azúcar uniformes, variantes o alternos. En ciertas realizaciones, "X" e "Y" pueden 60 incluir uno o más 2'-desoxinucleósidos. "Y" puede comprender 2'-desoxinucleósidos. Como se usa en el presente documento, un gapmer descrito como "X-Y-Z" tiene una configuración tal que el hueco se coloca inmediatamente adyacente a cada uno del ala en 5' y el ala en 3'. Por lo tanto, no existen nucleótidos intermedios entre el ala en 5' y el hueco, o el hueco y el ala en 3'. Cualquiera de los compuestos antisentido descritos en el presente documento puede tener un motivo de gapmer. En ciertas realizaciones, "X" y "Z" son iguales, en otras realizaciones son 65 diferentes. En ciertas realizaciones, "Y" está entre 8 y 15 nucleótidos. X, Y o Z pueden ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o más nucleósidos.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos al ácido nucleico de GCGR poseen un motivo gapmer 3-10-4.

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

10 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos al ácido nucleico de GCGR poseen un motivo gapmer 5-10-6.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos al ácido nucleico de GCGR poseen un motivo gapmer 3-10-3.

15 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos al ácido nucleico de GCGR poseen un motivo gapmer 4-10-4.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos al ácido nucleico de GCGR poseen un motivo gapmer 4-10-5.

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

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

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

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

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

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

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

65 La determinación de segmentos diana adecuados puede incluir una comparación de la secuencia de un ácido

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

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

Hibridación

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

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

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

Complementariedad

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

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

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

50 Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de 20 nucleobases del compuesto antisentido son complementarias con una región diana, y por lo tanto hibridaría específicamente, representaría un 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, las nucleobases no complementarias restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleobases complementarias y no necesitan ser contiguas entre sí o con nucleobases complementarias. Como tal, un compuesto antisentido que tiene 18 de nucleobases de longitud y que tienen 4
55 (cuatro) nucleobases no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendrían un 77,8% de complementariedad total con el ácido nucleico diana y por tanto entrarían dentro del alcance de la presente invención. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana se puede determinar rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineación local básica) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul y col., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403 410; Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7, 649 656). El porcentaje de homología, identidad de secuencia o complementariedad, puede determinarse mediante, por ejemplo, el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), utilizando la configuración predeterminada, que utiliza el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482 489).

65

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido divulgados en la presente, o partes específicas de los mismos, son completamente complementarios (es decir, 100% complementarios) con un ácido nucleico diana, o una parte específica de los mismos. Por ejemplo, el compuesto antisentido puede ser completamente complementario con un ácido nucleico de GCGR, o una región diana, o un segmento diana o secuencia diana del mismo. Como se usa en la presente “completamente complementario” significa que cada nucleobase de un compuesto antisentido es capaz de un apareamiento de bases preciso con las nucleobases correspondientes de un ácido nucleico diana. Por ejemplo, un compuesto antisentido de 20 nucleobases es completamente complementario con una secuencia diana que tiene 400 nucleobases de longitud, siempre y cuando haya una parte de 20 nucleobases correspondiente del ácido nucleico diana que sea completamente complementaria con el compuesto antisentido. La complementariedad completa también puede usarse en referencia a una parte específica del primer y/o el segundo ácido nucleico. Por ejemplo, una parte de 20 nucleobases de un compuesto antisentido de 20 nucleobases puede ser “completamente complementario” con una secuencia diana que tiene 400 nucleobases de longitud. La parte de 20 nucleobases del oligonucleótido de 30 nucleobases es completamente complementario con la secuencia diana si la secuencia diana tiene una parte de 20 nucleobases correspondiente en donde cada nucleobase es complementaria con la parte de 20 nucleobases del compuesto antisentido. Al mismo tiempo, todo el compuesto antisentido de 30 nucleobases puede ser o no completamente complementario con la secuencia diana, dependiendo de si las 10 nucleobases restantes del compuesto antisentido también son complementarias con la secuencia diana.

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

En ciertas realizaciones de la divulgación, los compuestos antisentido que tienen, o tienen hasta, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases de longitud no comprenden más de 4, más de 3, más de 2, o más de 1 nucleobases no complementarias con respecto al ácido nucleico diana, como un ácido nucleico de GCGR, o una parte específica del mismo.

En ciertas realizaciones de la divulgación, los compuestos antisentido que tienen, o tienen hasta, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleobases de longitud no comprenden más de 6, más de 5, más de 4, más de 3, más de 2, o más de 1 nucleobases no complementarias con respecto al ácido nucleico diana, como un ácido nucleico de GCGR, o una parte específica del mismo.

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

Identidad

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

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

5

Modificaciones

Un nucleósido es una combinación base-azúcar. La parte de nucleobase (también conocida como base) del nucleósido es normalmente un resto de base heterocíclica. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato enlazado covalentemente con la parte de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar de pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar enlazado con el resto hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. Los oligonucleótidos se forman mediante el ligamiento covalente de nucleósidos adyacentes entre sí, para formar un oligonucleótido polimérico lineal. Dentro de la estructura del oligonucleótido, los grupos fosfatos son referidos comúnmente como formadores de los ligamientos internucleosídicos del oligonucleótido.

10

15

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

20

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

25

Enlaces internucleosídicos modificados

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

30

Los oligonucleótidos que tienen enlaces internucleosídicos modificados incluyen enlaces internucleosídicos que retienen un átomo de fósforo así como enlaces internucleosídicos que no tienen un átomo de fósforo. Enlaces internucleosídicos representativos que contienen fósforo incluyen, entre otros, fosforodiesteres, fosfortriésteres, metilfosfonatos, fosforoamidato y fosfortioatos. Los métodos de preparación de enlaces que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos.

35

40

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

45

Restos de azúcar modificados

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

50

55

60

Los ejemplos de nucleósidos que tienen restos de azúcar modificados incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden grupos sustituyentes 5'-vinilo, 5'-metilo (R o S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH³ y 2'-O(CH₂)₂OCH₃ grupos sustituyentes. El sustituyente en la posición 2' también se puede seleccionar de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-

65

alquilo C₁-C₁₀, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), y O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), en las que cada R_m y R_n es, de forma independiente, H o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido.

5 Como se usa en el presente documento, "nucleósidos bicíclicos" se refiere a nucleósidos modificados que comprenden un resto de azúcar bicíclico. Los ejemplos de nucleósidos bicíclicos incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo ribosilo 4' y 2'. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido divulgados en el presente documento incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos en los que el puente comprende un nucleósido bicíclico de 4' a 2'. Los ejemplos de dichos nucleósidos bicíclicos de 4' a 2' incluyen, pero no están limitados a, una de las fórmulas: 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' y 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2', y análogos del mismo (véase la patente de Estados Unidos 7.399,845, presentada el 15 de julio de 2008); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2', y análogos del mismo (véase la solicitud internacional de PCT publicada WO2009/006478, publicada el 8 de enero de 2009); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2', y análogos del mismo (véase la solicitud internacional de PCT publicada WO2008/150729, publicada el 11 de diciembre de 2008); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (véase la patente de Estados Unidos publicada US2004/0171570, publicada el 2 de septiembre de 2004); 4'-CH₂-N(R)-O-2', en la que R es H, alquilo C₁-C₁₂ o un grupo protector (véase la patente de Estados Unidos 7.427,672, presentada el 23 de septiembre de 2008); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (véase, Chattopadhyaya, y col., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); y 4'-CH₂-C(=CH₂)-2', y análogos del mismo (véase la solicitud internacional de PCT publicada WO 2008/154401, publicada el 8 de diciembre de 2008). Véase también, por ejemplo: Singh y col., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin y col., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt y col., Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; documento WO 94/14226; documento WO 2005/021570; Singh y col., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava y col., J. Am. Chem. Soc., 129(26) 8362-8379 (Jul. 4, 2007); Elayadi y col., Curr. Opinion Invens. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch y col., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; Orum y col., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; las patentes de Estados Unidos U.S. 6.670.461, 7.053.207, 6.268.490, 6.770.748, 6.794.499, 7.034.133, 6.525.191, 7.399.845; las solicitudes internacionales de PCT publicadas WO 2004/106356, WO 94/14226, WO 2005/021570, y WO 2007/134181; la publicación de patente de Estados Unidos n.º US2004/0171570, US2007/0287831 y US2008/0039618; y las patentes de Estados Unidos con n.º de serie 12/129.154, 60/989.574, 61/026.995, 61/026.998, 61/056.564, 61/086.231, 61/097.787 y 61/099.844; y las solicitudes internacionales de PCT N.º PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154 y PCT/US2008/068922. Cada uno de los nucleósidos bicíclicos anteriores puede prepararse de modo que tengan una o más configuraciones estereoquímicas del azúcar, incluyendo, por ejemplo, α-L-ribofuranosa y β-D-ribofuranosa (véase la solicitud internacional PCT PCT/DK98/00393, publicada el 25 de marzo de 1999 como el documento WO 99/14226).

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

40 en la que:

x es 0, 1 o 2;

n es 3, 1, 2 o 4;

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

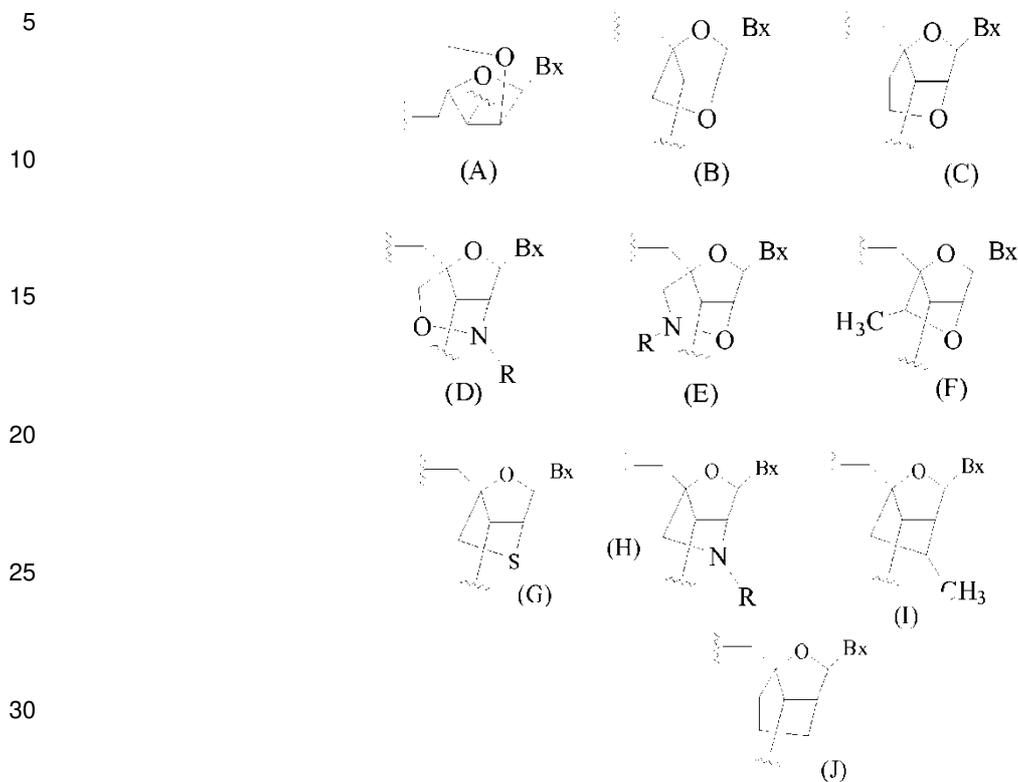
50 y cada J₁ y J₂ es, de forma independiente, H, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, arilo C₅-C₂₀, arilo C₅-C₂₀ sustituido, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido,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

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

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

65 En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos incluyen, pero no se limitan a, (A) α-L-Metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, (B) β-D-Metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, (C) Etilenoxi (4' - (CH₂)₂-O-2') BNA, (D) Aminooxi (4'-CH₂-O-N (R) -2')

BNA, (E) Oxiamino (4'-CH₂-N (R) -O-2') BNA, (F) Metilo (metilenoxi) (4'-CH (CH₃) -O-2') BNA, (G) metilen-tio (4'-CH₂-S-2') BNA, (H) metilen-amino (4'-CH₂-N (R) -2') BNA, (I) metilcarbocíclico (4'-CH₂-CH (CH₃) -2') BNA, y (J) propileno carbocíclico (4' - (CH₂)₃-2') BNA como se representa a continuación.



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

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



en la que:

Bx es un resto base heterocíclica;

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

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

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

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



en la que:

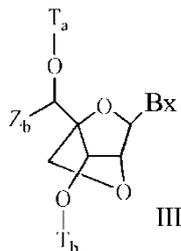
Bx es un resto base heterocíclica;

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

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

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

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



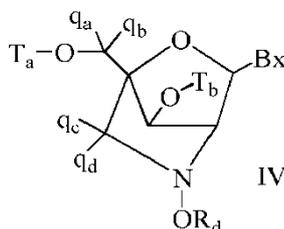
en la que:

25 Bx es un resto base heterocíclica;

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

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

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



en la que:

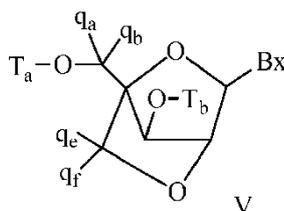
45 Bx es un resto base heterocíclica;

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

R_d es alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆ o alquino C₂-C₆ sustituido;

50 cada q_a, q_b, q_c y q_d es, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆ o alquino C₂-C₆ sustituido, alcoxilo C₁-C₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C₁-C₆ o aminoalquilo C₁-C₆ sustituido;

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



en la que:

Bx es un resto base heterocíclica;

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

q_a, q_b, q_e y q_f son cada uno, independientemente, hidrógeno, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido C₁-C₁₂, OJ_i, SJ_i, SOJ_i, SO₂J_i, NJ_iJ_k, N₃, CN, C(=O)OJ_i, C(=O)NJ_iJ_k, C(=O)J_i, O-C(=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;

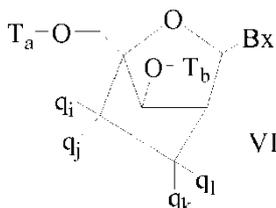
o q_e y q_f juntos son =C(q_g)(q_h);

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

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

También se han preparado análogos de metilenoxi(4'-CH₂-O-2') BNA, metilenoxi(4'-CH₂-O-2') BNA y 2'-tio-BNA (véase Kumar y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222). También se ha descrito la preparación de análogos nucleosídicos bloqueados que comprenden dúplex de oligodesoxirribonucleótidos como sustratos para el ácido nucleico polimerasas (véase, por ejemplo, Wengel y col., documento WO 99/14226). Además, en la técnica se ha descrito la síntesis de 2'-amino-BNA, un nuevo análogo oligonucleotídico de alta afinidad restringido por conformación (véase, por ejemplo, Singh y col., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039). Además, se han preparado 2'-amino y 2'-metilamino-BNA y anteriormente se ha comunicado la estabilidad térmica de otros dúplex con hebras de ARN y ADN complementarias.

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



en la que:

Bx es un resto base heterocíclica;

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

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

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

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

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

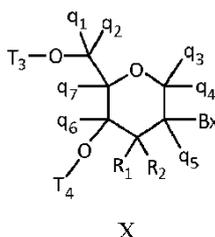
Como se usa en el presente documento, "nucleósidos monocíclicos" se refiere a nucleósidos que comprenden restos de azúcar modificados que no son restos de azúcar bicíclicos. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar, o análogo de resto de azúcar, de un nucleósido se puede modificar o sustituir en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

Como se usa en el presente documento, "azúcar modificado en 2'" significa un azúcar de furanosilo modificado en la posición 2'. En ciertas realizaciones, tales modificaciones incluyen sustituyentes seleccionados entre: un haluro, que incluye, pero no se limita a, alcoxi sustituido y no sustituido, tioalquilo sustituido y no sustituido, aminoalquilo sustituido y no sustituido, alquilo sustituido y no sustituido, alilo sustituido y no sustituido y alquino sustituido y no

sustituido. En ciertas realizaciones, las modificaciones en 2' se seleccionan de sustituyentes que incluyen, pero no se limitan a: $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$, $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$ y $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, en las que n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros grupos sustituyentes en 2' también se pueden seleccionar entre: alquilo C_1-C_{12} ; alquilo sustituido; alqueno; alquino; alcarilo; aralquilo; O-alcarilo u O-aralquilo; SH; SCH_3 ; OCN; Cl; Br; CN; CF_3 ; OCF_3 ; $SOCH_3$; SO_2CH_3 ; ONO_2 ; NO_2 ; N_3 ; NH_2 ; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo reportero; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas; y un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un compuesto antisentido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. En ciertas realizaciones, los nucleósidos modificados comprenden una cadena lateral 2'-MOE (véase, por ejemplo, Baker y col., J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000). Tal sustitución 2'-MOE se ha descrito como que tiene una afinidad de unión mejorada en comparación con los nucleósidos no modificados y con otros nucleósidos modificados, tales como 2'-O-metilo, O-propilo, y O-aminopropilo. También se ha demostrado que los oligonucleótidos que tienen el sustituyente 2'-MOE son inhibidores antisentido de la expresión génica con características prometedoras para su uso *in vivo* (véase, por ejemplo, Martin, P., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann y col., Chimia, 1996, 50, 168-176; Altmann y col., Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637; y Altmann y col., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926).

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

Fórmula X:



X

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

Bx es un resto base heterocíclica;

T_3 y T_4 son cada uno, independientemente, un grupo de unión internucleosídico que une el análogo de nucleósido de tetrahidropirano al compuesto antisentido o uno de T_3 y T_4 es un grupo de unión internucleosídico que une el análogo de nucleósido de tetrahidropirano con el compuesto antisentido y el otro de T_3 y T_4 es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido, o un grupo terminal 5' o 3';

q_1 , q_2 , q_3 , q_4 , q_5 , q_6 y q_7 son cada uno independientemente, H, alquilo C_1-C_6 , alquilo C_1-C_6 sustituido, alqueno C_2-C_6 , alqueno C_2-C_6 sustituido, alquino C_2-C_6 , o alquino C_2-C_6 sustituido; y

uno de R_1 y R_2 es hidrógeno y el otro se selecciona de halógeno, alcoxi sustituido o no sustituido, NJ_1J_2 , SJ_1 , N_3 , $OC(=X)J_1$, $OC(=X)NJ_1J_2$, $NJ_3C(=X)NJ_1J_2$, y CN, en el que X es O, S, o NJ_1 , y cada uno J_1 , J_2 , y J_3 es, independientemente, H o alquilo C_1-C_6 .

En ciertas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos de THP modificados de Fórmula X en la que q_m , q_n , q_p , q_r , q_s , q_t , y q_u son cada uno H. En ciertas realizaciones, al menos uno de q_m , q_n , q_p , q_r , q_s , q_t , y q_u es diferente de H. En ciertas realizaciones, al menos uno de q_m , q_n , q_p , q_r , q_s , q_t , y q_u es metilo. En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos de THP de Fórmula X en la que R_1 y R_2 es F. En ciertas realizaciones, R_1 es flúor y R_2 es H, R_1 es metoxi y R_2 es H y R_1 es metoxietoxi y R_2 es H.

Como se usa en el presente documento, "2'-modificado" o "2'-sustituido" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un sustituyente en la posición 2' distinta de H u OH. Los nucleósidos modificados en 2' incluyen, pero sin limitaciones, nucleósidos bicíclicos en los que el puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de azúcar conecta el carbono 2' y otro carbono del anillo de azúcar y los nucleósidos con sustituyentes 2' que no forman puentes, tales como alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C_1-C_{10} , $-OCF_3$, $O-(CH_2)_2-O-CH_3$, $2'-O(CH_2)_2SCH_3$, $O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$, o $O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$, en las que cada R_m y R_n es, de forma independiente, H o alquilo C_1-C_{10} 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.

También se conocen en la técnica muchos otros sistemas de anillo sustituto de azúcar biciclo y triciclo que pueden usarse para modificar nucleósidos para la incorporación en compuestos antisentido (véase, por ejemplo, el artículo

de revisión: Leumann, J. C, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, 10, 841–854).

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

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

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

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

Nucleobases modificadas

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

20

25

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

30

35

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

40

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

45

Composiciones y métodos para formular composiciones farmacéuticas

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

50

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

55

60

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

65

farmacéuticamente aceptables de compuestos antisentido, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos, y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero sin limitación, sales de sodio y potasio.

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

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

15 *Compuestos antisentido conjugados*

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

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

35 *Cultivo celular y tratamiento con compuestos antisentido*

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

45 *Prueba in vitro de oligonucleótidos antisentido*

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

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

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

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

65 Otro reactivo utilizado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye Cytfectin®

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

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

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

15 La concentración del oligonucleótido antisentido usado varía de una línea celular a otra línea celular. Los métodos para determinar la concentración óptima de oligonucleótidos antisentido para una línea celular particular son bien conocidos en la técnica. Los oligonucleótidos antisentido se usan típicamente a concentraciones que varían de 1 nM a 300 nM cuando se transfectan con LIPOFECTAMINE2000®, Lipofectin o Cytofectin. Los oligonucleótidos antisentido se usan a concentraciones más altas que varían de 625 a 20,000 nM cuando se transfectan usando electroporación.

20 *Aislamiento de ARN*

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

Análisis de la inhibición de niveles o expresión diana

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

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

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

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

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

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

Análisis de los niveles de proteína

65

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

Pruebas in vivo de compuestos antisentido

Los compuestos antisentido, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, se prueban en animales para evaluar su capacidad para inhibir la expresión del GCGR y producir cambios fenotípicos. Las pruebas se pueden realizar en animales normales o en modelos experimentales de enfermedades. Para la administración a animales, los oligonucleótidos antisentido se formulan en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato. La administración incluye vías de administración parenteral. Después de un período de tratamiento con oligonucleótidos antisentido, se aísla el ARN del tejido y se miden los cambios en la expresión del ácido nucleico del GCGR. También se miden los cambios en los niveles de la proteína GCGR.

Ciertas indicaciones

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

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

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

En ciertas realizaciones, el síntoma o signo físico es un aumento de los niveles de glucosa. En ciertas realizaciones, el signo o síntoma es aumento de peso. En ciertas realizaciones, el síntoma es micción frecuente. En ciertas realizaciones, el síntoma es sed inusual. En ciertas realizaciones, el síntoma es hambre extrema. En ciertas realizaciones, el síntoma es fatiga extrema. En ciertas realizaciones, el síntoma es visión borrosa. En ciertas realizaciones, el síntoma es infecciones frecuentes. En ciertas realizaciones, el síntoma es hormigueo o entumecimiento en las extremidades. En ciertas realizaciones, el síntoma es piel seca y con picor. En ciertas realizaciones, el signo o síntoma es pérdida de peso. En ciertas realizaciones, el síntoma son llagas de cicatrización lenta. En ciertas realizaciones, el síntoma es inflamación de las encías. En ciertas realizaciones, el signo o síntoma

es resistencia a la insulina aumentada. En ciertas realizaciones, el síntoma o signo es un aumento de los niveles de glucosa. En ciertas realizaciones, el síntoma o signo es aumento de la masa grasa. En ciertas realizaciones, el síntoma o signo es una tasa metabólica disminuida. En ciertas realizaciones, el síntoma o signo es disminución del aclaramiento de glucosa. En ciertas realizaciones, el síntoma o signo es disminución de la tolerancia a la glucosa.

5 En ciertas realizaciones, el síntoma o signo es disminución de la sensibilidad a la insulina. En ciertas realizaciones, el síntoma o signo es disminución de la sensibilidad a la insulina hepática. En ciertas realizaciones, el síntoma o signo es aumento del tamaño y peso del tejido adiposo. En ciertas realizaciones, el signo o síntoma es aumento de la grasa corporal. En ciertas realizaciones, el signo o síntoma es aumento del peso corporal.

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

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

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

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

Ciertas terapias de combinación

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

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

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

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

65 En ciertas realizaciones, los segundos agentes incluyen, pero sin limitación, un agente hipoglucemiante. El agente

- hipoglucemiante puede incluir, pero sin limitaciones, un cambio de estilo de vida terapéutico, agonista de PPAR, un inhibidor de la dipeptidil peptidasa (IV), un análogo de GLP-1, insulina o un análogo de insulina, un secretagogo de insulina, un inhibidor de SGLT2, un análogo de amilina humana, una biguanida, un inhibidor de alfa-glucosidasa o una combinación de los mismos. El agente hipoglucemiante puede incluir, pero sin limitación, metformina,
- 5 sulfonilurea, rosiglitazona, meglitinida, tiazolidindiona, inhibidor de alfa-glucosidasa o una combinación de los mismos. La sulfonilurea puede ser acetohexamida, clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, glimepirida, una glipizida, una gliburida o una gliclazida. La meglitinida puede ser nateglinida o repaglinida. La tiazolidindiona puede ser pioglitazona o rosiglitazona. La alfa-glucosidasa puede ser acarbosa o miglitol.
- 10 En algunas realizaciones, la terapéutica hipoglucemiante es un análogo de GLP-1. En algunas realizaciones, el análogo de GLP-1 es exendina-4 o liraglutida.
- En otras realizaciones, la terapéutica hipoglucemiante es una sulfonilurea. En algunas realizaciones, la sulfonilurea es acetohexamida, clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, glimepirida, una glipizida, una gliburida o una gliclazida.
- 15 En algunas realizaciones, el fármaco hipoglucemiante es una biguanida. En algunas realizaciones, la biguanida es metformina y en algunas realizaciones los niveles de glucosa se disminuyen sin incremento de la acidosis láctica en comparación con la acidosis láctica observada tras el tratamiento con metformina sola.
- 20 En algunas realizaciones, el fármaco hipoglucemiante es una meglitinida. En algunas realizaciones, la meglitinida es nateglinida o repaglinida.
- En algunas realizaciones, el fármaco hipoglucemiante es tiazolidindiona. En algunas realizaciones, la tiazolidindiona es pioglitazona, rosiglitazona o troglitazona. En algunas realizaciones, los niveles de glucosa en sangre se disminuyen sin mayor ganancia de peso que la observada con el tratamiento con rosiglitazona sola.
- 25 En algunas realizaciones, el fármaco hipoglucemiante es un inhibidor de la alfa-glucosidasa. En algunas realizaciones, el inhibidor de la alfa-glucosidasa es acarbosa o miglitol.
- 30 En una cierta realización, un agente hipoglucemiante coadministrado es ISIS 113715.
- En una cierta realización, la terapia hipoglucemiante es un cambio terapéutico del estilo de vida.
- En ciertas realizaciones, los segundos agentes incluyen, pero sin limitación, agentes hipolipemiantes. El agente hipolipemiante puede incluir, entre otros, atorvastatina, simvastatina, rosuvastatina y ezetimiba. En ciertas de dichas realizaciones, el agente hipolipemiante se administra antes de la administración de una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En ciertas de dichas realizaciones, el agente hipolipemiante se administra después de la administración de una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En ciertas de dichas realizaciones, el agente hipolipemiante se administra al mismo tiempo que la composición farmacéutica
- 35 descrita en el presente documento. En ciertas de dichas realizaciones, la dosis de un agente hipolipemiante coadministrado es la misma que la dosis que se administraría si el agente hipolipemiante se administrara solo. En ciertas de dichas realizaciones, la dosis de un agente hipolipemiante coadministrado es menor que la dosis que se administraría si el agente hipolipemiante se administrara solo. En ciertas de dichas realizaciones, la dosis de un agente hipolipemiante coadministrado es mayor que la dosis que se administraría si el agente hipolipemiante se administrara solo.
- 40 En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un inhibidor de la HMG-CoA reductasa. En ciertas de dichas realizaciones, el inhibidor de la HMG-CoA reductasa es una estatina. En ciertas de dichas realizaciones, la estatina se selecciona de atorvastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina y rosuvastatina.
- 50 En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un inhibidor de la absorción de colesterol. En ciertas de dichas realizaciones, el inhibidor de la absorción de colesterol es ezetimiba.
- En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un inhibidor de la HMG-CoA reductasa formulado conjuntamente con un inhibidor de la absorción de colesterol. En ciertas de dichas realizaciones, el agente hipolipemiante formulado conjuntamente es ezetimiba/simvastatina.
- 55 En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un inhibidor de la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal.
- 60 En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un oligonucleótido dirigido a ApoB.
- En ciertas realizaciones, los segundos agentes incluyen, pero sin limitación, un agente o fármaco anti-obesidad. Dichos agentes antiobesidad incluyen, pero sin limitación, orlistat, sibutramina o rimonabant, y se pueden administrar como se ha descrito anteriormente, como agentes adiposos o reductores del peso corporal. En ciertas realizaciones,
- 65

el compuesto antisentido puede coadministrarse con supresores del apetito. Dichos supresores del apetito incluyen, pero sin limitación, tenuato de dietilpropion, mazindol, orlistat, fendimetrazina, fentermina y sibutramina, y pueden administrarse como se describe en el presente documento. En cierta realización, los agentes antiobesidad están basados en el SNC, tales como, pero sin limitación, sibutramina, o basados en GLP-1 tales como, pero sin limitación, liraglutida.

Formulaciones

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

Los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento pueden incluirse en una composición o formulación farmacéutica. La composición farmacéutica que puede incluir cualquier sal, éster o sales de dichos ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, incluido un ser humano, puede proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o un residuo del mismo.

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

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

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

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

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

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

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

Las formulaciones incluyen formulaciones liposomales. Como se usa en la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta por lípidos anfifílicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilaminares o multilamelares que tienen una membrana formada a partir de un material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición que se va a administrar. Los liposomas catiónicos son liposomas cargados positivamente que se cree que interactúan con moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable. Se cree que los liposomas que son sensibles al pH o están cargados negativamente atrapan ADN en lugar de formar complejos con él. Se han usado liposomas catiónicos y no catiónicos para suministrar ADN

a las células.

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

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

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

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

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

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

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

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

Dosificación

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

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

Ciertos compuestos

Se analizaron aproximadamente setecientos setenta y siete compuestos antisentido recientemente diseñados y divulgados anteriormente de diversas longitudes, motivos y composición de la cadena principal para determinar su efecto sobre el ARNm de GCGR *in vitro* en varios tipos de células (Ejemplo 1). Los nuevos compuestos se

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

Los 33 oligonucleótidos seleccionados finales ISIS 304538 (SEQ ID NO: 112), ISIS 304539 (SEQ ID NO: 113), ISIS 325568 (SEQ ID NO: 4), ISIS 398457 (SEQ ID NO: 9), ISIS 398471 (SEQ ID NO: 17), ISIS 398486 (SEQ ID NO: 24), ISIS 398491 (SEQ ID NO: 105), ISIS 398506 (SEQ ID NO: 108), ISIS 398507 (SEQ ID NO: 109), ISIS 398508 (SEQ ID NO: 110), ISIS 436034 (SEQ ID NO: 35), ISIS 436140 (SEQ ID NO: 102), ISIS 436141 (SEQ ID NO: 114), ISIS 448718 (SEQ ID NO: 99), ISSI 448730 (SEQ ID NO: 100), ISIS 448754 (SEQ ID NO: 98), ISIS 448766 (SEQ ID NO: 31), ISIS 448817 (SEQ ID NO: 52), ISIS 448818 (SEQ ID NO: 56), ISIS 448819 (SEQ ID NO: 58), ISIS 448848 (SEQ ID NO: 62), ISIS 448860 (SEQ ID NO: 65), ISIS 448890 (SEQ ID NO: 68), ISIS 449884 (SEQ ID NO: 11), ISIS 449954 (SEQ ID NO: 51), ISIS 449956 (SEQ ID NO: 54), ISIS 459014 (SEQ ID NO: 80), ISIS 459024 (SEQ ID NO: 89), ISIS 459032 (SEQ ID NO: 81), ISIS 459040 (SEQ ID NO: 82), ISIS 459046 (SEQ ID NO: 83), ISIS 459076 (SEQ ID NO: 84) y ISIS 459157 (SEQ ID NO: 85), se analizaron para determinar la tolerabilidad en un modelo de ratón CD1, así como un modelo de rata Sprague-Dawley. Los compuestos son complementarios a las regiones 548-567, 2016-2035 y 2018-2037 de las SEQ ID NO: 1, y 6682-6698, 7267-7283, 7270-7286, 7292-7308, 7295-7311, 7316-7332, 7317-7333, 7319-7335, 7341-7357, 7344-7360, 7365-7381, 7368-7384, 7389-7405, 7392-7408, 7416-7432, 7437-7453, 7440-7456, 7783-7799, 8030-8049, 8133-8152, 8141-8160, 8144-8160, 9002-9021, 9008-9027, 9245-9264, 9246-9262, 9804-9823, 10676-10695, 10718-10734, 12030-12049, 12031-12050, 12031-12047, 12032-12051, 12033-12052, 12033-12049, 12036-12055, 12175-12194, 12178-12194, 13490-13509, 14138-14157, 15075-15094, 15743-15762, 15744-15763, 15745-15764, y 15746-15765 de la SEQ ID NO:2.

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

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

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

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

436140, 448766, 449884, 459014, 459032, 459040, y 459157.

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

De acuerdo con esto, se proporcionan en el presente documento compuestos antisentido con una o más de las características mejoradas. En ciertas realizaciones, los compuestos como se describen en el presente documento son eficaces en virtud de tener al menos uno de una CI_{50} *in vitro* inferior a 0,1 μ M, inferior a 0,2 μ M, inferior a 0,4 μ M, inferior a 0,35 μ M, inferior a 0,3 μ M, inferior a 2,5 μ M, inferior a 2,0 μ M, inferior a 1,5 μ M, inferior a 1,0 μ M, cuando se libera en una línea celular HepG2 usando electroporación como se describe en los Ejemplos 8-11. En algunas de tales realizaciones, los compuestos son complementarios a una o más de las regiones 548-567, 2016-2035 y 2018-2037 de la SEQ ID NO: 1, y 6682-6698, 7267-7283, 7270-7286, 7292-7308, 7295-7311, 7316-7332, 7317-7333, 7319-7335, 7341-7357, 7344-7360, 7365-7381, 7368-7384, 7389-7405, 7392-7408, 7416-7432, 7437-7453, 7440-7456, 7783-7799, 8030-8049, 8133-8152, 8141-8160, 8144-8160, 9002-9021, 9008-9027, 9245-9264, 9246-9262, 9804-9823, 10676-10695, 10718-10734, 12030-12049, 12031-12050, 12031-12047, 12032-12051, 12033-12052, 12033-12049, 12036-12055, 12175-12194, 12178-12194, 13490-13509, 14138-14157, 15075-15094, 15743-15762, 15744-15763, 15745-15764, y 15746-15765 de la SEQ ID NO:2.

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

40 Ejemplos

Divulgación no limitante

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

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

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

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos recientemente diseñados en la Tabla 1 se diseñaron como gapmers 3-10-4 MOE o gapmers 5-10-5 MOE. Los gapmers 3-10-4 MOE tienen 17 nucleósidos de longitud, en los que el

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

15

Tabla 1

Inhibición de los niveles de ARNm del GCGR humano por oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2									
No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO	
310457	548	564	GCACTTTGTGGTGCCAAGGC	88	5-10-5	n/a	n/a	4	
449823	1098	1114	GCACCCCAGCCGATGCC	91	3-10-4	n/a	n/a	5	
450035	n/a	n/a	AGCCCTGGCCGGTCCTT	82	3-10-4	6691	6707	6	
449881	n/a	n/a	TCCCGAGGTGCCCAATG	89	3-10-4	7267	7283	7	
						7292	7308		
						7316	7332		
						7341	7357		
						7365	7381		
						7389	7405		
449882	n/a	n/a	TTCCCGAGGTGCCCAAT	87	3-10-4	7268	7284	8	
						7293	7309		
						7317	7333		
						7342	7358		
						7366	7382		
						7390	7406		
						7414	7430		
7438	7454								

ES 2 796 556 T3

Inhibición de los niveles de ARNm del GCGR humano por oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2								
No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
398457	n/a	n/a	GGGTTCCCGAGGTGCCCAAT	95	3-10-4	7268	7287	9
						7293	7312	
						7317	7336	
						7342	7361	
						7366	7385	
						7390	7409	
						7414	7433	
						7438	7457	
449883	n/a	n/a	GTTCCCGAGGTGCCCAA	98	3-10-4	7269	7285	10
						7294	7310	
						7318	7334	
						7343	7359	
						7367	7383	
						7391	7407	
						7415	7431	
449884	n/a	n/a	GGTTCGAGGTGCCCA	94	3-10-4	7270	7286	11
						7295	7311	
						7319	7335	
						7344	7360	
						7368	7384	
						7392	7408	
						7416	7432	
449885	n/a	n/a	GGGTTCCCGAGGTGCC	93	3-10-4	7271	7287	12
						7296	7312	
						7320	7336	
						7345	7361	
						7369	7385	
						7393	7409	
						7417	7433	
450039	n/a	n/a	TGATCTACCCAGCCCT	88	3-10-4	7740	7756	13
						7741	7757	
						7742	7758	
						7743	7759	
						7744	7760	
						7745	7761	
						7746	7762	

ES 2 796 556 T3

Inhibición de los niveles de ARNm del GCGR humano por oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2								
No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
449894	n/a	n/a	AAGGTGACACCAGCCTG	92	3-10-4	7782	7798	14
449895	n/a	n/a	CTGAAGGTGACACCAGC	90	3-10-4	7785	7801	15
450040	n/a	n/a	TTCCAGCTGAGCACCCA	84	3-10-4	7897	7913	16
398471	n/a	n/a	TCCACAGGCCACAGGTGGGC	80	5-10-5	8133	8152	17
449905	n/a	n/a	GCATCCACAGGCCACAG	85	3-10-4	8139	8155	18
449906	n/a	n/a	AGCATCCACAGGCCACA	90	3-10-4	8140	8156	19
449907	n/a	n/a	CAGCATCCACAGGCCAC	85	3-10-4	8141	8157	20
449908	n/a	n/a	CTCAGCATCCACAGGCC	84	3-10-4	8143	8159	21
449910	n/a	n/a	AGCCACTGGGAGCACCC	85	3-10-4	8386	8402	22
449912	n/a	n/a	GGCTCTGCCCCAACTCT	82	3-10-4	8448	8464	23
398486	n/a	n/a	GTGAGCAGCCATGCAGGCTT	95	5-10-5	9002	9021	24
449916	n/a	n/a	GAGCAGCCATGCAGGCT	86	3-10-4	9003	9019	25
449917	n/a	n/a	TGAGCAGCCATGCAGGC	90	3-10-4	9004	9020	26
449922	n/a	n/a	GCCAGGTGAGCAGCCAT	86	3-10-4	9010	9026	27
450049	n/a	n/a	AGGGACAGGCACCTGCG	87	3-10-4	9130	9146	28
450050	n/a	n/a	GCCTGGATTTTAGCCTC	84	3-10-4	9249	9265	29
448762	n/a	n/a	CGGGGTGGCAACAGCTACAC	80	5-10-5	9592	9611	30
448766	n/a	n/a	GCAAGGCTCGGTTGGGCTTC	86	5-10-5	9804	9823	31

ES 2 796 556 T3

Inhibición de los niveles de ARNm del GCGR humano por oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2								
No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
450054	n/a	n/a	TGCAAGGCTCGGTTGGG	82	3-10-4	9808	9824	32
449759	176	192	GCAGAGCAGCAGAGCCT	80	3-10-4	10667	10683	33
449760	177	193	GGCAGAGCAGCAGAGCC	88	3-10-4	10668	10684	34
436034	185	204	GGCAGCTGAGTGGCAGAGCA	72	5-10-5	10676	10695	35
450059	281	297	GCATGCCTCTGGGCAGC	88	3-10-4	10772	10788	36
448799	n/a	n/a	AGGCACAGGCTGAAAGGCTC	80	5-10-5	11667	11686	37
449938	n/a	n/a	AGGCCAGGCACAGGCTG	92	3-10-4	11675	11691	38
448802	n/a	n/a	GCTGAGGCCAGGCACAGGCT	87	5-10-5	11676	11695	39
398585	n/a	n/a	GGCTGCATAAGCACCCAGGA	87	5-10-5	11724	11743	40
449944	n/a	n/a	CTGCATAAGCACCCAGG	84	3-10-4	11725	11741	41
449945	n/a	n/a	CCCAGCTCTGTGGCTCA	90	3-10-4	11819	11835	42
448806	n/a	n/a	GTCCCCAGCTCTGTGGCTCA	96	5-10-5	11819	11838	43
450061	n/a	n/a	GCAAGTCCCCAGCTCTG	91	3-10-4	11826	11842	44
449948	n/a	n/a	CGCCCTGGCACTGTCTG	88	3-10-4	11962	11978	45
449949	n/a	n/a	GTGTCCAGGCCATGATA	88	3-10-4	12026	12042	46
449951	n/a	n/a	AAGTGTCCAGGCCATGA	93	3-10-4	12028	12044	47
398504	n/a	n/a	CCCAAGTGTCCAGGCCATGA	91	5-10-5	12028	12047	48
449952	n/a	n/a	CAAGTGTCCAGGCCATG	90	3-10-4	12029	12045	49

ES 2 796 556 T3

Inhibición de los niveles de ARNm del GCGR humano por oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2								
No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
449953	n/a	n/a	CCAAGTGTCCAGGCCAT	91	3-10-4	12030	12046	50
449954	n/a	n/a	CCCAAGTGTCCAGGCCA	92	3-10-4	12031	12047	51
448817	n/a	n/a	CACCCCAAGTGTCCAGGCCA	98	5-10-5	12031	12050	52
449955	n/a	n/a	CCCAAGTGTCCAGGCC	94	3-10-4	12032	12048	53
449956	n/a	n/a	ACCCCAAGTGTCCAGGC	89	3-10-4	12033	12049	54
449958	n/a	n/a	GCACCCCAAGTGTCCAG	93	3-10-4	12035	12051	55
448818	n/a	n/a	CCCTGCACCCCAAGTGTCCA	83	5-10-5	12036	12055	56
449960	n/a	n/a	AAACCTGTGGCTGCCAC	93	3-10-4	12175	12191	57
448819	n/a	n/a	GCCAAACCTGTGGCTGCCAC	95	5-10-5	12175	12194	58
449797	733	749	GGACAGGCTGTAGCCCA	83	3-10-4	13034	13050	59
448840	n/a	n/a	GGCTCACTCCATCACTGAGC	82	5-10-5	13314	13333	60
449967	n/a	n/a	CCACCTGCCTGGCTGCC	89	3-10-4	13366	13382	61
448848	1024	1043	GTGCAGGTACAGGCCCTCCA	92	5-10-5	13490	13509	62
448850	1049	1068	GGAGGGTGGCCAGGCCCAGC	80	5-10-5	13515	13534	63
449819	1093	1109	CCAGCCGATGCCCAGGT	82	3-10-4	13559	13575	64
448860	n/a	n/a	GGCCAGTGTCTGGTGTCTCT	79	5-10-5	14138	14157	65
449836	1467	1483	GCCACCAGCAGGCCCTG	87	3-10-4	14779	14795	66
450074	n/a	n/a	GGGCTGAGGCCAACCTG	91	3-10-4	15007	15023	67

Inhibición de los niveles de ARNm del GCGR humano por oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2									
No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO	
448890	n/a	n/a	GCCACCCAGCATCGCCACGG	86	5-10-5	15075	15094	68	
448897	n/a	n/a	CCCTGCTGGGCACAGCTATG	83	5-10-5	15094	15113	69	
448901	n/a	n/a	CACAAGCTCCCTGCTGGGCA	82	5-10-5	15102	15121	70	
448903	n/a	n/a	GAGCGACACAAGCTCCCTGC	86	5-10-5	15108	15127	71	
448905	n/a	n/a	GGTGCAGAGCGACACAAGCT	81	5-10-5	15114	15133	72	
449851	1646	1662	GGCTGCCACCACCCCTC	88	3-10-4	15374	15390	73	
449856	2016	2032	CTTTATTGTTGGAGGAC	85	3-10-4	15744	15760	74	
449858	2018	2034	CTCTTTATTGTTGGAGG	85	3-10-4	15746	15762	75	
449859	2019	2035	GCTCTTTATTGTTGGAG	91	3-10-4	15747	15763	76	
449860	2020	2036	AGCTCTTTATTGTTGGA	88	3-10-4	15748	15764	77	
449861	2021	2037	GAGCTCTTTATTGTTGG	81	3-10-4	15749	15765	78	

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

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

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos recientemente diseñados en la Tabla 2 se diseñaron como los gapmers 3-10-3 MOE, 3-10-4 MOE, 4-10-4 MOE, 4-10-5 MOE o 5-10-6 MOE. Los gapmers 3-10-3 MOE tienen 16 nucleósidos de longitud, en los que el segmento del hueco central comprende diez desoxinucleósidos 2' y está flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y en la dirección 3' que comprende tres nucleósidos cada uno. Los gapmers 3-10-4 MOE tienen 17 nucleósidos de longitud, en los que el segmento del hueco central comprende diez

desoxinucleósidos 2' y está flanqueado por un segmento de ala en la dirección 5' que comprende tres nucleósidos y por un segmento de ala en la dirección 3' que comprende cuatro nucleósidos. Los gapmers 4-10-4 MOE tienen 18 nucleósidos de longitud, en los que el segmento del hueco central comprende diez desoxinucleósidos 2' y está flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y en la dirección 3' que comprende cuatro nucleósidos cada uno.

5 Los gapmers 4-10-5 MOE tienen 19 nucleósidos de longitud, en los que el segmento del hueco central comprende diez desoxinucleósidos 2' y está flanqueado por un segmento de ala en la dirección 5' que comprende cuatro nucleósidos y por un segmento de ala en la dirección 3' que comprende cinco nucleósidos. Los gapmers 5-10-6 MOE tienen 21 nucleósidos de longitud, en los que el segmento del hueco central comprende diez

10 desoxinucleósidos 2' y está flanqueado por un segmento de ala en la dirección 5' que comprende cinco nucleósidos y por un segmento de ala en la dirección 3' que comprende seis nucleósidos. Cada nucleósido en el segmento de ala en 5' y cada nucleósido en el segmento de ala 3' tiene una modificación de 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos a lo largo de cada gapmer son enlaces fosforotioato (P = S). Todos los restos de citosina a lo largo de cada gapmer son 5-metilcitosinas. El "sitio de inicio" indica el nucleótido más 5' al que se dirige el gapmer en la secuencia génica humana. El "sitio de terminación" indica el nucleótido más 3' al que se dirige el gapmer en la

15 secuencia génica humana. Cada gapmer enumerado en la Tabla 2 está dirigido al ARNm de GCGR humano, designado en el presente documento como SEQ ID NO: 1 (N.º de acceso de GENBANK NM_000160.3) o la secuencia genómica de GCGR humano, designada en el presente documento como SEQ ID NO: 2 (N.º de acceso en GENBANK NW_926918.1 truncado de 19598000 a 16865000). 'n/a' indica que el oligonucleótido antisentido no se dirige a esa secuencia génica particular.

20

Tabla 2

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

No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
315163	702	721	ACCTGGAAGCTGCTGTACAT	38	5-10-5	13003	13022	79
459014	227	243	GGGCAATGCAGTCCTGG	62	3-10-4	10718	10734	80
459032	n/a	n/a	GAAGGTGACACCAGCCT	83	3-10-4	7783	7799	81
459040	n/a	n/a	GCTCAGCATCCACAGGC	63	3-10-4	8144	8160	82
459046	n/a	n/a	TGGATTTTAGCCTCCTC	73	3-10-4	9246	9262	83
459076	n/a	n/a	GCCAAACCTGTGGCTGC	84	3-10-4	12178	12194	84
459157	n/a	n/a	GGGTTCCCGAGGTGCCAATG	92	5-10-6	7267	7287	85
						7292	7312	
						7316	7336	
						7341	7361	
						7365	7385	
						7389	7409	
						7437	7457	
459010	n/a	n/a	GGTTCGAGGTGCC	100	3-10-3	7271	7286	86
						7296	7311	
						7320	7335	
						7345	7360	
						7369	7384	
						7393	7408	
						7417	7432	
						7441	7456	

ES 2 796 556 T3

No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
459011	n/a	n/a	GGGTTCCCGAGGTGCC	89	3-10-3	7272	7287	87
						7297	7312	
						7321	7336	
						7346	7361	
						7370	7385	
						7394	7409	
						7418	7433	
						7442	7457	
459058	n/a	n/a	GAGGCCAGGCACAGGCT	75	3-10-4	11676	11692	88
459024	n/a	n/a	CGGTCCTTGGAGGATGC	63	3-10-4	6682	6698	89
459088	n/a	n/a	GTTCCCGAGGTGCCCAATG	89	4-10-5	7267	7285	90
						7292	7310	
						7316	7334	
						7341	7359	
						7365	7383	
						7389	7407	
						7437	7455	
459087	n/a	n/a	GGTTCCTCGAGGTGCCCAAT	95	4-10-5	7268	7286	91
						7293	7311	
						7317	7335	
						7342	7360	
						7366	7384	
						7390	7408	
						7414	7432	
						7438	7456	
459086	n/a	n/a	GGGTTCCCGAGGTGCCCAA	96	4-10-5	7269	7287	92
						7294	7312	
						7318	7336	
						7343	7361	
						7367	7385	
						7391	7409	
						7415	7433	
						7439	7457	
459083	n/a	n/a	GGTTCCTCGAGGTGCCCAA	91	4-10-4	7269	7286	93
						7294	7311	
						7318	7335	
						7343	7360	

No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
						7367	7384	
						7391	7408	
						7415	7432	
						7439	7456	
459009	n/a	n/a	GTTCCCGAGGTGCCCA	61	3-10-3	7270	7285	94
						7295	7310	
						7319	7334	
						7344	7359	
						7368	7383	
						7392	7407	
						7416	7431	
						7440	7455	
459082	n/a	n/a	GGGTTCCCGAGGTGCCCA	91	4-10-4	7270	7287	95
						7295	7312	
						7319	7336	
						7344	7361	
						7368	7385	
						7392	7409	
						7416	7433	
						7440	7457	
459158	n/a	n/a	GGGTTCCCGAGGTGCCAATA	94	5-10-6	7413	7433	96
459063	n/a	n/a	CCAGCTCTGTGGCTCAG	62	3-10-4	11818	11834	97

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

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

de acceso de GENBANK NM_000160.3) o la secuencia genómica de GCGR humano, designada en el presente documento como SEQ ID NO: 2 (N.º de acceso en GENBANK NW_926918.I truncado de 19598000 a 16865000). 'n/a' indica que el oligonucleótido antisentido no se dirige a esa secuencia génica particular.

5 **Tabla 3**
Inhibición de los niveles de ARNm del GCGR humano mediante oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2

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

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

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

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

35

Tabla 4

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

No. ISIS	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:1	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:1	Secuencia	% de inhibición	Motivo	Sitio de inicio de la SEQ ID NO:2	Sitio de terminación de la SEQ ID NO:2	SEQ ID NO
315163	702	721	ACCTGGAAGCTGCTGTACAT	71	5-10-5	13003	13022	79
325568	548	567	GCACTTTGTGGTGCCAAGGC	79	2-16-2	n/a	n/a	4
436140	2015	2034	CTCTTTATTGTTGGAGGACA	93	5-10-5	15743	15762	102
398455	2014	2033	TCTTTATTGTTGGAGGACAT	89	5-10-5	15742	15761	103
398470	n/a	n/a	CCACAGGCCACAGGTGGGCT	85	5-10-5	8132	8151	104
398491	n/a	n/a	AGCCAGGTGAGCAGCCATGC	81	5-10-5	9008	9027	105
398501	n/a	n/a	AAGTGTCCAGGCCATGATAT	84	5-10-5	12025	12044	106
398503	n/a	n/a	CCAAGTGTCCAGGCCATGAT	92	5-10-5	12027	12046	107
398506	n/a	n/a	ACCCCAAGTGTCCAGGCCAT	89	5-10-5	12030	12049	108
398507	n/a	n/a	GCACCCCAAGTGTCCAGGCC	97	5-10-5	12032	12051	109
398508	n/a	n/a	TGCACCCCAAGTGTCCAGGC	87	5-10-5	12033	12052	110
304535	1988	2007	GCACATGGGACGTGCCGACA	98	5-10-5	15716	15735	111
304538	2016	2035	GCTCTTTATTGTTGGAGGAC	95	5-10-5	15744	15763	112
304539	2018	2037	GAGCTCTTTATTGTTGGAGG	92	5-10-5	15746	15765	113
436141	2017	2036	AGCTCTTTATTGTTGGAGGA	93	5-10-5	15745	15764	114
436164	n/a	n/a	GGTTCCCGAGGTGCCCAATG	92	5-10-5	7267	7286	115
						7292	7311	
						7316	7335	
						7341	7360	
						7365	7384	
						7389	7408	
						7437	7456	

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

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

Tabla 5

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

ISIS No	0,4 μM	1,1 μM	3,3 μM	10,0 μM	CI₅₀ (μM)
315163	23	39	73	88	2,0
398457	64	69	71	68	<0,3
449759	24	47	75	85	1,3
449760	43	49	77	86	0,7
449797	38	54	69	93	0,8
449819	30	36	56	85	1,7
449823	29	31	43	82	2,5
449836	29	37	62	85	1,6
449851	14	36	73	93	1,6
449856	0	39	70	88	2,1
449858	16	27	65	86	2,1
449859	57	76	92	96	<0,3
449860	41	66	86	91	0,5
449881	27	49	67	70	1,5
449882	33	33	53	71	2,3
449883	63	66	75	76	<0,3
449884	64	77	74	71	<0,3
449885	67	74	71	76	<0,3
449894	55	56	74	78	<0,3
449895	44	60	71	72	0,5
449905	47	59	65	69	0,4
449906	52	66	75	80	<0,3
449907	35	36	62	70	1,8
449908	21	48	67	69	1,8
449910	7	16	51	61	4,8
449912	21	45	66	60	2,3
449916	16	40	55	55	3,9
449917	45	67	72	71	0,3
449922	39	48	60	67	1,3
449938	5	22	44	41	>10,0
449944	6	0	25	62	7,0
449945	22	36	57	64	2,8
449948	0	19	45	60	5,2
449949	0	16	41	52	7,8
449951	26	40	55	61	2,9
449952	21	28	52	62	3,8
449953	15	22	49	59	4,8
449954	0	53	60	58	3,4
449955	30	43	61	66	1,9
449956	10	40	52	64	3,3

ISIS No	0,4 μM	1,1 μM	3,3 μM	10,0 μM	CI ₅₀ (μM)
449958	17	46	54	67	2,6
449960	10	22	46	63	4,7
449967	0	16	36	49	9,8
450035	0	35	41	60	5,0
450039	18	30	51	60	4,2
450040	0	21	41	66	4,7
450049	22	27	59	68	2,9
450050	28	22	49	61	4,7
450054	0	11	22	25	>10,0
450059	11	41	64	78	2,1
450061	13	29	49	60	4,4
450074	15	27	40	61	5,4

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

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

10 Los niveles de ARNm de GCGR se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición de GCGR respecto a las células control sin tratar.

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

Tabla 6

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

20

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

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

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

La concentración inhibitoria semimáxima (CI_{50}) de cada oligonucleótido se presenta también en la Tabla 7. Los niveles de ARNm de GCGR se redujeron significativamente de una manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótidos antisentido. 'n/a' indica que no hay datos para el oligonucleótido ISIS para dicha concentración en particular. ISIS 398457, ISIS 449884 e ISIS 449954, que causaron una reducción significativa de los niveles de ARNm de GCGR, se seleccionaron para estudios adicionales. Significativamente, ISIS 449884 demostró una CI_{50} de diez a cincuenta veces más baja que el ISIS 315163 de referencia en estudios comparativos presentados en los ejemplos 5-7.

Tabla 7
Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en células HepG2 usando electroporación

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

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

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

Tabla 8
Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en hepatocitos primarios de mono cinomolgo usando electroporación

Nº ISIS	750,0 nM	1500,0 nM	3000,0 nM	6000,0 nM	12000,0 nM
398457	85	89	92	89	85
398471	78	85	87	85	87

436140	81	93	96	97	96
448754	44	59	80	80	81
448766	79	90	88	87	83
448818	19	13	58	64	76
449884	89	92	89	87	90
459014	51	63	79	82	84
459032	78	85	88	88	87
459040	70	77	81	89	83
459046	34	38	65	61	80
459076	31	39	67	79	77
459157	89	87	88	88	86

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

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

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

20

Tabla 9

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

Nº ISIS	0,006 μM	0,020 μM	0,063 μM	0,200 μM	0,632 μM	2.000 μM	6.325 μM	20.000 μM	CI_{50} (μM)
325568	0	0	0	0	0	42	75	93	3,1
398471	0	4	7	24	62	65	65	59	0,4
448766	5	0	0	2	28	51	57	34	0,6
449884	0	12	61	59	71	68	72	62	0,1
459014	1	0	2	23	15	47	69	74	2,6
459032	0	6	4	33	55	68	72	61	0,5
459157	0	12	29	69	69	72	73	62	0,1

25

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

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

Los gapmers de los estudios descritos en los Ejemplos 1, 4 y 9 se analizaron adicionalmente a varias dosis en células HepG2. Las células se sembraron a una densidad de 40.000 células por pocillo y se transfectaron mediante electroporación con concentraciones de oligonucleótido antisentido de 0,12 μM , 0,37 μM , 1,11 μM , 3,33 μM y 10,00
35 μM como se especifica en la Tabla 10. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, el ARN aislado de las células y los niveles de ARNm del GCGR se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador DE GCGR humano RTS1508 se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles

de ARNm de GCGR se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición de GCGR respecto a las células control sin tratar. Como se ilustra en la Tabla 10, los niveles de ARNm del GCGR se redujeron significativamente en células tratadas con oligonucleótidos antisentido

5

Tabla 10

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

Nº ISIS	0,12 µM	0,37 µM	1,11 µM	3,33 µM	10,00 µM	CI ₅₀ (µM)
398455	35	57	81	94	94	0,2
398457	33	79	91	97	98	0,1
398470	37	48	86	92	96	0,2
398471	33	50	86	92	87	0,2
398486	50	47	85	91	98	0,1
398491	25	61	73	96	92	0,3
398501	35	43	85	98	98	0,3
398503	21	58	80	97	99	0,3
398504	51	57	91	92	98	0,1
398506	40	71	96	98	99	0,1
398507	59	85	97	98	n/a	<0,1
398508	22	48	90	94	98	0,3
398585	25	57	84	88	93	0,3
436034	34	56	61	81	92	0,3

10

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

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

15

Los gampers del estudio descrito en el Ejemplo 4 se analizaron adicionalmente a varias dosis en células HepG2. Las células se sembraron a una densidad de 40.000 células por pocillo y se transfectaron mediante electroporación con concentraciones de oligonucleótido antisentido de 0,04 µM, 0,12 µM, 0,37 µM, 1,11 µM, 3,33 µM y 10,00 µM como se especifica en la Tabla 11. Después de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, el ARN aislado de las células y los niveles de ARNm del GCGR se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de sonda de cebador DE GCGR humano RTS-1508 se usó para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de GCGR se ajustaron de acuerdo con un contenido de ARN total medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en forma del porcentaje de inhibición de GCGR respecto a las células control sin tratar. Los niveles de ARNm de GCGR se redujeron significativamente en las células tratadas con oligonucleótido antisentido.

20

25

Tabla 11

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

Nº ISIS	0,04 µM	0,12 µM	0,37 µM	1,11 µM	3,33 µM	10,00 µM	CI ₅₀ (µM)
304535	21	31	55	90	99	96	0,2
304538	27	42	73	91	100	95	0,1
304539	15	33	56	87	95	93	0,3
436140	4	27	57	85	94	95	0,3
436141	19	27	64	84	92	95	0,3
436164	12	37	75	94	94	96	0,2

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

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

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

Tabla 12
Inhibición antisentido dependiente de la dosis del GCGR humano en células HepG2 usando electroporación

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

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

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

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

Tabla 13

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

Nº ISIS	0,12 µM	0,37 µM	1,11 µM	3,33 µM	10,00 µM	CI ₅₀ (µM)
398457	62	84	95	98	97	<0,1
459009	26	47	80	96	97	0,3
459010	56	90	96	98	97	<0,1
459011	46	81	97	95	96	<0,1
459024	29	56	74	89	95	0,3
459032	40	61	74	97	98	0,2
459040	48	65	84	96	95	0,1
459046	36	54	77	96	98	0,2
459058	21	46	88	95	98	0,3
459063	34	42	79	97	99	0,3
459076	32	72	84	98	99	0,1
459082	46	71	92	97	97	0,1
459083	53	71	90	96	97	<0,1
459086	24	72	92	96	97	0,2
459087	23	67	94	97	98	0,2
459088	34	61	86	95	98	0,2
459157	50	74	92	97	97	<0,1
459158	54	81	94	97	99	<0,1

5

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

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

10

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

15

Tratamiento

20

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

25

30

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

35

ES 2 796 556 T3

Tabla 14

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

	ALT (UI/l)	AST (UI/l)	Bilirrubina (mg/dl)	Albúmina (mg/dl)	BUN (mg/dl)
PBS	26	37	0,20	3,2	24
ISIS 304538	71	93	0,18	3,4	24
ISIS 304539	151	126	0,21	3,4	22
ISIS 325568	47	67	0,20	3,1	18
ISIS 398457	26	45	0,28	3,6	25
ISIS 398471	33	46	0,21	3,6	28
ISIS 398486	447	381	0,22	3,5	28
ISIS 398491	56	54	0,20	3,3	28
ISIS 398506	884	823	0,35	3,4	25
ISIS 398507	2381	895	0,28	3,9	24
ISIS 398508	643	227	0,20	3,4	25
ISIS 436034	1481	696	0,38	3,4	23
ISIS 436140	40	62	0,20	3,0	25
ISIS 436141	232	163	0,20	3,3	21
ISIS 448718	378	221	0,20	2,9	25
ISIS 448730	852	398	1,40	3,5	27
ISIS 448754	71	84	0,20	3,4	28
ISIS 448766	47	46	0,26	3,5	23
ISIS 448817	211	144	0,25	3,6	24
ISIS 448818	33	52	0,17	3,1	23
ISIS 448819	196	188	0,25	3,5	23
ISIS 448848	1677	855	0,61	3,1	17
ISIS 448860	951	536	0,22	3,3	20
ISIS 448890	402	345	0,17	3,0	18
ISIS 449884	38	51	0,23	3,5	23
ISIS 449954	1465	1229	0,28	3,7	23
ISIS 449956	55	63	0,17	2,9	21
ISIS 459014	27	50	0,17	3,2	22
ISIS 459024	52	54	0,23	3,3	22
ISIS 459032	50	55	0,22	3,2	21
ISIS 459040	37	70	0,14	3,1	22
ISIS 459046	41	81	0,19	3,0	20
ISIS 459076	33	50	0,21	3,0	22
ISIS 459157	25	43	0,21	3,2	21

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

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

Tratamiento

- 10 Se mantuvieron las ratas macho Sprague-Dawley de siete semanas de edad en un ciclo de luz/oscuridad de 12

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

10 *Función hepática*

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

20

Tabla 16

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

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

ES 2 796 556 T3

ISIS 449956	100	133	0,21
ISIS 459014	64	138	0,16
ISIS 459024	150	182	2,38
ISIS 459032	109	109	0,11
ISIS 459040	67	95	0,11
ISIS 459046	60	127	0,09
ISIS 459076	57	114	0,14
ISIS 459157	52	85	0,15

Tabla 17

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

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

459157	1,0	1,2
--------	-----	-----

Función renal

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

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

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

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

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

Tratamiento

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

Pesos de los órganos

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

Tabla 19

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

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

Función hepática

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

Tabla 20

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

	ALT UI/l	AST UI/l	Bilirrubina mg/dl	BUN mg/dl
Solución salina	28	48	0,12	12,7
325568	38	59	0,09	16,7
398471	29	49	0,10	10,4

436140	28	45	0,08	11,0
448766	31	64	0,08	13,2
449884	45	55	0,11	12,1
459014	27	44	0,13	23,2
459032	98	172	0,23	14,6
459040	25	43	0,08	14,1
459157	26	48	0,09	15,8

Tabla 21

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

5

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

Función renal

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

10

Tabla 22

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

15

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

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

20

La viscosidad de los oligonucleótidos antisentido seleccionados del estudio descrito en el Ejemplo 16 se midió con el objetivo de seleccionar oligonucleótidos antisentido que tienen una viscosidad superior a 40 cP. Los oligonucleótidos

que tienen una viscosidad superior a 40 cP serían demasiado viscosos para ser administrados a cualquier sujeto.

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

Tabla 23

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

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

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

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

Tratamiento

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

Determinación de la concentración de oligonucleótidos

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

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

Tabla 24

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

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

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

Los monos cinomolgos se trataron con oligonucleótidos antisentido ISIS seleccionados de los estudios descritos en

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

Tabla 25

Oligonucleótidos antisentido complementarios de la SEQ ID NO: 3

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

Tratamiento

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

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

35

Reducción de la diana hepática*Análisis de ARN*

- 5 El día 93, se extrajo el ARN del tejido hepático para el análisis PCR en tiempo real del GCGR usando el conjunto de sonda de cebador humano RTS1508. Los análisis también se realizaron usando el conjunto de sonda de cebador de mono rhesus humano RTS1479 (secuencia directa ATCTCCTGCCCTGGTACCT, designada en el presente documento como SEQ ID NO: 120; secuencia inversa GGTCCACGCACCCACTGA, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 121; secuencia de la sonda ACCGCTTCGTGTTCAAGAGATGCG, designada en el presente documento como SEQ ID NO: 122). Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición del ARNm de GCGR, en relación con el control de PBS, normalizado para el gen de mantenimiento, ciclofilina. Se obtuvieron resultados similares en la normalización con RIBOGREEN®. Como se muestra en la Tabla 26, el tratamiento con los oligonucleótidos antisentido ISIS dio como resultado una reducción significativa del ARNm del GCGR 1 en comparación con el control con PBS. Específicamente, el tratamiento con ISIS 449884 dio como resultado la reducción más significativa de la expresión de ARNm de GCGR.

Tabla 26

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

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

Análisis de los niveles de glucagón

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

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

Tabla 27

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

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

Estudios de tolerabilidad

Determinaciones de los pesos corporales y de órganos

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la salud general de los animales, se midieron los pesos corporales y de los órganos el día 93. Se midieron los pesos corporales y se presentan en la Tabla 28. Se midieron los pesos de los órganos y los datos se presentan también en la Tabla 28. Los resultados indican que el efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido sobre los pesos del cuerpo y de los órganos estaba dentro del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido. Específicamente, el tratamiento con ISIS 448994 fue bien tolerado en términos del peso corporal y de los órganos de los monos.

Tabla 28

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

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

Función hepática

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

Tabla 29

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

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

Función renal

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos de ISIS en la función renal, se tomaron muestras de sangre de todos los grupos de estudio. Las muestras de sangre se recogieron mediante venopunción femoral el día 95, 48 horas

después de la dosificación. Los monos se dejaron en ayunas durante la noche previa a extracción de sangre. La sangre fue recolectada en tubos que contenían anticoagulante K₂-EDTA, que se centrifugaron para obtener plasma. Los niveles de BUN y creatinina se midieron usando un analizador de química Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Japón). Los resultados se presentan en la Tabla 30, expresados en mg/dl.

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

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

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

15 *Hematología*

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

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

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

	GR (x 10 ⁶ /μl)	Plaquetas (x 103/μl)	WBC (x 103/μl)	Neutrófilos (x 103/μl)	Linfocitos (x 103/μl)	Monocitos (x 103/μl)
PBS	5,4	499	11,5	5,8	5,2	0,28
ISIS 398471	5,4	568	9,1	2,9	5,8	0,21
ISIS 448766	4,9	422	8,6	4,1	3,9	0,34
ISIS 449884	5,2	415	10,0	4,4	5,1	0,25
ISIS 459014	5,1	433	9,8	4,6	4,7	0,26
ISIS 459157	5,3	357	8,0	3,8	3,8	0,26
ISIS 325568	5,1	376	11,7	5,2	5,7	0,55

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

	Hemoglobina (g/dl)	HCT (%)
PBS	13,1	43

ISIS 398471	13,1	44
ISIS 448766	12,3	41
ISIS 449884	12,6	41
ISIS 459014	13,2	44
ISIS 459157	13,2	43
ISIS 325568	13,3	44

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

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Isis Pharmaceuticals, Inc.
- <120> MODULACIÓN ANTISENTIDO DE LA EXPRESIÓN DE GCGR
- <130> P067843EP
- 15 <150> EP12834215.1
- <151> 2012-09-20
- <150> PCT/US2012/056249
- <151> 2012-09-20
- 20 <150> 61/537.007
- <151> 2011-09-20
- <160> 122
- 25 <170> FastSEQ para Windows Versión 4,0
- <210> 1
- <211> 2051
- 30 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

35

40

45

50

55

ES 2 796 556 T3

5 agtttgcacc gaccccgatc tggcagcgcc gcgaagacga gcggtcaccg gcgcccggacc 60
cgagcgcgcc cagaggacgg cggggagcca agccgacccc cgagcagcgc gcgcccggacc 120
ctgaggctca gaggggcagc ttcaggggag gacaccccac tggccaggac gccccaggct 180
ctgctgctct gccactcagc tgccctcgga ggagcgtaca caccaccag gactgcattg 240
ccccagctgt gcagcccctg ccagatgtgg gaggcagcta gctgcccaga ggcatgcccc 300
10 cctgccagcc acagcgaccc ctgctgctgt tgctgctgct gctggcctgc cagccacagg 360
tcccctccgc tcaggtgatg gacttctgt ttgagaagtg gaagctctac ggtgaccagt 420
gtcaccacaa cctgagcctg ctgccccctc ccacggagct ggtgtgcaac agaaccttcg 480
acaagtattc ctgctggcog gacaccccc ccaataccac ggccaacatc tcctgcccct 540
ggtacctgcc ttggcaccac aaagtgcaac accgcttctg ttcaagaga tgcggggccc 600
accgtcagtg ggtgctgga ccccgggggc agccttggcg tgatgcctcc cagtgcaga 660
15 tggatggcga ggagattgag gtccagaagg aggtggccaa gatgtacagc agcttccagg 720
tgatgtacac agtgggctac agcctgtccc tgggggccct gctcctcgcc ttggccatcc 780
tggggggcct cagcaagctg cactgcaccc gcaatgccat ccacgcaat ctgtttgctg 840
ccttcgtgct gaaagccagc tccgtgctgg tcattgatgg gctgctcagg acccgctaca 900
gccagaaaaa tggcgacgac ctcagtgta gcacctggct cagtgatgga gcggtggctg 960
20 gctgccgtgt ggccgcggtg ttcattgcaat atggcatcgt ggccaactac tgctggctgc 1020
tgggtggagg cctgtacctg cacaacctgc tgggcctggc caccctccc gagaggagct 1080
tcttcagcct ctacctgggc atcggctggg gtgcccccat gctgttcgtc gtcccctggg 1140
cagtggctca gtgtctgttc gagaacgtcc agtgcctggc cagcaatgac aacatgggct 1200
tctgggtgat cctgcggttc cccgtcttc tggccatcct gatcaacttc ttcactctcg 1260
tccgcatcgt tcagctgctc gtggccaagc tgggggcagc gcagatgac cacacagact 1320
25 acaagttccg gctggccaag tccacgctga cctcatccc tctgctgggc gtccacgaag 1380
tggctcttcg ctctcgtgac gacgagcacg cccagggcac cctgcgctcc gccaagctct 1440
tcttogacct ctctcctcagc tcctccagc gcctgctggt ggctgtcctc tactgcttc 1500
tcaacaagga ggtgcagtgc gactgcggc ggcgttggca ccgctggcgc ctgggcaaag 1560
tgctatggga ggagcggaac accagcaacc acagggcctc atcttcgccc ggccacggcc 1620
30 ctcccagcaa ggagctgcag tttgggaggg gtggtggcag ccaggattca tctgcggaga 1680
cccccttggc tgggtgcctc cctagattgg ctgagagccc ctctgaacc ctgctgggac 1740
cccagctagg gctggactct ggcacccaga gggcgtcgtc ggacaaocca gaactggacg 1800
ccagctgag gctggggcg gggagccaa cagcagcccc cacctacccc ccaccccag 1860
tgtggctgtc tggcagattg ggcctcctc cctgcacct gccttgtccc tgggtgcagag 1920
gtgagcagag gactccagg cgggagtggt ggctgtgccc tgaactgctg gccagtgctc 1980
35 ccacgtatgt cggcacgtcc catgtgcatg gaaatgtcct ccaacaataa agagctcaag 2040
tggtcaccgt g 2051

40 <210> 2
<211> 20001
<212> ADN
<213> Homo sapiens

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(993)
<223> n es a, c, g, o t

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (2653)...(2743)
<223> n es a, c, g, o t

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (5539)...(5563)
<223> n es a, c, g, o t

60 <400> 2

65

ES 2 796 556 T3

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 120
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 180
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 240
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 300
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 360
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 420
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 480
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 540
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 600
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 660
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 720
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 780
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 840
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 900
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 960
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1020
 cagtgaaac gaggacactg ctaatatgct ttagaaaata gccctcacat tgggtgttct 1080
 cccaatcccc cacttactct aagctcccca ggtagcaata attcagaagt caaattgctc 1140
 agcactccta tggttcaagt gattcttgtg tctcagcctc ccaagttagct ggactacag 1200
 gagcccacca ccacgcccag ttaatttttg tatttttttag tagagatggg gtttcaccat 1260
 gttgaccagg ctggctcga actcctgacc tcaagtgat cactggcctc gccctccaaa 1320
 agtgttggga ttacaggcgt gagccactgc gcccagcctc aaccttctag tgaaccctcc 1380
 atgctctggt atcttttatt cctcttggat ttttgttgtt tcttttcttt ttcttcttct 1440
 ttttcttttc tttttttttt tttgagatgg agtttcattc ttgttgccca ggctggagtg 1500
 caatggcaca accttggtctc actgcaacct tcgcctcctg ggttcaagca atttgcctgc 1560
 ctcagcctcc caagtagctg ggattacagg catgtgctac catgcctggc gaattttgta 1620
 tttttagtag agacagggtt tctccgtggt ggtcgggctg atctcaaaact cccgacctca 1680
 ggtgatcagc ccgccttggc ctcccaggat gctgagatta caggcatgag ccaccacacc 1740
 cagccttttt gttgtttctt ctgagagatt tcttcaactc aattttccaa cccttctatt 1800
 aaatttttta aattccagat attctatttg cagccggcaa ggactcttc tgcgtctctg 1860
 ttgttttcca aagcattccg tcttagtttt tatgggagca tcatcctttc atgtctctaa 1920
 ggataatcag agtgggtaaa atgttcttga agttttcttc tgttccctgc agtagctctg 1980
 ttctctccag ttctctcttt cccaagtgat tgggtctgct catataccta gaggtcttgc 2040
 tttgcattca catctaaggg caaaaaggcgc taggatgcag tgcggaggtc cattcgcttt 2100
 gtcgtaagggt ttgtgccttt cttagtcctg cagtgggtga gtaaaacctg accatcccac 2160
 accctcaaat actaagtgcc cctgggtagt gatgtggagg ggccttctta ttaatgtgag 2220
 gaaatgcttg tgttataggt tgtggtgaga aacgctggtt acaaaactat atcaaagtaa 2280
 aaatgtatta atgcacagta aagacacctg gaaaaaaaat gccctttaat gctcacagaa 2340
 ggtctctccg aggggcagcc ccaccacctc cctgtttccc ttctctgatt tccacgtttt 2400
 tctgggcccga gatgcagcct ccctcccac ccctggctcc tccgccttgg ctctccgctg 2460
 tcgctttcat ccctcctcct catcagcccc ttgcagaact ccagggtggg gcttctgagt 2520
 ctcgctggca gtatgggctc cataagtctt gctggacacc gaaattaagt tctgcagggtg 2580
 ccgtctccag aatccccagc acagatagac aaaccacat ctcagggggtg ggggggtgcag 2640
 acctgcccc agnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 2700
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 2760
 ttatatgtct caccaatgtc aagggaacc agaactggat agcagttgaa acacatattt 2820
 tgttcgggac tattgtaata ggggaaaaaa gatttttagta tagacctggg ctcaactctc 2880
 aatgtggcac aggcaagtgg ggatttagat ctgaggagca gggcggggctc agtgggtgga 2940
 aaattactgg cacgaaacac ctgtctggag gattctggct aaaccagga aacaggaagc 3000
 ttgctgaggg caggcagggt tagcagacat cgctggggg tggcggagge tgagaaccct 3060
 acccaggtaa aatgaagctt gctgacggca gacagggtta gcagacacgg cctggagggtg 3120
 gcagaggcta aggaacctac ccaggtaaaa cgaagcttgc tgacggcaga cagggttagc 3180
 agacacggcc tggaggtggc agaggtctaa gaacctacca aggtaaaatg aagcttctgt 3240

55
60
65

ES 2 796 556 T3

5 aaggcagcca ggggtgagcag atattgcctg ggggtggcgg aaactgagga ccctaccag 3300
gtaaaaggaa gcctgctgaa ggcagcagg gtgagcagac atgacctgtg ggtagcagag 3360
gctgaggact ctaccaggt aacaggaatc ttgcttaagg caggcaagggt gagcagacat 3420
cgcctggggg tggcggaggg tgaggactct accagataa caggaatctt gctgcccggca 3480
gccaggggtga gcagacgtcg cctgggggtg gtggaagctg aggaccctac ccaggtaaaa 3540
ggaagcttgc tgaaggcagg caaggtaagc agacatcgcc tgggggtggc ggaggtgag 3600
gaccctgatc agatatgggg ggatggaggg ttcttgccaa actgacttag cagagttctt 3660
10 gctgaatctg gattttataa ggcagaatgc agatgagcct gtgagaagggt tctgaagccg 3720
gactacagtt tgggcaagca aacaatcttg tcatggattc agtcatataa ataagggtca 3780
cccagcccag gggaggtgccc ccaccccac tgttccctct ccctcccac actgagtcgg 3840
aacctttcag gctttgcccc ctccacacac tccaaattta ttcttctact cctctcctg 3900
caggtaccag actccggcca ccagcgtt accctgggact gctgggctc tgccccgtg 3960
ggacctgtcc tccaggaaac aaggccagac acaggagggc agggaggact ctctccagg 4020
15 gccggtgccc cgtctcttca gcccctggc acttgactta ggcagagcct acagaccct 4080
caccctgatc attagggcca ccaggggtg gtccccctca tcccattagc catcaccgc 4140
attcaacagag gtctcggact gaggctggca gggggagcac catgacccaa gatcagaacc 4200
ctgttgtctg tgcctctgga gaggtggggg caggagctga gggaggggtt ggtgaggag 4260
gggagaagat gcagtagcag gagcagatgc tggcagtag agacaaactt ttatgacct 4320
20 tgcttctga cctttgcttc tggccactgc tccaaactaaa acagaatgac ccctctggg 4380
aacagggctt cctatgggct gggaaagcat gagccccac agtgtggcta tgcaggggag 4440
tgaggaccag gtgggggag atggctgggg gtcacagagc tgggctaagc ttcagaggga 4500
agtggccctc gggaggggga atggctgggg ttaagaccct gggttccca gccccaaaa 4560
cagaagttaga attagggaga aaggaccccc aagaccaagg acggcaccta tcagaggagc 4620
25 tctccacggg caggaggtgt cccaggggtga ggggtggccag gacaggtcta gggaaatgca 4680
ggtggagcag gaccagaga tggattggag atgcctggagg ggaggcttcc tagcgggagc 4740
ggagacaggc actgcagaca agtgtcagcg ggaggggctc tgggtgggga agaagactgg 4800
gacttggagg aagacctctc cagggaagaag ggagggaggg gaaggagaag gggaggaagt 4860
gggagggaga gagtgtcat cctggaagcc acagcctcgg agagaacttt ctagaaggaa 4920
ggcatgacca tcagtgtccc aggatgtcga gaggccagga aaggtgaggc ctcaaggcgc 4980
30 catggggttg tgggtacccc aagatcactg ggcacagagc agggatggct gggggtgga 5040
gggagggggc gcgggctgag gtcttagggc cccaaagcca ggtgtgatgt gctctaggg 5100
ggagtggaga aggggagaat gtccctctga gcgtgcctct tggggaagge aggggttctg 5160
gctggggctt ctccactccc aggaaaggag gtggtgtgga aggagcgggt gggacggag 5220
agagagcggc ccgcccggc aggaccagca ggtgggggag cagggtcagc gctgctggg 5280
35 gggccttagc cgcacaggac tggccagaga ccggggatgt ggcacagaaa ggcctaggg 5340
gcaccccagg gaccgcccct cgggtccacc catgtcacc atgttggccc ctactccagc 5400
ccccgtctgc tctgcagggg aaggaaccgg gagcctcggg gggggcagc gggggtgtcg 5460
gtctttccag aaaatcaggc aggcctcagg aaagaagggg cgagaaccgg gggagcggg 5520
40 aggaaagggg cgagggggnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnccgctcc cagggctcc 5580
cctccgggga ctgggaacca ccgagccac caoctgctgg gccagggctc gcgggctcag 5640
gggtctgcag gattagggtc tgcggaacca ggacccgtgg gacaaaggtc tgtggggcgc 5700
gggtccgagg ggtggaattc agcgcgcga gtctgcgat ggcggggta cgaggcgtc 5760
cctgcgcagg gtggcagga ccggaagctc ccgggagctg cgcgggaggc ggcggggac 5820
cctccggtgc cgtcccacc ccgcccggcc gcccccagc ccgcccctcc ccccccctc 5880
cgcctcgtc gcccccggaa agtttgcacc gaccccgatc tggcagcgc gccgaagaca 5940
45 gcggtcaccg gcgcccggcc cgagcgcgcc cagaggacgg cggggagcca agccagccc 6000
cgagcagcgc cgcgcggtga gcacctgggc cgcggacccg aggggacgtt ggggagtcga 6060
cccgggtggg acagagaccg cggggcgggc gcggcggggc cgggggcgcg gggagcggg 6120
agccggccgg gcggtctccg gggctccgggc tgggtgcctc ctcagtcctc tcagacacc 6180
cgttcccctc ccccgtctc gagaccaacc ggtcctgac cgtcgggag gtcagggtg 6240
50 ctacgcccct ccccgtctc ctggtcctgg ggggcgcggc tgggggcggg ggtgtcgtg 6300
gccgctggc gccctgoggc ggccacactg cagcggccac actcccact cagggcccgc 6360
ggcccgcggc ccctggggag cgcacaaagc gccgcggag cgtcccagc gcgcgggtc 6420
tcaccagcgc tgtctcccct cgggtgggtc ctgcccagc gactgcccgg tggcaccgc 6480
gcggcccagg atggggtgag ggggtctgc gcccccctg gccgctctc tcccgccc 6540
cactctgggc actttgacc cggcaagcgg gtactgccc tgcccggctc cggcccccc 6600
ggcggccccc caccggccc actcggccc cgggcttatg ctccgactct gaaccgactg 6660
accocggccc cctcggggc cgcctcctcc aaggaccggc cagggctgct ctctgccc 6720
55 ggtattgggg acatcagggt tgggggtctc ggggtcaccc acgctgccc cccccccag 6780
gggtgagggc gcagggatag ggctttgtca acagcctgtg gccctgatc ccccccgt 6840
gcctgacct tccactacct tctctggttt cacaaaaaca tccggctcc catcccggg 6900
ctctcaaag cgtctgagag gcccttggc gacgcccctg gagcccctg gcttctgg 6960
60 accagtggcc gctccacca tccctggggc ccagctccag gtctgcccgt ccctcagcgc 7020

60

65

ES 2 796 556 T3

5	ccccagtg	gaatcggg	agcctgac	agccaggag	gccaagagt	cacgtgtt	7080
	gccagggag	acatgggac	ggacacggg	tgccagcc	gcaaagcgg	cggggagtg	7140
	gagctcag	ggcctaag	cctggtggt	gctggtg	cccggcagg	agctgtgga	7200
	gggaggaag	gggtggcat	cggtgggg	ctagagaag	cgggcaggg	acctcggg	7260
	ccccccatt	gggcacct	ggaaccccc	acattggg	cctcgggaa	cctccatt	7320
	ggcacctcg	gaaccccc	cattgggg	ctcgggaa	cccgattg	gcacctcgg	7380
10	aacctccca	ttgggcact	cggaacccc	cctattggg	acctcggga	ccccacatt	7440
	gggcacct	ggaaccccc	ctattggg	ccttgggaa	ccctcccta	attctcag	7500
	gactccaag	cctgagaag	agcttgg	cctggact	gaaggtgg	ggtggggt	7560
	ctgggtgg	gtcccact	ccagctgt	cgccggaag	gtaatacgg	gcactgtgg	7620
	cccggggag	cccagtg	agctccac	ctgggag	ctgtccact	cttcagta	7680
	caaacatga	tcttggg	accgggg	gggggtg	gtgtctc	tcggggg	7740
15	gggtgggtg	agatcaac	aggagcct	cttcttcc	tcaggctg	gtcacctc	7800
	gggtgggtg	agggtccca	cttgggaa	taaatcgt	tcocctg	aggaccac	7860
	cagcctcag	cctgctct	aggccag	ctctcatg	tgctcag	gaaattg	7920
	ccccccgg	tcacccc	cctgttgg	tgaggagt	gagtctcc	acccatag	7980
	gaccaccac	ccgcagg	cgaggag	tcacactt	gcacctc	cctcacta	8040
20	agagaccag	tgagaa	gtggag	cacctct	attcagag	cctgacct	8100
	agggatcc	gactaggg	gcctatgg	gagcccac	gtggcct	gatgctg	8160
	tgtcgggg	atcctcc	atccccag	ccaccttc	aacctct	tgaggct	8220
	gggacacag	gccccact	tgggtcct	ctgtttca	gaaaggc	ggggact	8280
	cagccaacc	ctcctcgg	tcgtgggt	ctccagact	gctcccg	tggaaggt	8340
	ggcctggca	cgcgagg	tcagtgt	aggcact	ttggggg	ctcccagt	8400
25	ctctagagt	aacatgac	gcacgaat	gctcctgt	ctctggc	gttgggg	8460
	agccaggct	ggccacg	ggcttaag	ggctgtc	ttgccagg	agctcct	8520
	tgggtggt	tcccccag	gtgagcac	gtccccca	ccccact	gagggcca	8580
	ggcagggaa	agctcatt	ccagtgt	tctcctgt	cccccg	catctcc	8640
	atccccct	ctccagct	cccttgt	tctcccc	ccctgcc	agccccag	8700
	ctcccctg	cccctgag	tgcccact	gcagtgc	tcgtccag	cccctct	8760
30	ttgggggtg	acacagt	gaggggg	tcttctgt	cctcacc	cccggct	8820
	tggccggag	cgcaccag	agtggcag	gatggg	tttgatc	atcaggg	8880
	ataaggccc	ttgcgtg	ccagagct	ggagccaaa	actgccc	ctccccac	8940
	cgctgccc	tgtctccc	agggagag	ccctact	tggtcct	gccccag	9000
	caagctgca	tgctgct	cctggctc	gaactggg	tcagcgac	acggctc	9060
35	cctcccat	gcccctac	gagcccag	tccaaggg	gcggttgg	gctcttag	9120
	agtctgtg	gcaggtgc	gtccctgt	ttcagct	acactg	gggcatct	9180
	ggccccgt	gcggggc	cctgggtg	gctggccc	cgcggg	cccagcc	9240
	actcggagg	ggctaaa	caggctgt	cgtggcag	agcagtc	gcctccc	9300
	aaaacctct	ctccagct	agccttgc	catctc	cccctct	cggtctc	9360
	ctggcactg	ctccagct	gctggcct	catctg	gccatcc	cacacct	9420
40	attccatt	agggtgccc	aaagaag	ccgtaac	ccggggg	atagccag	9480
	actcgcgg	ccccgcac	gcagtg	ccacagga	accctcc	cttctccc	9540
	agaattcag	tggtgcag	actggg	gtagcaac	aaggccg	tgtgtag	9600
	ttgccaccc	gaactccc	ctcagat	ggctgtg	tggggac	gggctgt	9660
	tcccacag	ctggcagg	ccacgggg	tgtcctcc	accctgt	cccacct	9720
	gccagctc	cctccaa	gacgccgc	gtgtaacc	caaagg	tgccagc	9780
45	ctgtggc	ccatggg	caggaag	aaaccag	tgccagc	ccacagg	9840
	cctaggc	ccggtg	gcagggg	cacatgt	acagacc	gagtg	9900
	cccacac	tgccctg	cagctg	ccagccc	cactttg	gctgtg	9960
	tggggcca	tgatgga	tcaggcac	gccacct	cgcttgg	attgctc	10020
	gtcagc	caagccag	ttcccagg	ctaagaat	gtgagg	tggtgag	10080
	gcagccgg	gctgtca	gagggagg	gtcaccat	ggggagg	gtccccac	10140
50	caagagc	gggtcacc	gcaggaag	ggctgcc	agcaatg	cgagggg	10200
	tgcgacct	agagctg	gccagcc	cctgggtg	aagagtg	cctcctg	10260
	tctcctcc	cctatgc	tcttttt	ttttttt	tttgagc	agtctc	10320
	tgtcacc	gctggact	aatggcg	tctcgtc	ctgcaag	tgccctc	10380
	gttccat	ttctcgt	tcaagct	gagtagt	gactacag	gctgcc	10440
	acgcctg	aattttt	attttag	gacatgg	ttcactg	tagcagg	10500
55	ggtctca	tcagacct	gtgatcc	cccctgg	tcccagg	ctgggat	10560
	aggtgtg	caccacg	agcccc	tcctctt	tcctagg	cctgagg	10620
	agagggg	cttcaggg	ggacaccc	ctggccag	ggcccc	ctgtgct	10680
	tgcactcag	ctgccct	aggagct	acacccca	gcactgc	gccccag	10740
	tgcagcc	gccagat	ggaggcag	agctgcc	aggcatg	ccctgcc	10800
60							
65							

ES 2 796 556 T3

5 cacagcgacc cctgctgctg ttgctgctgc tgctggcctg ccaggtgagg actcacagca 10860
ccctcagcac ccaggggccc tccctgtgagg actgcacact gatggctctc tgtctgcctg 10920
cctgcctgcc tgcctgtctg cctgcctgtc tgtctgtctg cccgtctgcc tgcccactcg 10980
cctgtctgtc tgcctgtccg tctgtctgtc catctgtcca tctgcctatc catctgcctg 11040
cctgtctgcc tgtccgtctg cctgtctgtc tgccctgtcca tctgtccatc tgccatcca 11100
tctgcctgcc tgtctgtcgg cctgcctgcc tgccctgtctg tctgcctgcc gtctgtccgt 11160
10 ctgcctgtct gectgtccgt ctgcctgcc gtecgtctgc ctgtccgtct gectgcctgc 11220
ctgtctgtct gectgcctgt ctgcctgcc gtecgtctgc ctgtccgtct gectgcctgt 11280
ctgcctgcc gtctgcctgt ctgcccgtct gectgtctgt ctgcctgtcc gtctgcctgt 11340
ctgtccgtct gtccatctgc ctatccatct gectgcctat ctgtctgtcc gtctgcctgc 11400
ctgtctgtct gectgtctgc ctgtctgtct gectgtctgt ccactctgcc atccatctac 11460
ctgcctgcc gtctgcctgt ctgtctgtct gctctgtctgc ctgcctgtct gtctgtctgt 11520
ctgggtgctt gtgcatgtgt cccccagcca caggtccctt ccgctcaggt gatggacttc 11580
ctgtttgagat agtgggaagct ctacgggtgac cagtgtcacc acaacctgag cctgtgcctc 11640
cctcccacgg gtgagccccc cccccagagc ctttcagcct gtgcctggcc tcagcacttc 11700
ctgagttctc ttcatgggaa ggttccctggg tgcttatgca gcctttgagg accccgcca 11760
ggggccctgt cattcctcag gccccacca ccgtgggcag gtgaggaac gaggtaactg 11820
20 agccacagag ctggggactt gcctcagggc gcagagccag gaaataacag aacggggcc 11880
ttgcccacaga accggctgct gctgctgccc ccagggccag atgggtaata ccacctacag 11940
ccccgtggag ttttcagtg gacagacagt ccagggcgtg gaagctggga cccaggggcc 12000
tggggggct cgggtggaga gtgtatatca tggcctggac acttgggggt cagggagagg 12060
ataggctgg aggactcacc cgggaggcag tgccctgggt cggatgaggg aggcagccc 12120
cactgggcag agggggcag gtgtggcagc ctccattggg cagagggagc agatgtggca 12180
25 gccacaggtt tggcgatgca cctgggaagg atgaaaatgg cattgggggt cagccccag 12240
agagggaggt gctgagagaa ggtcacggag aatgggggac cccagtgtgg gtttggggca 12300
catttgagat ggggggtctc caaggggaagg tgtcctgcag agctgcaatt cagggctggg 12360
ctgggctgctc tagcggaggc tggccagggg gagggtgatg gtcaggtgag gaaggtggag 12420
gtcagatggg ggaggtggag gccaagtggg ggagggagca gccacggcca tgtcctgggc 12480
gaggtgacgg ccgagctcag gcttccagag agagagagaga ggccctgctga gggagcccc 12540
30 tctcccaccc tgcctgccc tgcctgtccc tgccctacc taccctgcag agtgctgtg 12600
caacagaacc ttcgacaagt attcctgctg gccggacacc cccgccaata ccacggcca 12660
catctcctgc cctgggtacc tgccttggca ccaaaaaggt acccatagag gggaggaa 12720
gtgggggggg cgggccagg gtggggctga cccagcctc ccccccacacc cccagtgca 12780
caccgcttcg gttcaagag atgcccggcc gacgctcagt gggctgctgg accccgggg 12840
35 cagccttggc gtgatgectc ccagtgccag atggatggcg aggagattga ggtccaggtc 12900
agtggggggc aggcaggcgc ggtggggctg gatgggaacg ggcatgggg cccctgcctg 12960
gccctcacag gccactgtaa ctgcgagaag gagggtggca agatgtacag cagcttccag 13020
gtccttgcac cagtgggcta cagcctgtcc ctggggggcc tgcctctgct cttggcctc 13080
ctggggggcc tcaggtagga ttccggcagc gcccgggggc gccgcagagg acagggagga 13140
ggacggggcg tgaactggct tgcacacagc aagctgcact gcaccgcaa tgccatccac 13200
40 gcgaactctg ttgctgctt cgtgctgaaa gccagctccg tgcctggtcat tgatgggctg 13260
ctcaggcccc gctacagcca gaaaattggc gacgacctca gtgtcagcac ctggctcag 13320
gatggagtga gccccctcg gccggcccag gcaggtgggt ggggtggcag ccaggcaggt 13380
ggccacgtag ccgcctcac actgcacctg taccaggcgg tggctggctg ccgtgtggcc 13440
gcggtgttca tgcaatatg catcgtggcc aactactgct ggctgctggt ggagggcctg 13500
45 tacctgcaca acctgctgg cctggccacc ctcccggaga ggagcttctt cagcctctac 13560
ctgggcatcg gctggggtga gtgggctggc atgagagggg gttaaaggcag gctgaccaag 13620
cctttgggac cacagctgct gccccccaca ggtgccccca tgcctgtctg cgtcccctgg 13680
gcagtggtca agtgtctgtt cgagaacgtc cagtgagtat gageggctgg acagcctggg 13740
gagggaccgg gggctgggg tgcggcgctc tggcctgagg cagggagggg ccggggatga 13800
gctgggtgcc tggggagggg gtcatttctg accttctccc ttcctttctt gagaccgaa 13860
50 ttagatcctg gcaaaatcg gacgggggtg ctgagggggc gaggggctgg gggctgtgcc 13920
ccagtatgtg agtggcctgg cctgcaggtg gctggaccag caatgacaac atgggcttct 13980
ggtggatcct cgggttcccc gtcttctgg ccatcctggt gaggaaatga agagccagga 14040
gcgcacccca ggccctcct ccttggcgt cctgaggctg cccagggaga cagcagcatc 14100
ctgtctgaga gcctgggag ggagccggca cccagacagg acaccaggac actggccag 14160
accctggaca ctgagccag ctgttctccc ctggctgtgt gcccaccagc cccagggcta 14220
55 tgtggcccag gcctatctt ctgcccag ccacctgcag gaggtcagg tggggccttc 14280
caagggcaca gactgttccc ctggggctcg ggatgcccct gactcgcacc cttctcacac 14340
agatcaactt ctccatctt gtcgcctctg ttcagctgct cgtggccaag ctgcgggca 14400
ggcagatgca ccacacagac tacaagttcc ggtgggtgct gggcagctg gcgtctcag 14460
acctggagac cctcagggcc agagggcagc tgggggtggg gactccaagc tccacgtgga 14520
60 tgggtgcgggc cgaggggtgg ggcgggtgggt gactcagggc ctgcctctgc aggctggcca 14580

65

ES 2 796 556 T3

5 agtccacgct gaccctcatc cctctgctgg gcgtccacga agtggctctc gccttcgtga 14640
 cggacgagca cgcccaggcc accctgcgct ccgccaaagt cttctctcgac ctcttcctca 14700
 gctccttcca ggtgccccgc cgcccgcggy ctcccccgcc cggggcgagc tgtgccaccc 14760
 ctgaccaccc tgtctctcca gggcctgctg gtggctgtcc tctactgctt cctcaacaag 14820
 gaggtagctg ggagtggggg catctgagac catcagcact ggccgtcggg gt.caggggca 14880
 gagagaggca cagggatgcc agccccacc ctgcccgggg gttggaacac gtggggccca 14940
 agcctttccc tccccctgct cttattgggt gcagttgcca tggcgctggg tgtcagggccc 15000
 10 ccaggacagg ttggcctcag ccccatcgct acggtgtcca ccgtgggggt ccccaggtgt 15060
 ctgcagactg ctttccgtgg cgatgctggg tggcatagct gtgccagca gggagcttgt 15120
 gtgcgtctgc acccctcaga gcggagactg ggcatctccg atgaggccca cagcaggtcc 15180
 cggtaggggt gagaggacag gcaggcccta ggactggcct gccccgtccc cctcccagg 15240
 tgcagtcgga gctgcccggc cgttggcacc gctggcgcct gggcaaagtg ctatgggagg 15300
 agcggaaacc cagcaaccac agggcctcat cttcggcccgg ccacggccct cccagcaagg 15360
 15 agctgcagtt tgggaggggt ggtggcagcc aggattcatc tgcggagacc cctctggctg 15420
 gtggcctccc tagattggct gagagccct tctgaacct gctgggaccc cagctagggc 15480
 tggactctgg caccagagg gcgtcgctgg acaaccocaga actggaogcc cagctgaggc 15540
 tgggggctgg ggagccaaca gcagccccca cctaccoccc accccagtg tggctgtctg 15600
 cgagattggg cctcctctcc ctgcacctg cttgtccctg gtgcagaggt gagcagagga 15660
 20 agtccagggc gagtggggg ctgtgcccgt aactgcgtgc cagtgteccc acgtatctcg 15720
 gcacgtccca tgtgcattga aatgtcctcc aacaataaag agctcaagtg gtcaccgtgc 15780
 atgtcctgga aagcagggtc ggaatgtctg gggccgaagc agtgggggat ggaacagcgg 15840
 tgggtggtca gcgccagtgc gggctgttga agggtecccc tgctgtocca gttcactcag 15900
 agttggcact ggaaccccgg aggatcccga aggcagccag cctgtgccca tctgagcagg 15960
 25 tccctggccac cttcccctcc tggttctggc gggcagtcct cctggaogct tgggccaaca 16020
 gagggtcacc attcaccagc agagacgtga ggggcacagt ggctaaggcg gcatgaggca 16080
 tcacagtcct ctgaccgacc ccatacagc tggattcacc cgaggcgctc ttctccctgg 16140
 agcccgtaga gacactggca cctggctcat cggcccggcc ttctctgtag cctcctggcc 16200
 tccgtttcat ctcagctcca gcccctcgg gcaatttaca ggccacgtag cagattgaag 16260
 cgggaagaaa tgggctgaa cattgcccgg ggtccaggcg acggaggagg gcaggttgc 16320
 30 caacttctgc acaggaccog ggtgcccga cacacacgcc agtctctgtg ccacacagag 16380
 ccagtcggga tacgccagt cctgtcccac acagagaggt ccggcctacg ccagctctcg 16440
 tgccacacag agaggtccgg cctacgccag tccctcgtgcc acacagagag gtcgggcta 16500
 cgccagtcct cgtgccacac agagaggtcc ggcctacgcc agtctctgtg ccacacagag 16560
 aggtccggcc tacgccagtc cttctgccc ctctgtgggg gtggggccc tgcttgccc 16620
 ccagggaaga ccaggaaaga gctgcctcct gcctgctgga cacaggaggt gcttcagggt 16680
 35 ggggtctccc attgtgtggg gcccaacctg agtctaaggg cccagggacc acacagcggg 16740
 ggtggagaca aattcagggt agaagctgtg agggcctgt ggtcagcccc ccgggggggtc 16800
 cctgcagcag gcaactgtg acctaactgag gtgtgtgcat gggctgggga aggagccagt 16860
 caggtccccc tgctctgagg aactgctgct gggcctcggg gggccctagg ggaaggggtg 16920
 ctcacagccc ctgcctgggc cacgtgggct ggagccgctc aggcagagcc ggactaattg 16980
 gggcaaatga ggggacagga ggcctctgag gaaaggtaaa tagaattact caccgccag 17040
 40 gcaactgggg cctcctgggg gggccctcac cctgccaccc accacagggc ctgcatgagc 17100
 cagggaggga agtgagctga ttaggcaagg ctggaccctt ctggggccct ggggttctg 17160
 tgattgggac ggcaaggcca ggagacggtc cctgagctg cacctgctgg aggcctgtga 17220
 tctcagacct taaggcttca ggcagctct acgcccctcc ggcctcaggt cctgctctc 17280
 ctctgagccc tggatgccc ggtgcctgtg tgggcacgag gctgctccga gtcagcac 17340
 ggaggtggac attctcctc atgccagctg agctcagggc tggtgactgc cctggggaaa 17400
 45 ctgccctca cctgggacct cctgacagcc ctcccattc ccgagtcctt ctgccctgt 17460
 cctctttcac ctctgtccc cctcatccc taagggaact ggagcaggct ggtggagttg 17520
 ggtggagttg gggactggca gggggtggac tcaccagggc aataaacact ggcctaacc 17580
 aggcagtcct gcaggcaggt aggtggagg actgttttt ttctttttg gagatagagt 17640
 ctcaactctg tgccaagt ggagtgcagt ggcattgatc tggctcactg caaactccac 17700
 ctcccaggtt catgtgattc tctgcctcag cctcccaggt agctgggatt ataggcgtgt 17760
 50 gccacgacac ctggctaatt ttttttttt acggagtctt actctogttg 17820
 cccaggtcgg agctcaatgg cgcgatctca gctaccgca acctccgct cccagttca 17880
 agcgattctc ctgccttagc ctccctagta gctgggatta caggcaggta tgtgatgcc 17940
 ggcattccaa aggggtatct gcaagagttg ggtgctgtgt gtgcattggc gggaggaaga 18000
 tgactttgat accctggaat ctggtgtctg tggacacaaa aataactact aaatgagagt 18060
 55 aggagaccagg aaaaaggaa acatgaacta catgaaggac caaatctagg agagtcaaga 18120
 gtgcgtcaca ggaatagggg acctgagcc agacagaagg ctacagagag acaccctcaa 18180
 ggggatgaaa gggattgagt gcaactaat ttagaggaga gagttcagga cttgattagt 18240
 gactagtaca tagaaaacta acaaatgag gctgggtgca gtggctcatg cctgtaatcc 18300
 cagcactttg gggggccaag gcgggcgaat cacctgaggt caggagttcg agaccagcct 18360

60

65

ES 2 796 556 T3

5 ggccaacatg gtgaaacctc gtctctactg aaaatacaaa aattagccgg gcgtgggtggc 18420
 gggcgccctgt agtcccagct acttggggagc ctgaggcagg agaatcgctt gaacctggga 18480
 ggcggaggct gctgtgagcc aagatgggtgc cattgcactc caccctgggt gacagagcaa 18540
 gactccgtct caaaaaaaaa aaaaaagaaa gaaaaaacca agcaaatgaa aaaagaaggc 18600
 aattaataat tccaaagaaa agaaaaattht gggcagaaaa gaacaaaaca agcagaattht 18660
 10 accatgactc agttctgaat acaaacacag acatcataat gtaaacacca aactgatgac 18720
 aaccagaatc atgggagaaa aaagatctag ggagggtggt ggacgggaat atcacgtatg 18780
 tactgggggt aggggagaga acaaaatggg aaaaaatcaag aataattcac gttagaataa 18840
 aaaatacaga gcaaaattht aaaatgcaaa gaatgagggt aagagttcaa agtgggtcac 18900
 tggggccggg gcgcgggtggc tcacgcctgt gatcccagca ctctgggagg ctgaggcggg 18960
 cggatcacia ggcaggaggt ttgagaccat cctggctaac aaggagaaac cccatctcta 19020
 15 ctaaaaatta gccaggcgtg gtgggtggcg cctgtagtcc cagctactcg ggaggctgag 19080
 gcaggagaat ggcgtgaacc caggaggcgc agcttgcagt gagccgagat cgcgccactg 19140
 cactccagct tgggcaacag agtgagactc cgcctcaaac aaaacaaaaa 19200
 aacaaagtgg tcatctctag gcaagggtgg tgggagatgg ctagggtctc aggtccacta 19260
 cgtgagctgg ctgagcctat ccccagacac cctgcactca ctgagcccgg ggtcctcccc 19320
 20 ctgcaactcac tcagcccgg gtocctccct gcaactcactc agcccgggt cctcccctg 19380
 cactcactca gcccgggtc ctcccctgcc tgctctttct ctgaccctgc cctccactgt 19440
 toctttttct tctttctctc cctggttgtt ccaggaacca ggaccacc tcatthcttc 19500
 ttgatcaatc tttaaaaacc agcagtgtc agctaaactc tcatctatct cccccgact 19560
 gggactctgc tgaatccacg ctttagacc agctatcagc tcggcatgta cagctggatg 19620
 25 tccacaccga gctgctcacc ctgtcccacg cttctctctc ccactgtcca ctgcaaacg 19680
 ctctaacag gaccctgct gctaccccgg accctgcaac ccattcccac acagcagcca 19740
 gatgcttga caccggaagt ctctatgaa tccgatgagg cctctgcacc acacctcatt 19800
 ttacagaagt acaggggaaa caggggtctg ttgacaccac agagatgcag ctggccaaaag 19860
 gcagaatgtg ggtacacga ctgtcaaacg ccaggggtcc ttacacgaat ggtggaaaaa 19920
 gaggggcatg ttacggatgg aggtcggga cacatgggag ccgccttccc atgctgcccag 19980
 30 caaccacca ggaacctatt a 20001

<210> 3
 <211> 10000
 35 <212> ADN
 <213> Macaca mulatta

<400> 3

40 tgctcctact ccgaaccgac cgaccagacc ctctcggcgc ccgcactctc caaggaccgg 60
 ccagggtctgc tttctgccc tgcatttggg cgcagtgggg ttgggggggtc gggggcgcacc 120
 caggccggca cccagcctg ccccgcccc acggagtggg ggctcagggc tttgtcaaca 180
 gcctgtggcc cctgatccc cctcgggtgc ctgaccttcc gctgccttct ctggtttcac 240
 aaaaacatcc cggctccgat gccggagctc ctcaaagcgt ctgagaggcc ccttgccgac 300
 45 gcctggggag ccccgctgcc ttctgaacc agtggccgct gcacccatcc tggggggcca 360
 gctccaggtc tgcagctccc tcagccacc ccagtgggaa ttggtggagc ctgagggagc 420
 catgagcaca caagagtcc gtgttctgcc agggcagaca tgggacagga caggggggtc 480
 cagccctgca aaggggcccagg ggcagtggag ctcaggtggc cccaaggcct ggtgggtggct 540
 ggtgtggccc ggcagcggc tgtgggagg aggaaggggg tgggtgtcag tggaggggct 600
 aggaaaggcg ggcagggcac ctcgggagac cccctcattg ggcacctcgg gaaccccccc 660
 50 ggcattgggc acctcgggaa cccccgcac tgggaacctc gggaaacccc cgcattgggc 720
 acctcgggaa ccccccccg cattgggcac ctcgggaaac cccccccgca ttgggcacct 780
 ggggaacccc ccccgcttgc ggcacctcgg gaaccccccc cgcattgggc acctcgggaa 840
 cccctcccct aattcttatg actccaaggc ctgagaagga gcttgggtcac ctggactgtg 900
 aaggccggag gtgggtctc ttgtgggtgg cccaacctac cagcagcgtc gccagcaggg 960
 55 taataagggg caagtgcac atggggagcc ccgggtggca cctccacagc tgggagtttc 1020
 tgtccacttc ttcagtcaac agacattgat cccgggctga cgggggccc ggggtgtcag 1080
 tgtctcctgt caggggagag ggtcgggtga gatcatcaga ggagcctccc tcttcccctt 1140
 caggctgggt tcacctcag tgacggggca gggtcctat ttgggaagtt aatcatcat 1200
 ccccgctccc ggaccacagc ggtctcagcc ttgctctcta ggccaggtg tctcctgggt 1260
 gctcagctgg aattggccc atccccccgg cttcaccac ccctgctggg atgagggct 1320
 60 ggagtctccc taccacatg ggaccaccg cccgcagggg acagaggacc cccacactcc 1380
 tacacctcct gcctcactat cagagaccca gtggagaatt gccccccacc ccacctctt 1440
 tattcagagg ccctgacccc taaggatcca ggactagggg tgccctgatg gggagcccac 1500
 ctgtggcctg tggatgctga gctgttaggg gaatcctcca ggatccgcag cccacttctc 1560
 ccaaccttct gttgagattg ggggggacac agagagcccc actccctctt cctcccact 1620
 65 cctgggcccct gactgcttca aagaaaggcc tgggggactg ggcagcccgc cctcctca 1680
 gctcactggg gtctccagac tgcattgcac gctggaaggt ggggccccgg cactcgagga 1740

ES 2 796 556 T3

5 gcttgtgtgt ggaggcgcca tctcctctcg cactggcttg ggggtgctcc cagtggctct 1800
 ggggtcaaca tggcagtcac tgaatggctc ctgtttctct ggcagagtg ggcagagcc 1860
 agccttggcc acgctgggct tcaagggctc gtcattttgc ccaggagct cctggctgag 1920
 ctgtcctctc ccagggtga gcacgcagc ccctaacccc cactgcaggg cccccaggca 1980
 gggaacagct tatcagccag tgcctctctc ccttggcccc tgccctgcat tccaccatcc 2040
 gcctgctccc agctgcogtt tgtctttctc ccogtccctt gccagagcc ccaggcctcc 2100
 cctgcacccc tgagcctgcc cacctagcag tgccctcctt ccagggcccc tccctcaggg 2160
 10 cccctcgggg ttgggggtgc acacagcagg gagaggcggc tccctgctget cctcaccag 2220
 cccagctcag tggccagagc cgcccagggc agtggcagca gatggggctg tttgatcaga 2280
 atcaggaaaa ataaggcccc ttgggtgacc ccagagctgg ggaogccaaa actgctcctc 2340
 ctccccacc cgctgctgc tttctccacc agggagagcc cctccctac tccgtgggtc 2400
 cttcgcacca gtgctaagcc tgcctggctg ctccctggc tcagggactg gggatcagt 2460
 atgcatgggt cctgctccc atcggcccc acctgagccc agggccaag ggtgctggt 2520
 15 ggaagccctc tagcaggtt tgacgcaggt gctgtcctt atcattcage tgtcaccctg 2580
 tttggctcat ctacggcctt ggagccccag gtgggtgctg ccccaagcag 2640
 gctcaaccag cagctgctg gaggaggota aaatccaggc tgtccatgg cagccagctg 2700
 tccagcccgg cccggaaatc ctccgctcca gcggcagcct tcgccctctt cctcaccctt 2760
 ctccccggct tcttctggc actgccttcc agctggccgg ccctccatct gcccaagcct 2820
 20 ccatccacac ctcttattcc gtttgagggt gccccaaaga agagctcatc tcggggctgg 2880
 ggctcacagc cagcacaggg gccccacggg aagaccctcc ctgcttctcc cacagaattc 2940
 agttgggtgca gaaactaggg tctgcagcaa tgaaaggccg atttgtggag ctgttcccgc 3000
 cccaaactcc cagctcagat gctggctctg gctgggacc aggtgctgtg actccgcag 3060
 ccctggcaga caccacaggg gctgtcctcc ccaccctgtg ccccgactct aggcagctc 3120
 ctctccgag ccggcgtgg cagtgctaat ctcaaaggaa tgtgcagcca gcctgtagt 3180
 25 tcccatggga cccaggaagc ccaaccgagc cttgcatggc acccatgggg cactagggca 3240
 ccacagtgcc gggcaggggg atgcatgtga cacagatccc cgagtgtggg tcccacaca 3300
 ttggcctggc acagctgcaa gccagcccag ccactttgct caccgtggca ctggggccaa 3360
 gtgatggaag gtctgggcac cgccaccctc aggtcggca cgttggctca ggtcagcctg 3420
 gcaagccaac tttccaggg gctaagaatg ggtgaggacc ggaaccgacg ggggctgtca 3480
 actgagggag gaggtcagca tctggggagg ctggctccct gccaaagaca ttgggtcacc 3540
 30 cggcaggagg gtgctgcca acagcactga gacaaggggc tctgggaccc tcagagctgc 3600
 cagccagcca gcgtgggtg gcaggaaagc cagctccact tcctactgga aaggagtgc 3660
 tccctgctgg gtctcctccc tcccagctcc ctctttttt ttttttttt tttttttgag 3720
 acagtctcac tctgtctgcc agtctggagt gcagtggctc cgtctggct cattacaag 3780
 tctgctccc gggttcacgc cattctcctg cctcagactc ccgagtaact gggactacag 3840
 35 gcgccacta ccatgcccgg ctaattttt tatttttagt agagacatgg tttcaactat 3900
 tttagccagg atggtctcga tctcctgacc ttgtgatctg cctgccttga cctcccaaag 3960
 tttcgggatt acaggtgtga gccaccatgc ccagccccc gctccctctt tatccgtagg 4020
 actctgaggtc tgagaggggg agcttaaggg gagggccccc ccaactggca ggtctccc 4080
 ggctctgctg ctctgccact cagctgccct cggaggaggg cgcacacca ccaggactgc 4140
 attgcccag ccgtgcagcc cctgccagat gtgggaggca gctagctgcc cagaggcatg 4200
 40 cccccctgtc agccacgtgc accctgcta ctgttgctgc tgctgctggc ctgccagggt 4260
 aggactcaca gcaccctcag caccaggggg ccctcctgag gactgcacac tgatggttct 4320
 ctgctgctcc gcctgctgc ctggctgtcc gtctgctat ctgtccatct gcctgctgt 4380
 ccatctgtct gtctgctat ctgtctgtct gctctgctgt ctgcctgctt gcctatctgt 4440
 ccgtctgtct gtctgtctgc ctatctgtct gtctttctgc ctgtctgctt gtctgctat 4500
 45 ttgtctgtct gtctgctgt ctgcctattt ctctgctat ctgtctgctt gtctgctat 4560
 ttgtctgtct gtctgtctgc ctatttctct gcctatctgc ctgctgtctt gcctgctgt 4620
 ctgctgtct gcctgctgt ctgcctgctt gctgtatgg ttgcttgtgc atgtgtccc 4680
 ctgcctatct gtctgtccat ctgcctgctt gctgtatgg ttgcttgtgc atgtgtccc 4740
 cagccacagg cccctccgc tcaggtgatg gacttccgtt ttgagaagtg gaaacttac 4800
 ggtgaccagt gtcaccacaa cctgagcctg ctgccccctc ccacgggtga gccccacce 4860
 50 agagcctttc agcctgtgcc tggcctcagc atttctgag ctcttcatgg gaaggttcct 4920
 ggggtgcttat gcagcccttg aggatccgc caagggggcc caccacctca gccccacca 4980
 ccatggggcag gtgacgtaac caggtagctg agccacagag ctggggactt gcctaaggct 5040
 gcagagccag gaaataacag aacagtggaa ttgctgcgtg tcccaggcc cagatgcgta 5100
 ataccgccta tagcccatg gagttttcag tgggcagaca gtgccagggc gtgggaggtg 5160
 ggaccacagag ggtcagcaga ggacacaggg ctgggaaggc ttgggtggag agtgcatatc 5220
 55 atgctctgga cacttgggggt gcaggcagag gctagggtcg gaggacttac ctgggagcca 5280
 gtgccacgggt tcagacaggg gaggcagcct ccaactgggca gaggggaccg ggtgtggcag 5340
 ccacaggttt ggcaagtgcac ctgggatgga tgaaaatggc attgggggtt agccccaga 5400
 gagggaggta ctgocagaaa gtcacggaga atgggggacc ccagtgtggg tttgggggac 5460
 atctgagatg ggggttctct gagtgaagggt gctctgcaga gctggaactc aggatgggc 5520

60

65

ES 2 796 556 T3

5 tgggagtgct aggggaggct ggcccagggg agatggatgg tcaggtgagg aagttggagg 5580
 tcagattggg gaggtggagg tcaggtgggg gaggaagcag cccaggtcat gtccctgggg 5640
 gaggtgacag ctgagctcag gcctccagag agaggttaaga ggctgtga gggagcccct 5700
 tctcccacc tgcctgcag agctggtctg taacagaacc ttcgacaagt attcctgctg 5760
 gccagacacc cctgccaaata ccacggccaa catctcctgc ccctggtagc tgccttgcca 5820
 ccacaaaggt acccatagag ggaaggaaca gtgggagggg caggcccagg ggtggcgctg 5880
 accccagcct ccccaaacac acgcagtgca acaccgcttc gtgtcaaga gatgcggggc 5940
 10 cgatggtcag tgggtgogtg gaccccgggg gcagccttgg cgtgacgcct ctcaagtcca 6000
 gatggacggc gaggagcttg aggtccaggt cagcggcggg caggcgggcg cgtggggct 6060
 ggatgggaat gggcacgggg gtccccgccc ggccctcaca ggccactgta actcgcagaa 6120
 ggagtggttg aagatgtaca gcagctcca ggtgatgtac acgggtggct acagcctgtc 6180
 cctggggggc ctgctcctcg ccttggccgt cctggggggc atcaggtagg atcccgcag 6240
 tggccggggc ggccgcagag ggcaggagg agggcgctcg ctgactggtc gtccccacag 6300
 15 caagctgcac tgcaccogca acgccatcca cgcgaacctg tttgtgtcct tctgtctgaa 6360
 ggcagctccc gtgctggtca tgcagggctc gctcaggacc cgtcacagcc agaagattgg 6420
 cgacgacctc agtgtcagca tctggctoag tgatggagt agccccctgt aggcggcccc 6480
 acacaggcgg gtgggcgggc agccaggcag gtggccatgt ggccacgctc aactgcacc 6540
 tgtgccaggc ggtggccggc tgcctgtgtg ccgctgtgtt catgcaatat ggcgtcgtgg 6600
 20 ccaactactg ctggctgctg tggagggccc tgtacctgca caacctgctg ggcctggcca 6660
 ccctcctga gaggagctt ttcagcctct acctgggcat cggtgggggt gaggggggcg 6720
 gcacgggaag gggtcggggc aggtgggcca agccttgaga ccacagctgc tgcccccac 6780
 aggtgocccc atgctgttca tcatcccctg ggtggtggtc aggtgtctgt tcgagaacat 6840
 ccagtggata tgagcggccg gcagggcccgg ggaaggggccc ggggggctgg ggtgtggagc 6900
 25 tctggcccga ggcaggagg ggcggggat gagcctggtg cccggggagg gtggtcattc 6960
 gtgaccttct ccctcctgtt cctgaggcct gaattagata ctggcaagat cgggacgggg 7020
 gtgctgaggc ctgaggggccc ggggtctgtg cccaglttg tgagtggccc ggcctgcag 7080
 gtgctggacc agcaatgaca acatgggctt ctggtggatc ctgcggttcc ccgtcttct 7140
 ggccatcctg gtgaggaaat gaagagcaag gaccgcacgc cagggccctc ctcccttggc 7200
 gtctctgaggc tgcccagga ggcagcatcc tgtctgggag ggccaggagg gactgtgcca 7260
 30 ccagacagga caccaggaca ctggccagca cctggggcac tgagccaggc tgcctctccc 7320
 tggctgggtg gccaccagcc ccagggctct gtgccagggc ctatctggct cccagacca 7380
 cctgcaggag ggtcaggtgg ggccttccaa gggcacagag ctgtcccctg gggctctggg 7440
 tgcccctgat tcgtgccctt ctcacataga tcaactctt catcttcatc cgcattgttc 7500
 acctgcttgt ggccaagctg cgggcggggg agatgcacca cacagactac aagttccggt 7560
 35 ggtgcccacg gtcggccggc gcctccggat ctggagacct tcagggcccag agggcagctg 7620
 ggtgggggga ctccaagctc cacgtggatg gtgcccggc agggcgaggg tgggtgtgta 7680
 ctgggctctc gcctctgtag actggccaag tccacactga cctcatccc cctgctgggt 7740
 gtccaogaag tggcttctgc ctctctgacg gacgagcacg cccagggcac cctgocctc 7800
 gccaaagctc tcttcgacct ctctccagc tccctccagg tgccctgccc cccgcgctc 7860
 ccccaccggg ggcgcagcat gccaccctg accaccgtct ctctccaggg cctgctgggt 7920
 gctgtcctct actgcttctc caacaaggag gttaggtgca gtgggggctg ctgagaccat 7980
 40 cagccctggc cgtcagggtc aggggcagag agtggcacag ggatgccag cccaccctc 8040
 ctgaggggtt ggaacacatg tggcccagc cttttactgg gtgccgttg cccagcctg 8100
 gctgtcaggc cccaagaca ggttggcctc agccccattg ctagggtgtc cacagcgggg 8160
 gtcccagat gtctgcagac tgtgcttcc gtggcgatgc tgggtggcat agctgtgccc 8220
 agcaggggag ttgtgtogct ctgcaccctc cagagtggag accgggcatc tctgacgggg 8280
 45 cccaagcag gtcccgttg ggcggagagg acaggcagac cccaggactg gcctgcccc 8340
 cccccggccc caggtgcagt cgggaacttg gcggcatgg caccgctggc gcctgggcaa 8400
 agtgtgcag gaggagcggg gcaccagcaa ccacaaggcc ccactctgctc ctggccaagg 8460
 ccttctggc aagaagctgc agtctgggag ggtggtggc agccaggact catctgcgga 8520
 gatccccttg gctggtggcc tccctaggtt ggctgagagc cccttctcaa ctctgctggg 8580
 accccagcta gggctggact caggcaccta gagggcacog ctggacaacc cagaaccaga 8640
 50 cgcccagctg aggtggggg caggggagcc aaaagcagcc ccgcctatc cctaccccc 8700
 agtgtggcag tccgagagat ggggcctcct ctccctgcac ctgocctgtc cctggtgccc 8760
 gggcagcgtg aggtccag ggcagaggtt ggggctgtgc tgcgaactgc tcaccagtgt 8820
 ccccatggat gttggcacgt gctacatgcc tggagatgtc ctccaacaat aaagagctca 8880
 agtggtcacc gcgcatgtcc tggaaagcag ggctggaat gccggggcga agcagtgggg 8940
 atggaacagc agtgggtggt cagcggcagt gcgggtcgtt gaaagacccc tctgttccc 9000
 55 gttcacagag agttggtact ggaaccccag aggtaccga aggcagccag cctggtccc 9060
 tctgagcagg ccctggccac ctctccatcc tggttctgpc gggcatccc ctggacgctt 9120
 tggccaccag aggtccacca ttcaccagca gaaatgtgag gggcacagtg gctaagggag 9180
 catgaggcat cacagtcacc caaccaccc catcagcact ggattcacc agaggggtgc 9240
 tcctccctgg aggcctgag gacactggtt cctggctcac cagcccacc ttcctctgag 9300

60

65

ES 2 796 556 T3

5 cctcctggcc tccgcttcat ctcagctcca gccccctcgg gcaatttgca ggccacgtag 9360
 cagactgaag caggaagaaa tgggcctgaa cattgccacg ggtccagggtg acgaagcagt 9420
 gcaagttgcc caaactctgc acaggaccca cggcgtgccca cacagagagg tccagcctac 9480
 gccagtctc ctgccactgc atgggtggta ggtgcctgc ttgccagcca gggagcacca 9540
 ggaagagct gcctcctgca tgttggacac aggaggtgct tgaggggtgg gtctcccatt 9600
 gtctggggca caccctgaat ctaagggccc agggaccaca cagcaggggt ggagacaagt 9660
 10 ccaggggtga agcccatgag gggcctgtgg tcagtcctcg ggggtggtcct tatggtaggt 9720
 gctgtgagac ctgctgaagt gtgtgcatgg gctggggaag gagccagcca ggtgccctg 9780
 ctctgaggag ctgctgggag gtgccgctgg accctggggg aaggggtgct cacaggcccc 9840
 gcctgggcca cgtgggctgg agccgctcag gcagagccgg actaattggg gcaaatgagg 9900
 ggacaggagg cctctgagga aaggtaaata gaattactca cccaccaggc actggggccc 9960
 15 tcctgggggg gcctcacc ctcactcac cacagggcct 10000

<210> 4
 <211> 20
 <212> ADN

20 <213> Macaca mulatta

<400> 4

gcactttgtg gtccaagcc 20

25 <210> 5
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 5

35 gcaccccagc cgatgcc 17

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

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 6

agccctggcc ggtcctt 17

50 <210> 7
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 7

60 tcccgagggtg cccaatg 17

<210> 8
 <211> 17
 <212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

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

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

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 19
 agcatccaca ggccaca 17
 10
 <210> 20
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 20
 20 cagcatccac aggccac 17

 <210> 21
 <211> 17
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 30
 <400> 21
 ctgagcatcc acaggcc 17
 35
 <210> 22
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 22
 45 agccactggg agcacc 17

 <210> 23
 <211> 17
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 23
 55 ggctctgccc caactct 17

 <210> 24
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 24
 5 gtagcagcc atgcaggct 20
 <210> 25
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 25
 15 gacgagccat gcaggct 17
 <210> 26
 <211> 17
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 26
 tgagcagcca tgcaggc 17
 30 <210> 27
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 27
 40 gccaggtgag cagccat 17
 <210> 28
 <211> 17
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 50 <400> 28
 agggacaggc acctgcg 17
 <210> 29
 55 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 29
 65 gcctggatt tagcctc 17

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

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 35
 5 ggcagctgag tggcagagca 20

 <210> 36
 <211> 17
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 15 <400> 36

 gcatgcctct gggcagc 17
 20 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 37
 30 aggcacaggc tgaaggctc 20

 <210> 38
 <211> 17
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 40 <400> 38

 aggccaggca caggctg 17
 45 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 39

 gctgaggcca ggcacaggct 20
 55 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 40
 65

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

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5 <400> 46
 ggtccaggc catgata 17
 10 <210> 47
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 47
 20 aagtgccag gccatga 17
 <210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 30 <400> 48
 cccaaggtgc cag
 gccatga 20
 <210> 49
 35 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 49
 caaggtcca ggccatg 17
 45 <210> 50
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 50
 55 ccaagtgcc aggccat 17
 <210> 51
 <211> 17
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 65

<400> 51
 cccaagtgc caggcca 17

5 <210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 52

15 caccccaagt gtccaggcca 20
 <210> 53
 <211> 17
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 53
 cccaagtgt ccaggcc 17
 <210> 54
 30 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 54
 accccaagtg tccaggc 17
 40 <210> 55
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 55
 50 gcacccaag tgtccag 17
 <210> 56
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 60 <400> 56
 ccctgcaccc caagtgtcca 20

65 <210> 57

<211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 57
 10 aaactgtgg ctgccac 17
 <210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20 <400> 58
 gccaaacctg tggctgccac 20
 <210> 59
 25 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 59
 ggacaggctg tagccca 17
 35 <210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 60
 45 ggctcactcc atcactgagc 20
 <210> 61
 <211> 17
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55 <400> 61
 ccacctgcct ggctgcc 17
 <210> 62
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 62
 5 gtcaggtac aggccctcca 20
 <210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 63
 15 ggagggtggc caggcccagc 20
 <210> 64
 <211> 17
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 64
 ccagccgatg cccaggt 17
 30 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 65
 40 ggccagtgtc ctggtgcct 20
 <210> 66
 <211> 17
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 50 <400> 66
 gccaccagca ggccctg 17
 <210> 67
 55 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 67
 65 gggctgaggc caacctg 17

<210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 68
 10 gccaccacgc atgccacgg 20
 <210> 69
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20
 <400> 69
 ccctgctggg cacagctatg 20
 25 <210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 70
 35 cacaagctcc ctgctgggca 20
 <210> 71
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 45 <400> 71
 gagcgacaca agctccctgc 20
 <210> 72
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 72
 55 ggtgcagagc gacacaagct 20
 60 <210> 73
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 73
 5 ggctgccacc acccctc 17

 <210> 74
 <211> 17
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 15 <400> 74

 ctttattgtt ggaggac 17
 20 <210> 75
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 75
 30 ctctttattg ttggagg 17

 <210> 76
 <211> 17
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 40 <400> 76

 gctctttatt gttggag 17
 45 <210> 77
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 77

 agctctttat tgttga 17
 55 <210> 78
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 78
 65

gagctcttta ttgttg 17

5 <210> 79
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 79

acctggaagc tgctgtacat 20

15 <210> 80
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 80

25 gggcaatgca gtctctg 17

30 <210> 81
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 81

gaaggtgaca ccagcct 17

40 <210> 82
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 82

50 gctcagcatc cacaggc 17

55 <210> 83
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 83

65 tggatttag cctcctc 17

 <210> 84
 <211> 17
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5 <400> 84
 gccaaacctg tggctgc 17
 10 <210> 85
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 85
 20 gggttcccga ggtgcccaat g 21
 <210> 86
 <211> 16
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 30 <400> 86
 ggttcccgag gtgccc 16
 <210> 87
 35 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 87
 gggttcccga ggtgcc 16
 45 <210> 88
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 88
 55 gaggccaggc acaggct 17
 <210> 89
 <211> 17
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 65

<400> 89
 cggtccttgg aggatgc 17

5 <210> 90
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 90

15 gttcccgagg tgcccaatg 19
 <210> 91
 <211> 19
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 91
 ggttcccgag gtgccaat 19
 <210> 92
 30 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 92
 gggttcccga ggtgcccaa 19
 40 <210> 93
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 93
 50 ggttcccgag gtgcccaa 18
 <210> 94
 <211> 16
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 60 <400> 94
 gttcccgagg tgccca 16
 65 <210> 95

<211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 95
 10 gggttcccga ggtgccca 18
 <210> 96
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20 <400> 96
 gggttcccga ggtgcccaat a 21
 <210> 97
 25 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 97
 ccagctctgt ggctcag 17
 35 <210> 98
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 98
 45 cctggatttt agcctctcc 20
 <210> 99
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55 <400> 99
 tgggtctctg atagtgaggc 20
 60 <210> 100
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

ES 2 796 556 T3

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 100
 5 gctcagcatc cacaggccac 20
 <210> 101
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 15 <400> 101
 gccaaagcctg gctctgcccc 20
 <210> 102
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 102
 ctctttattg ttgaggaca 20
 30 <210> 103
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 103
 40 tctttattgt tggaggacat 20
 <210> 104
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 50 <400> 104
 ccacaggcca caggtgggct 20
 55 <210> 105
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 105
 65 agccaggtga gcagccatgc 20

<210> 106
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 10 <400> 106

 aagtgccag gccatgat 20

 <210> 107
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 107

 ccaagtgcc aggccatgat 20
 25
 <210> 108
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 108
 35
 accccaagtg tccaggccat 20

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

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 45
 <400> 109

 gcacccaag tgtccaggcc 20
 50
 <210> 110
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 110
 60 tgcacccaa ggtccaggc 20

 <210> 111
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5 <400> 111
 gcacatggga cgtgccgaca 20
 <210> 112
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 112
 gctctttatt gttggaggac 20
 20 <210> 113
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 113
 30 gagctcttta ttgtggagg 20
 <210> 114
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 40 <400> 114
 agctctttat tgtggagga 20
 45 <210> 115
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 115
 55 ggtcccgag gtgcccaatg 20
 <210> 116
 <211> 18
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 65 <400> 116

ES 2 796 556 T3

gacacccccg ccaatacc 18
 5 <210> 117
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Cebador
 <400> 117
 15 ccgcatctct tgaacacgaa 20
 <210> 118
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sonda
 <400> 118
 25 ttggcaccac aaagt 15
 <210> 119
 <211> 27
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 119
 gcgtttgctc ttctcttgc gttttt 27
 40 <210> 120
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 <400> 120
 50 atctcctgcc cctggtacct 20
 <210> 121
 <211> 18
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 121
 ggtccacgca cccactga 18
 65 <210> 122
 <211> 24

ES 2 796 556 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Sonda

<400> 122

10 accgcttcgt gtcaagaga tgcg 24

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 16 a 30 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende una parte que consiste de por lo menos 16 nucleobases contiguas complementarias a una parte de igual longitud de los nucleótidos 7267-7457 de la SEQ ID NO: 2.
2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde:
- (a) dicho compuesto consiste de un oligonucleótido modificado monocatenario, y/o
- (b) dicho oligonucleótido modificado es por lo menos un 96%, por lo menos un 97%, por lo menos un 98%, por lo menos un 99% o un 100% complementario a la SEQ ID NO: 2.
3. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos una parte de 16 nucleobases de la SEQ ID NO: 11 u 85, opcionalmente en donde dicha secuencia de nucleobases comprende la secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 11 o 85.
4. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que comprende una parte que consiste de por lo menos 17 nucleobases contiguas complementarias a una parte de igual longitud de los nucleótidos 7267-7283, 7270-7286, 7292-7308, 7295-7311, 7316-7332, 7319-7335, 7341-7357, 7344-7360, 7437-7453, 7365-7381, 7368-7384, 7389-7405, 7392-7408, 7416-7432, o 7440-7456 de la SEQ ID NO: 2, y en donde dicho oligonucleótido modificado es por lo menos un 96% complementario a la SEQ ID NO: 2.
5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde:
- (a) por lo menos un enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico modificado, opcionalmente en donde cada enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico de fosforotioato, o
- (b) por lo menos un nucleósido del oligonucleótido modificado comprende un azúcar modificado, opcionalmente en donde el por lo menos un azúcar modificado es un azúcar bicíclico.
6. El compuesto de la reivindicación 5, en donde:
- (a) cada uno del por lo menos un azúcar bicíclico comprende un puente 4'-CH(CH₃)-O-2' o un puente 4'-CH₂-N(R)-O-2' en donde R es, independientemente, H, alquilo C1-C12, o un grupo protector, o
- (b) por lo menos un azúcar modificado comprende un grupo 2'-O-metoxietilo.
7. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde por lo menos un nucleósido comprende una nucleobase modificada, opcionalmente en donde la nucleobase modificada es una 5-metilcitosina.
8. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el oligonucleótido modificado comprende:
- un segmento separador que consiste de desoxinucleósidos enlazados;
- un segmento de ala 5' que consiste de nucleósidos enlazados; y
- un segmento de ala 3' que consiste de nucleósidos enlazados;
- en donde el segmento separador se coloca 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.
9. El compuesto de la reivindicación 8, en donde el oligonucleótido modificado comprende:
- un segmento separador que consiste de diez desoxinucleósidos enlazados;
- un segmento de ala 5' que consiste de tres nucleósidos enlazados; y
- un segmento de ala 3' que consiste de cuatro nucleósidos enlazados;
- en donde el segmento separador se coloca entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo; y en donde cada enlace internucleosídico es un enlace de fosforotioato.
10. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el compuesto está en forma de una sal de sodio.
11. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el compuesto está en forma de una sal de potasio.

12. El compuesto de cualquier reivindicación anterior, en donde el compuesto antisentido está conjugado.

13. Una composición que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o una sal del mismo y por lo menos uno de un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

5 14. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o la composición de la reivindicación 13, para su uso en terapia.

10 15. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o la composición de la reivindicación 13, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad metabólica en un humano, opcionalmente en donde la enfermedad metabólica es diabetes.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65