

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 969**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7105 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2011 PCT/US2011/020606**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011 WO11085271**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2011 E 11732249 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2521556**

54 Título: **Modulación de la expresión tipo angiopoyetina 3**

30 Prioridad:

08.01.2010 US 293604 P

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

07.08.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CROOKE, ROSANNE, M.;
GRAHAM, MARK, J.;
LEE, RICHARD y
DOBIE, KENNETH, W.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 677 969 T3

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

Modulación de la expresión tipo angiopoyetina 3**Descripción****5 Campo de la invención**

En la presente se divulgan métodos, compuestos y composiciones para reducir la expresión de ARNm y proteína tipo angiopoyetina 3 (ANGPTL3) en un animal. Además, en la presente se divulgan métodos, compuestos y composiciones que tienen un inhibidor de ANGPTL3 para reducir las enfermedades o afecciones relacionadas con ANGPTL3 en un animal. Tales métodos, compuestos y composiciones son útiles, por ejemplo, para tratar, prevenir, retrasar o mejorar una o más enfermedades cardiovasculares o síndromes metabólicos, o un síntoma de los mismos, en un animal.

Antecedentes

La diabetes y la obesidad (a veces referidas colectivamente como "diabesidad") están interrelacionadas en que se sabe que la obesidad exacerba la patología de la diabetes y que más del 60% de los diabéticos son obesos. La mayoría de la obesidad humana se asocia con resistencia a la insulina y resistencia a la leptina. De hecho, se ha sugerido que la obesidad puede tener un impacto incluso mayor sobre la acción de la insulina que la misma diabetes (Sindelka et al., *Physiol Res.*, 2002, 51, 85-91). Adicionalmente, se sabe que varios compuestos en el mercado para el tratamiento de la diabetes inducen el aumento de peso, un efecto secundario muy indeseable para el tratamiento de esta enfermedad.

La enfermedad cardiovascular también está interrelacionada con la obesidad y la diabetes. La enfermedad cardiovascular abarca una amplia variedad de etiologías y tiene una variedad igualmente amplia de agentes causales y actores interrelacionados. Muchos agentes causantes contribuyen a síntomas como niveles en plasma elevados de colesterol, incluyendo el colesterol no HDL, así como otros trastornos relacionados con los lípidos. Tales trastornos relacionados con los lípidos, referidos generalmente como dislipidemia, incluyen hiperlipidemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia entre otras indicaciones. El colesterol no HDL elevado se asocia con aterogénesis y sus secuelas, incluyendo enfermedades cardiovasculares como la arteriosclerosis, enfermedad arterial coronaria, infarto de miocardio, apoplejía isquémica, y otras formas de enfermedad cardíaca. Estos se clasifican como los tipos de enfermedades más prevalentes en los países industrializados. De hecho, una estimación de 12 millones de personas en los Estados Unidos sufren de enfermedad arterial coronario y aproximadamente 36 millones requieren tratamiento por niveles de colesterol elevados.

La evidencia epidemiológica y experimental ha demostrado que los niveles altos de triglicéridos circulantes (TG) pueden contribuir a la enfermedad cardiovascular y una cantidad enorme de trastornos metabólicos (Valdivielso et al., 2009, *Atherosclerosis*. 207(2):573-8; Zhang et al., 2008, *Circ Res.* 1;102(2):250-6). Los TG derivados de fuentes o exógenas o endógenas se incorporan y segregan en quilomicrones desde el intestino o en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) del hígado. Una vez en circulación, los TG se hidrolizan por la lipoproteína lipasa (LpL) y los ácidos grasos libres resultantes pueden ser absorbidos por los tejidos locales y usados como una fuente de energía. Debido al profundo efecto que la LpL tiene sobre los TG de plasma y el metabolismo en general, descubrir y desarrollar compuestos que afecten a la actividad de la LpL son de gran interés.

El síndrome metabólico es una combinación de trastornos médicos que aumentan el riesgo de enfermedades cardiovasculares y diabetes. Los síntomas, que incluyen presión sanguínea alta, triglicéridos altos, HDL disminuido y obesidad, tienden a aparecer juntos en algunos individuos. Afecta a un gran número de personas de forma agrupada. En algunos estudios, la prevalencia en los USA se calcula que es de hasta el 25% de la población. El síndrome metabólico se conoce con otros nombres, como el síndrome (metabólico) X, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome de Reaven o CHAOS. Con la alta prevalencia de trastornos cardiovasculares y trastornos metabólicos, sigue existiendo una necesidad de enfoques mejorados para tratar estas afecciones.

Las angiopoyetinas son una familia de factores de crecimiento secretados. Junto con sus respectivos receptores específicos del endotelio, las angiopoyetinas desempeñan papeles importantes en la angiogénesis. Un miembro de la familia, tipo angiopoyetina 3 (también conocido como ANGPT5, ANGPTL3 o angiopoyetina 5), se expresa predominantemente en el hígado, y se cree que desempeña un papel en la regulación del metabolismo de los lípidos (Kaplan et al., *J. Lipid Res.*, 2003, 44, 136-143).

El gen humano para la tipo angiopoyetina 3 fue identificado y clonado como resultado de búsquedas en bases de datos EST reunidas. El ADNc humano de longitud completa codifica un polipéptido de 460 aminoácidos que tiene las características estructurales características de las angiopoyetinas: un péptido señal, un dominio helicoidal extendido, un péptido conector corto, y un dominio de homología de fibrinógeno globular (FHD). Se descubrió que el ADNc de tipo angiopoyetina 3 de ratón codifica un polipéptido de 455 aminoácidos con un 76% de identidad con el polipéptido humano. Un alineamiento de angiopoyetinas mostró que la tipo angiopoyetina 3, a diferencia de otros miembros de la familia, no contiene el motivo de los residuos ácidos que determinan un sitio de

unión al calcio. El análisis de transferencia Northern reveló expresión principalmente en el hígado de tejidos adultos, con transferencias Northern de embriones murinos mostrando la presencia de transcritos tan pronto como desde el día 15, sugiriendo que la tipo angiopoyetina 3 se expresa temprano durante el desarrollo del hígado y que la expresión se mantiene en el hígado adulto. El gen del ratón mapea en el cromosoma 4 y el gen humano se mapeó en la región 1p31 (Conklin et al., Genomics, 1999, 62, 477-482).

Los ratones obesos KK tienen un síndrome multigénico de obesidad moderada y un fenotipo diabético que se asemeja a la diabetes tipo 2 hereditaria humana. Estos ratones muestran signos de hiperinsulinemia, hiperglucemia e hiperlipidemia. Una raza de ratones KK denominada KK/San tiene niveles de lípidos en plasma significativamente bajos a pesar de los signos de hiperinsulinemia e hiperglucemia. El fenotipo mutante se hereda recesivamente, y el locus se denominó hipolipidemia (*hyp1*). El locus mapea en el medio del cromosoma 4, y el gen se identificó como tipo angiopoyetina 3 mediante clonación posicional. La inyección de adenovirus recombinantes que contenían el ADNc de tipo angiopoyetina 3 humana o de ratón de longitud completa en los ratones KK/San mutantes provocó un aumento en los niveles en plasma de triglicéridos, colesterol total y ácidos grasos no esterificados (NEFA). De manera similar, la inyección de proteína tipo angiopoyetina 3 recombinante en los ratones mutantes aumentó los niveles de triglicéridos y ácidos grasos no esterificados. (Koishi et al., Nat. Genet., 2002, 30, 151-157).

En otro estudio centrado en las vías metabólicas de los triglicéridos en ratones KK/San, la sobreexpresión de tipo angiopoyetina 3 dio como resultado un aumento marcado de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) enriquecida con triglicéridos. Las diferencias en la tasa de secreción de triglicéridos VLDL hepática no fueron significativas entre ratones KK y KK/San del tipo salvaje. Sin embargo, los estudios con VLDL marcada sugirieron que los niveles de triglicéridos en plasma bajos en ratones KK/San se debían principalmente a una lipólisis aumentada de los triglicéridos de VLDL en lugar de a una captación de partículas enteras aumentada. Los niveles de apoB100 y apoB48 en plasma de ratones KK/San fueron similares a los de los ratones KK de tipo salvaje. Los ratones deficientes en ApoCIII tienen un fenotipo similar a los ratones KK/San, y se cree que la ApoCIII modula el metabolismo de triglicéridos de VLDL mediante la inhibición de la hidrólisis mediada por lipasa de los triglicéridos VLDL (Shimizu-gawa et al., J. Biol. Chem., 2002, 277, 33742-33748).

Consecuente con un papel en el metabolismo de lípidos, se descubrió que el ARNm de tipo angiopoyetina 3 está regulado por incremento en ratones C57BL/6J alimentados con dietas de comida normal con 4% de colesterol y en ratones tratados con el agonista del receptor X del hígado (LXR) T0901317. Los LXR son factores de transcripción activados por ligandos que desempeñan un papel en la regulación de los genes que gobiernan la homeostasis del colesterol en el hígado y los tejidos periféricos. Además del metabolismo del colesterol, los LXR también pueden desempeñar un papel en la regulación del metabolismo de los ácidos grasos. El tratamiento de las células HepG2 con agentes naturales o sintéticos que activan el LXR provocó una expresión de tipo angiopoyetina 3 aumentada. Se descubrió que el promotor del gen de la tipo angiopoyetina 3 humana contiene un elemento de respuesta de LXR. Adicionalmente, el promotor contenía varios sitios de unión potenciales para otros factores de transcripción incluyendo HNF-1, HNF-4, y C/EBP. (Kaplan et al., J. Lipid Res., 2003, 44, 136-143).

El tratamiento de roedores con T0901317 está asociado con la acumulación de triglicéridos en el hígado y el plasma. La acumulación de triglicéridos en el hígado se ha explicado por una expresión aumentada de la proteína-1c de unión al elemento regulador del estero1 (SREBP1c) y la sintasa de ácidos grasos (FAS), ambas de las cuales son objetivos del LXR. El T0901317 no logró aumentar la concentración de triglicéridos en plasma en ratones con deficiencia de tipo angiopoyetina 3, mientras que la acumulación estimulada de triglicéridos hepáticos fue similar a la observada en ratones de tipo salvaje tratados. El aumento de triglicéridos en plasma en ratones de tipo salvaje tratados con T0901317 es paralelo a una inducción de ARNm de tipo angiopoyetina 3 en el hígado y un aumento en la concentración en plasma de la proteína. (Inaba et al., J. Biol. Chem., 2003, 278, 21344-21351).

Estudios adicionales abordaron el mecanismo del aumento en los niveles de ácidos grasos libres plasmáticos (FFA) observados en ratones KK/Snk tratados con tipo angiopoyetina 3 exógena. La sonda de tejidos humanos fijados con una proteína tipo angiopoyetina 3 marcada por fluorescencia demostró una fuerte unión sólo en el tejido adiposo. Además, se examinó la unión a proteínas radiomarcadas en adipocitos 3T3-L1 y se descubrió que era saturable y específica. La incubación de adipocitos 3T3-L1 con tipo angiopoyetina 3 llevó a una liberación mejorada de FFA y glicerol en el medio de cultivo. (Shimamura et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2003, 301, 604-609).

En un estudio que usó ratones tratados con estreptozotocina (STZ) para modelar el estado deficiente en insulina y ratones db/db para modelar el estado diabético resistente a la insulina, se observaron cantidades mayores de tipo angiopoyetina 3 hepática en ratones diabéticos en comparación con los animales control. Ambos modelos de diabetes mostraron hipertrigliceridemia, y la hiperlipidemia observada se explicó por lo menos parcialmente por la expresión aumentada de tipo angiopoyetina 3. Estos resultados sugirieron que la tipo angiopoyetina 3 es un enlace entre la diabetes y la dislipidemia, con elevación que promueve hiperlipidemia (Inukai et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, 317, 1075-1079).

Un estudio posterior examinó la regulación de la tipo angiopoyetina 3 por la leptina y la insulina, ambas de las cuales son actores clave en el síndrome metabólico. La expresión de tipo angiopoyetina 3 y los niveles de proteína en plasma se incrementaron en ratones db/db resistentes a la leptina y ob/ob deficientes en leptina en relación con los controles. El suplemento de ratones ob/ob con leptina disminuyó los niveles de tipo angiopoyetina 3. Las alteraciones en la expresión se asociaron con alteraciones en los niveles de triglicéridos y de ácidos grasos libres en plasma. La expresión génica y los niveles de proteína en plasma también se incrementaron en ratones tratados con STZ deficientes en insulina. (Shimamura et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 322, 1080-1085).

De acuerdo con su pertenencia a la familia angiopoyetina, se descubrió que la proteína tipo angiopoyetina 3 recombinante se unía a integrina $\alpha v \beta_3$ e indujo la adhesión y migración celular endotelial haptotáctica dependiente de la integrina $\alpha v \beta_3$. También estimuló las vías de transducción de señales características para la activación de la integrina. La tipo angiopoyetina 3 indujo fuertemente la angiogénesis en el ensayo de angiogénesis corneal en ratas. (Camenisch et al., *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 17281-17290).

Varios grupos se sometieron a estudios de asociación de genoma completa (GWAS) que exploraron el genoma en busca de variantes comunes asociadas con las concentraciones en plasma de HDL, LDL y triglicéridos. Los estudios GWAS encontraron una asociación entre los triglicéridos y los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) cerca de ANGPTL3 (Willer et al., *Nature Genetics*, 2008, 40(2):161-169).

La Patente U.S. 7.267.819, la solicitud USSN 12/128.545, y la solicitud USSN 12/001.012 describen de manera general agonistas y antagonistas de tipo angiopoyetina 3.

Las publicaciones de PCT WO/02101039 (EP02733390) y WO/0142499(USSN 10/164.030) divulgan una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a tipo angiopoyetina 3 de ratón (Ryuta, 2002; Ryuta, 2001).

Actualmente, hay una falta de opciones aceptables para tratar los trastornos cardiovasculares y metabólicos. Por lo tanto, es un objeto de la presente memoria proporcionar compuestos y métodos para el tratamiento de tales enfermedades y trastornos.

El papel potencial de la tipo angiopoyetina 3 en el metabolismo de los lípidos la convierte en un objetivo atractivo para la investigación. La tecnología antisentido está emergiendo como un medio eficaz para reducir la expresión de ciertos productos génicos y puede, por lo tanto, demostrar ser excepcionalmente útil en una serie de aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y de investigación para la modulación de la tipo angiopoyetina 3.

La WO 2008/073300 divulga antagonistas de ANGPTL3 que incluyen anticuerpos monoclonales y antagonistas de ácidos nucleicos. Se describen métodos para tratar trastornos del metabolismo de lípidos usando anticuerpos monoclonales. Lee et al. (*J. Biol. Chem.*, 2009, 284, 13735-13745) divulgan anticuerpos que inhiben la actividad de ANGPTL3 y consideran el uso de anticuerpos en el tratamiento de la hiperlipidemia. Sonnenburg et al. (*J. Lipid Res.*, 2009, 50, 2421-2429) tratan la capacidad de GPIHBP1 para estabilizar la lipoproteína lipasa y evitar su inhibición por ANGPTL3 en el contexto de la hiperlipidemia. Lichtenstein y Kersten (*Biochemica et Biophysica Acta* 2010, 1801, 415-420) consideran el papel de ANGPTL3 en la modulación de la actividad de LPL y en el contexto de los niveles de TG y HDL en plasma.

Sumario de la Invención

La invención proporciona un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado quimérico de 10 a 30 nucleósidos unidos de longitud dirigido a un ácido nucleico que codifica la tipo angiopoyetina 3 (ANGPTL3) en donde el oligonucleótido modificado comprende por lo menos un enlace internucleosídico modificado, fracción de azúcar modificado y/o nucleobase modificada, para uso en un método para tratar o prevenir la esteatosis hepática o la esteatohepatitis en un animal que comprende administrar el compuesto al animal.

Resumen de la Divulgación

En la presente se divulgan compuestos antisentido útiles para modular la expresión génica y las vías asociadas mediante mecanismos de acción antisentido como enzimas RNasaH, ARNi y ARNcd, así como otros mecanismos antisentido basados en la degradación objetivo o la ocupación objetivo.

En la presente se divulgan métodos, compuestos y composiciones para inhibir la expresión de ANGPTL3 y tratar, prevenir, retrasar o mejorar una enfermedad, afección relacionados con ANGPTL3 o un síntoma de los mismos. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección relacionada con ANGPTL3 es enfermedad cardiovascular o enfermedad metabólica.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones de la invención comprenden un oligonucleótido modificado de 10 a 30 nucleósidos unidos de longitud dirigido a ANGPTL3. El objetivo ANGPTL puede tener una secuencia seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-5. El oligonucleótido modificado dirigido a ANGPTL3

puede tener una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de igual longitud de las SEQ ID NO: 1-5. El oligonucleótido modificado dirigido a ANGPTL3 puede tener una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobases seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 34-182. El oligonucleótido modificado puede tener una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobases seleccionada de una secuencia enumerada en cualquiera de las SEQ ID NO: 34-182. La porción de nucleobase contigua del oligonucleótido modificado puede ser complementaria a una porción de igual longitud de una región de ANGPTL3 seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-5. La región de ANGPTL3 se puede elegir de una o más de las siguientes regiones: 22-52, 116-145, 637-720, 953-983, 1333-1469 y 1463-1489.

En la presente se divulga un método para reducir la expresión de ANGPTL3 en un animal que comprende administrar al animal un compuesto que comprende el oligonucleótido modificado dirigido a ANGPTL3 descrito en la presente.

En la presente se divulga un método para reducir la expresión de apoC-III, los niveles de triglicéridos, los niveles de colesterol, la lipoproteína de baja densidad (LDL) o los niveles de glucosa en un animal que comprende administrar al animal un compuesto que comprende el oligonucleótido modificado dirigido a ANGPTL3 descrito en la presente, en donde el oligonucleótido modificado reduce la expresión de ANGPTL3 en el animal.

En la presente se divulga un método para mejorar la enfermedad cardiovascular o la enfermedad metabólica en un animal que comprende administrar al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado dirigido a ANGPTL3 descrito en la presente, en donde el oligonucleótido modificado reduce la expresión de ANGPTL3 en el animal.

En la presente se divulga un método para tratar un animal con enfermedad cardiovascular o enfermedad metabólica que comprende: 1) identificar al animal con enfermedad cardiovascular o enfermedad metabólica, y 2) administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 20 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases por lo menos un 90% complementaria a la SEQ ID NO: 1-5 como se mide sobre la totalidad de dicho oligonucleótido modificado, tratando de este modo al animal con enfermedad cardiovascular o enfermedad metabólica. En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto administrado al animal reduce la enfermedad cardiovascular o la enfermedad metabólica en el animal.

En la presente se divulga un método para disminuir uno o más niveles de ANGPTL3, niveles de LDL, niveles de apoC-III, niveles de triglicéridos, niveles de colesterol, niveles de glucosa, peso de la almohadilla adiposa, enfermedad cardiovascular y enfermedad metabólica en un humano administrando un inhibidor de ANGPTL3 que comprende un oligonucleótido modificado como se describe en la presente.

Descripción Detallada

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

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

Definiciones

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

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos tienen los siguientes significados: "2'-O-metoxietilo" (también 2'-MOE y 2'-O(CH₂)₂-OCH₃) se refiere a una modificación O-metoxi-etilo de la posición 2' de un anillo de furosil. Un azúcar 2'-O-metoxietilo modificado es un azúcar modificado.

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

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

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

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

"Aproximadamente" significa dentro del $\pm 10\%$ de un valor. Por ejemplo, si se establece, "un marcador puede aumentarse en aproximadamente un 50%", está implícito que el marcador puede aumentarse entre un 45%-55%

"Agente farmacéutico activo" significa la sustancia o sustancias en una composición farmacéutica que proporcionan un beneficio terapéutico cuando se administran a un individuo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones un oligonucleótido antisentido dirigido a ANGPTL3 es un agente farmacéutico activo.

"Región objetivo activa" o "región objetivo" significa una región a la que están dirigidos uno o más compuestos antisentido activos.

"Compuestos antisentido activos" significa compuestos antisentido que reducen los niveles de ácido nucleico o los niveles de proteína objetivo.

"Adipogénesis" significa el desarrollo de adipocitos a partir de preadipocitos. "Lipogénesis" significa la producción o formación de grasa, ya sea degeneración grasa o infiltración grasa.

"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 tanto la distribución de grasa a lo largo del cuerpo y el tamaño y la masa de los depósitos de tejido adiposo. La distribución de la grasa corporal puede estimarse mediante medidas de pliegues cutáneos, proporciones de circunferencia cintura a cadera, o técnicas como ultrasonido, tomografía computarizada o formación de imágenes por resonancia magnética. De acuerdo con el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, los individuos con un índice de masa corporal (IMC) de 30 o más se consideran obesos. El término "Obesidad" como se usa en la presente 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, pero no está limitado a, las siguientes afecciones: obesidad de inicio adulto; obesidad alimentaria; obesidad endógena o metabólica; obesidad endocrina; obesidad familiar; obesidad hiperinsulinar; obesidad hiperplástica-hipertrófica; obesidad hipogonadal; obesidad hipotiroidea; obesidad de por vida; obesidad mórbida y obesidad exógena.

"Administrado concomitantemente" se refiere a la coadministración 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 sólo necesitan superponerse por un período de tiempo y no necesitan ser coextensivos.

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

"Agente" significa una sustancia activa que puede proporcionar un beneficio terapéutico cuando se administra a un animal. "Primer agente" significa un compuesto terapéutico de la divulgación. Por ejemplo, un primer agente puede ser un oligonucleótido antisentido dirigido a ANGPTL3. "Segundo agente" significa un segundo compuesto terapéutico de la divulgación (por ejemplo, un segundo oligonucleótido antisentido dirigido a ANGPTL3) y/o un compuesto terapéutico no de ANGPTL3.

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

"ANGPTL3" significa cualquier ácido nucleico o proteína de ANGPTL3.

"Expresión de ANGPTL3" significa el nivel de ARNm transcrito del gen que codifica ANGPTL3 o el nivel de proteína traducida del ARNm. La expresión de ANGPTL3 puede determinarse por métodos conocidos en la técnica, tales como una transferencia Northern o Western.

"Ácido nucleico de ANGPTL3" significa cualquier ácido nucleico que codifica ANGPTL3. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ácido nucleico de ANGPTL3 incluye una secuencia de ADN que codifica ANGPTL3, una secuencia de ARN transcrita de ADN que codifica ANGPTL3 (incluyendo ADN genómico que comprende intrones y exones), y una secuencia de ARNm que codifica ANGPTL3. "ARNm de ANGPTL3" significa un ARNm que codifica una proteína de ANGPTL3.

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

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

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

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

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

"Lipoproteína que contiene ApoB" significa cualquier lipoproteína que tenga apolipoproteína B como su componente de proteína, y se entiende que incluye LDL, VLDL, IDL, y lipoproteína(a) y puede ser generalmente dirigida por el agente y las terapias reductoras de lípidos. "LDL que contiene ApoB-100" significa la isoforma de ApoB-100 que contiene LDL.

"Aterosclerosis" significa un endurecimiento de las arterias que afectan a las arterias de tamaño grande y mediano y se caracteriza por la presencia de depósitos grasos. Los depósitos grasos se llaman "ateromas" o "placas", que consisten principalmente de colesterol y otras grasas, calcio y tejido cicatricial, y dañan el revestimiento de las arterias.

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

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

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

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

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

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

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

El "colesterol" es una molécula de esterol que se encuentra en las membranas celulares de todos los tejidos animales. El colesterol debe transportarse en el plasma sanguíneo de un animal por lipoproteínas que

incluyen lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de densidad intermedia (IDL), lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL). "Colesterol en plasma" se refiere a la suma de todo el colesterol esterificado y/o no esterificado de las lipoproteínas (VLDL, IDL, LDL, HDL) presente en el plasma o suero.

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

10 "Complementariedad" significa la capacidad de emparejamiento entre nucleobases de un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico. En ciertas realizaciones, la complementariedad entre el primer y el segundo ácido nucleico puede estar entre dos cadenas de ADN, entre dos cadenas de ARN, o entre un ADN y una cadena de ARN. En ciertas realizaciones, algunas de las nucleobases en una cadena se corresponden con una base de unión de hidrógeno complementaria en la otra cadena. En ciertas realizaciones, todas las nucleobases en una cadena se corresponden con una base de unión de hidrógeno complementaria en la otra cadena. En ciertas realizaciones, un primer ácido nucleico es un compuesto antisentido y un segundo ácido nucleico es un ácido nucleico objetivo. En 15 ciertas de tales realizaciones, un oligonucleótido antisentido es un primer ácido nucleico y un ácido nucleico objetivo es un segundo ácido nucleico.

"Nucleobases contiguas" significa nucleobases inmediatamente adyacentes entre sí.

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

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

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

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

40 "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.

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

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

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

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

65

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

"Identificar" o "seleccionar un sujeto diabético" significa identificar o seleccionar un sujeto que ha sido identificado como diabético o identificar o seleccionar un sujeto que tiene cualquier síntoma de diabetes (tipo 1 o tipo 2) como, pero no limitado a, tener una glucosa en ayunas de por lo menos 110 mg/dl, glucosuria, poliuria, polidipsia, resistencia a la insulina aumentada y/o sensibilidad a la insulina disminuida.

"Identificar" o "seleccionar un sujeto obeso" significa identificar o seleccionar un sujeto que ha sido diagnosticado como obeso o identificar o seleccionar un sujeto con un IMC mayor de 30 y/o una circunferencia de cintura mayor de 102 cm en hombres o mayor de 88 cm en mujeres

"Identificar" o "seleccionar un sujeto que tiene dislipidemia" significa identificar o seleccionar a un sujeto diagnosticado con un trastorno del metabolismo de lípidos y/o lipoproteínas, incluyendo la sobreproducción o deficiencia de lípidos y/o lipoproteínas. Las dislipidemias pueden manifestarse por la elevación de lípidos como el colesterol y los triglicéridos, así como de lipoproteínas como el colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL).

"Identificar" o "seleccionar" un sujeto que tiene adiposidad aumentada "significa identificar o seleccionar un sujeto que tiene una cantidad aumentada de grasa corporal (o adiposidad) que incluye la preocupación por uno o ambos de la distribución de grasa a lo largo del cuerpo y el tamaño y la masa de los depósitos de tejido adiposo. La distribución de grasa corporal puede estimarse mediante medidas de pliegues cutáneos, proporciones de circunferencia cintura a cadera, o técnicas como ultrasonido, tomografía computarizada o formación de imágenes por resonancia magnética. Según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades, las personas con un índice de masa corporal (IMC) de 30 o más se consideran obesos.

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

"Inmediatamente adyacente" significa que no hay elementos intermedios entre los elementos inmediatamente adyacentes.

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

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

La "resistencia a la insulina" se define como la condición en la cual las cantidades normales de insulina son inadecuadas para producir una respuesta a la insulina normal de las células, por ejemplo, células grasas, musculares y/o 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, con ambos efectos sirviendo para elevar la glucosa en sangre. Los niveles en plasma altos de insulina y glucosa debido a la resistencia a la insulina llevan a menudo a síndrome metabólico y diabetes tipo 2.

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

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

"Administración intravenosa" significa la administración en una vena.

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

"Reducción de lípidos" significa una reducción en uno o más lípidos en un sujeto. La disminución de lípidos puede tener lugar con una o más dosis a lo largo del tiempo.

"Agente hipolipemiente" significa un agente, por ejemplo, un modulador específico de ANGPTL3, proporcionado a un sujeto para lograr una disminución de lípidos en el sujeto. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se proporciona un agente hipolipemiente a un sujeto para reducir uno o más de apoB, apoC3, colesterol total, LDL-C, VLDL-C, IDL-C, no-HDL-C, triglicéridos, partículas de LDL densas pequeñas, y Lp(a) en un sujeto. "Terapia hipolipemiente" 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 una o más de apoB, apoC-III, colesterol total, LDL-C, VLDL-C, IDL-C, no-HDL-C, triglicéridos, partículas de LDL densas pequeñas, y Lp(a) en un sujeto.

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

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

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

coronaria, edad y otros factores descritos en la presente.

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

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

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

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

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

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

"Nucleósido modificado" significa un nucleósido que tiene, independientemente, una o más fracciones de azúcar modificado o nucleobases modificadas.

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

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

"Azúcar modificado" se refiere a una sustitución o cambio de un azúcar natural.

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

"Inhibidor de MTP" significa un agente que inhibe la proteína de transferencia de triglicéridos microsomales enzimáticos.

"Enlace internucleosídico de origen natural" significa un enlace fosfodiéster de 3' a 5'.

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

"Enfermedad hepática grasa no alcohólica" o "NAFLD" significa una afección caracterizada por inflamación grasa del hígado que no se debe a un consumo excesivo 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 varía desde la simple acumulación de triglicéridos en los hepatocitos (esteatosis hepática) hasta la esteatosis hepática con inflamación (esteatohepatitis), fibrosis y cirrosis.

La "esteatohepatitis no alcohólica" (NASH) se produce a partir de la progresión de NAFLD más allá del depósito de triglicéridos. Se requiere un "segundo golpe" capaz de inducir necrosis, inflamación y fibrosis para desarrollar NASH. Los candidatos para el segundo golpe pueden agruparse en categorías amplias: factores que provocan un aumento en el estrés oxidativo y factores que promueven la expresión de citoquinas proinflamatorias. Se ha sugerido que los triglicéridos hepáticos aumentados llevan a estrés oxidativo aumentado en los hepatocitos de animales y humanos, indicando una potencial relación causa-efecto entre la acumulación de triglicéridos hepáticos, el estrés oxidativo y la progresión de la esteatosis hepática a NASH (Browning and Horton, J

Clin Invest, 2004, 114, 147-152). La hipertrigliceridemia y la hiperfatieacidemia pueden provocar la acumulación de triglicéridos en tejidos periféricos (Shimamura et al., Biochem Biophys Res Commun, 2004, 322, 1080-1085).

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

10 "Nucleobase" significa una fracción heterocíclica capaz de emparejarse 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.

15 "Nucleósido" significa una nucleobase ligada 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 como por ejemplo miméticos de nucleósidos que tienen morfolino, ciclohexenilo, ciclohexilo, tetrahidropiranilo, miméticos de azúcar biciclo o triciclo, por ejemplo, unidades de azúcar no de furanosa.

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

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

30 "Compuesto oligomérico" u "oligómero" se refiere a una estructura polimérica que comprende dos o más subestructuras y 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.

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

40 "Administración parenteral" significa la administración de una manera que no sea a través del tracto digestivo. La administración parenteral incluye administración tópica, administración subcutánea, administración intravenosa, administración intramuscular, administración intraarterial, administración intraperitoneal, o administración intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intracerebroventricular. La administración puede ser continua, o crónica, o corta o intermitente.

45 "Péptido" significa una molécula formada por el enlace de por lo menos dos aminoácidos mediante enlaces amida. Péptido se refiere a polipéptidos y proteínas.

50 "Agente farmacéutico" significa una sustancia que proporciona un beneficio terapéutico cuando se administra a un individuo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un oligonucleótido antisentido dirigido a ANGPTL3 es un agente farmacéutico.

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

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

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

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

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

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

"Profármaco" significa un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte en una forma activa dentro del cuerpo o células del mismo mediante la acción de enzimas endógenos u otros productos químicos o condiciones.

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

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

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

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

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

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

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

"Región objetivo" se define como una porción del ácido nucleico objetivo que tiene por lo menos una estructura, función o característica identificable.

"Segmento objetivo" significa la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico objetivo al que están dirigidos uno o más compuestos antisentido. El "sitio objetivo 5' " se refiere al nucleótido más 5' de un segmento objetivo. "Sitio objetivo 3' " se refiere al nucleótido más 3' de un segmento objetivo.

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

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

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

"Diabetes tipo 2" (también conocida como "diabetes mellitus tipo 2" o "diabetes mellitus, tipo 2", y anteriormente denominada "diabetes mellitus tipo 2", "diabetes no dependiente de la insulina (NIDDM)", "diabetes relacionada con la obesidad" o "diabetes de aparición en adultos") es un trastorno metabólico que se caracteriza

principalmente por resistencia a la insulina, deficiencia de insulina relativa, e hiperglucemia.

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

"Nucleótido no modificado" significa un nucleótido compuesto por nucleobases de origen natural, fracciones 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).

Ciertas realizaciones

Los compuestos para su uso en la invención comprenden un oligonucleótido modificado quimérico de 10 a 30 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a ANGPTL3. El objetivo ANGPTL puede tener una secuencia seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-5.

En ciertas realizaciones, los compuestos para su uso en la invención comprenden un oligonucleótido modificado quimérico que consiste de 10 a 30 nucleósidos que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de igual longitud de las SEQ ID NO: 1-5.

En ciertas realizaciones, los compuestos para su uso en la invención comprenden un oligonucleótido modificado quimérico que consiste de 10 a 30 nucleósidos que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobases seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 34-182.

En ciertas realizaciones, los compuestos para su uso en la invención comprenden un oligonucleótido modificado quimérico que consiste de 10 a 30 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobases seleccionada a partir de una secuencia enumerada en cualquiera de las SEQ ID NO: 34-182.

En ciertas realizaciones, los compuestos para su uso en la invención pueden comprender una sal del oligonucleótido modificado quimérico.

En ciertas realizaciones, los compuestos para su uso en la invención pueden comprender además un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

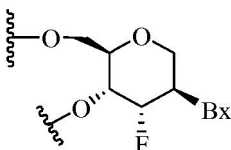
En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido modificado es por lo menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 100% complementaria a cualquiera de las SEQ ID NO:1-5 como se mide en la totalidad del oligonucleótido modificado.

En ciertas realizaciones, el compuesto para su uso en la invención consiste de un oligonucleótido modificado de cadena sencilla.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 nucleósidos enlazados. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste de 20 nucleósidos unidos.

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

En ciertas realizaciones, por lo menos un nucleósido del oligonucleótido modificado comprende un azúcar modificado. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado comprende por lo menos un nucleósido modificado con tetrahidropirano en el que un anillo de tetrahidropirano reemplaza un anillo de furanosa. En ciertas realizaciones, cada uno de los nucleósidos modificados con tetrahidropirano tiene la estructura:



en donde Bx es una fracción de base heterocíclica opcionalmente protegida. En ciertas realizaciones, por lo menos un azúcar modificado es un azúcar bicíclico. En ciertas realizaciones, por lo menos un azúcar modificado comprende

un 2'-O-metoxietilo o un puente 4' (CH₂)_n-O-2', en donde n es 1 ó 2.

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.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado comprende: a) un segmento de hueco que consiste de desoxinucleósidos enlazados; b) un segmento de ala 5' que consiste de nucleósidos enlazados; y c) un segmento de ala 3' que consiste de nucleósidos enlazados. El segmento de hueco está posicionado entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3' y cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consiste de 20 nucleósidos enlazados, el segmento de hueco consistiendo de diez desoxinucleósidos enlazados, el segmento de ala 5' consistiendo de cinco nucleósidos unidos, el segmento de ala 3' consistiendo de cinco nucleósidos unidos, cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo y cada enlace internucleosídico es un enlace de fosforotioato.

En ciertas realizaciones, los compuestos para su uso en la invención comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 20 nucleósidos enlazados que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de igual longitud de las SEQ ID NO: 1-5, en donde el oligonucleótido modificado comprende : a) un segmento de hueco que consiste de diez desoxinucleósidos enlazados; b) un segmento de ala 5' que consiste de cinco nucleósidos enlazados; y c) un segmento de ala 3' que consiste de cinco nucleósidos enlazados. El segmento de hueco está posicionado entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace de fosforotioato y cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina .

En ciertas realizaciones, los compuestos para su uso en la invención comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 20 nucleósidos enlazados que tienen una secuencia de nucleobases que comprende por lo menos 8 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobases seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 34-182, en donde el oligonucleótido modificado comprende: a) un segmento de hueco que consiste de diez desoxinucleósidos enlazados; b) un segmento de ala 5' que consiste de cinco nucleósidos enlazados; y c) un segmento de ala 3' que consiste de cinco nucleósidos enlazados. El segmento de hueco está posicionado entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace de fosforotioato y cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina.

En la presente se divulgan métodos, compuestos y composiciones para inhibir la expresión de ANGPTL3.

En la presente se divulga un método para reducir la expresión de ANGPTL3 en un animal que comprende administrar al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado de 10 a 30 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a ANGPTL3.

En la presente se divulga un método para reducir la expresión de ApoC-III en un animal que comprende administrar al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado de 10 a 30 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a ANGPTL3, reduciendo de este modo la expresión de ApoC-III en el animal.

En la presente se divulga un método para reducir los niveles de triglicéridos en un animal que comprende administrar al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado de 10 a 30 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a ANGPTL3, reduciendo de este modo el nivel de triglicéridos en el animal.

En la presente se divulga un método para reducir los niveles de colesterol en un animal que comprende administrar al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado de 10 a 30 nucleósidos v de longitud dirigido a ANGPTL3, reduciendo de este modo el nivel de colesterol en el animal.

En la presente se divulga un método para reducir los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en un animal que comprende administrar al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado de 10 a 30 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a ANGPTL3, reduciendo de este modo el nivel de lipoproteína de baja densidad (LDL) en el animal.

En la presente se divulga un método para reducir los niveles de glucosa en un animal que comprende administrar al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado de 10 a 30 nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a ANGPTL3, reduciendo de este modo el nivel de glucosa en el animal.

En la presente se divulga un método para mejorar la enfermedad metabólica o cardiovascular en un animal que comprende administrar al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado de 10 a 30 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a ANGPTL3, mejorando de este modo la enfermedad metabólica o cardiovascular en el animal.

En la presente se divulga un método para tratar un animal con una enfermedad o afección relacionada con ANGPTL3 que comprende: a) identificar dicho animal con la enfermedad o afección relacionada con ANGPTL3, y b) administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido 10 modificado a 30 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a ANGPTL3. En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto administrado al animal reduce la enfermedad o afección relacionada con ANGPTL3 en el animal.

En la presente se divulga un método para tratar un animal con enfermedad metabólica o cardiovascular que comprende: a) identificar dicho animal con enfermedad metabólica o cardiovascular, y b) administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 20 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases por lo menos un 90% complementaria a las SEQ ID NO: 1-5 como se sobre la totalidad de dicho oligonucleótido modificado, tratando de este modo al animal con enfermedad metabólica o cardiovascular. En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto administrado al animal reduce la enfermedad metabólica o cardiovascular en el animal.

En la presente se divulga un método para disminuir uno o más niveles de ANGPTL3, niveles de LDL, niveles de apoC-III, niveles de triglicéridos, niveles de colesterol, niveles de glucosa, peso de la almohadilla adiposa, enfermedad cardiovascular y enfermedad metabólica en un ser humano administrando un inhibidor de ANGPTL3 que comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 20 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases por lo menos un 90% complementaria a las SEQ ID NO: 1-5 como se mide sobre la totalidad de dicho oligonucleótido modificado.

En la presente se divulgan usos de los compuestos y composiciones descritos en la presente para inhibir la expresión de ANGPTL3.

En la presente se divulga el uso de los compuestos y composiciones descritos en la presente para reducir la expresión de ANGPTL3 en un animal. Ciertas realizaciones incluyen administrar al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado de 10 a 30 nucleósidos enlazados de longitud dirigido a ANGPTL3.

En la presente se divulga el uso de los compuestos y composiciones descritos en la presente para reducir la expresión de ApoC-III en un animal. Ciertas realizaciones incluyen administrar al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado de 10 a 30 nucleósidos enlazados en longitud dirigido a ANGPTL3, reduciendo de este modo la expresión de ApoC-III en el animal.

En la presente se divulga el uso de los compuestos y composiciones descritos en la presente para reducir los niveles de triglicéridos en un animal. Ciertas realizaciones incluyen administrar al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado de 10 a 30 nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a ANGPTL3, reduciendo de este modo el nivel de triglicéridos en el animal.

En la presente se divulga el uso de los compuestos y composiciones descritos en la presente para reducir los niveles de colesterol en un animal. Ciertas realizaciones incluyen administrar al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado de 10 a 30 nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a ANGPTL3, reduciendo de este modo el nivel de colesterol en el animal.

En la presente se divulga el uso de los compuestos y composiciones descritos en la presente para reducir los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en un animal. Ciertas realizaciones incluyen administrar al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado de 10 a 30 nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a ANGPTL3, reduciendo de este modo el nivel de lipoproteína de baja densidad (LDL) en el animal.

En la presente se divulga el uso de los compuestos y composiciones descritos en la presente para reducir los niveles de glucosa en un animal. Ciertas realizaciones incluyen administrar al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado de 10 a 30 nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a ANGPTL3, reduciendo de este modo el nivel de glucosa en el animal.

En la presente se divulga el uso de los compuestos y composiciones descritos en la presente memoria para mejorar la enfermedad metabólica o cardiovascular en un animal. Ciertas realizaciones incluyen administrar al animal un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado de 10 a 30 nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a ANGPTL3, mejorando de este modo la enfermedad metabólica o cardiovascular en el animal.

En la presente se divulga el uso de los compuestos y composiciones descritos en la presente para tratamiento. En la presente se divulga el uso de los compuestos y composiciones descritos en la presente para tratar un animal con una enfermedad o afección relacionada con ANGPTL3. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección relacionada con ANGPTL3 es una enfermedad metabólica o cardiovascular. Ciertas realizaciones incluyen: a) identificar dicho animal con la enfermedad o afección relacionada con ANGPTL3, y b) administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado de 10 a 30

nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a ANGPTL3. En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto administrado al animal reduce la enfermedad o afección relacionada con ANGPTL3 en el animal.

En la presente se divulga el uso de los compuestos y composiciones descritos en la presente para tratar un animal con enfermedad metabólica o cardiovascular, que comprende: a) identificar dicho animal con enfermedad metabólica o cardiovascular, y b) administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 20 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases por lo menos un 90% complementaria a las SEQ ID NO: 1-5 como se mide sobre la totalidad de dicho oligonucleótido modificado, tratando de este modo al animal con enfermedad metabólica o cardiovascular. En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto administrado al animal reduce la enfermedad metabólica o cardiovascular en el animal.

En la presente se divulga el uso de los compuestos y composiciones descritos en la presente para disminuir uno o más de niveles ANGPTL3, niveles de LDL, niveles de apoC-III, niveles de triglicéridos, niveles de colesterol, niveles de glucosa, peso de la almohadilla adiposa, enfermedad cardiovascular y enfermedad metabólica en un humano administrándole un inhibidor de ANGPTL3 que comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 20 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases por lo menos un 90% complementaria a la SEQ ID NO: 1-5 como se mide sobre la totalidad de dicho oligonucleótido modificado.

En ciertas realizaciones, la ANGPTL3 tiene la secuencia como se establece en el N° de acceso de GenBank BG400407.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 1). En ciertas realizaciones, la ANGPTL3 tiene la secuencia como se establece en el N° acceso de GenBank BG562555.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 2). En ciertas realizaciones, la ANGPTL3 tiene la secuencia como se establece en el N° de acceso de GenBank BG562798.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 3). En ciertas realizaciones, la ANGPTL3 tiene la secuencia como se establece en el N° de acceso GenBank NM_014495.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 4). En ciertas realizaciones, la ANGPTL3 tiene la secuencia tal como se establece en el N° de acceso de GenBank NT_032977.5, nucleótidos 15511702 a 15521082 (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 5). En ciertas realizaciones, la ANGPTL3 tiene la secuencia como se establece en el N° de acceso de GenBank AF162224.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 6). En ciertas realizaciones, la ANGPTL3 tiene la secuencia como se establece en el N° de acceso de GenBank AI195524.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 7). En ciertas realizaciones, la ANGPTL3 tiene la secuencia como se establece en el N° de acceso de GenBank BB717501.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 8).

Tabla 1: Nombres y Secuencias de Genes Objetivo

Nombre de Objetivo	Especies	Genbank N°	SEQ ID NO
tipo angiopoyetina 3	Humano	BG400407.1	1
tipo angiopoyetina 3	Humano	BG562555.1	2
tipo angiopoyetina 3	Humano	BG562798.1	3
tipo angiopoyetina 3	Humano	NM_014495.1	4
tipo angiopoyetina 3	Humano	nucleótidos 15511702 a 15521082 de NT_032977.5	5
tipo angiopoyetina 3	Ratón	AF162224.1	6
tipo angiopoyetina 3	Ratón	AI195524.1	7
tipo angiopoyetina 3	Ratón	BB717501.1	8

En ciertas realizaciones, el animal es un humano.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones divulgados en la presente se designan como un primer agente y los métodos o usos divulgados en la presente comprenden además administrar un segundo agente. En ciertas realizaciones, el primer agente y el segundo agente se coadministran. En ciertas realizaciones, el primer agente y el segundo agente se coadministran secuencial o concomitantemente.

En ciertas realizaciones, el segundo agente es un agente reductor de la glucosa. El agente reductor de la glucosa puede incluir, pero no está limitado a, 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 la 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 reductor de la glucosa puede incluir, pero no está limitado a metformina,

sulfonilurea, rosiglitazona, meglitinida, tiazolidindiona, inhibidor de alfa-glucosidasa o una combinación de los mismos. La sulfonilurea puede ser acetohexamida, clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, glimepirida, una glipizida, una gliburida o unagliclazida. La meglitinida puede ser nateglinida o repaglinida. La tiazolidindiona puede ser pioglitazona o rosiglitazona. La alfa-glucosidasa puede ser acarbosa o miglitol.

En ciertas realizaciones, el segundo agente es una terapia hipolipemiente. En ciertas realizaciones, la terapia hipolipemiente puede incluir, pero no se limita a, un cambio de estilo de vida terapéutico, inhibidor de HMG-CoA reductasa, inhibidor de absorción de colesterol, inhibidor de MTP, compuesto antisentido dirigido a ApoB o cualquier combinación de los mismos. El inhibidor de la HMG-CoA reductasa puede ser atorvastatina, rosuvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina o simvastatina. El inhibidor de la absorción del colesterol puede ser ezetimibe.

En ciertas realizaciones, la administración comprende administración parenteral.

En ciertas realizaciones, la enfermedad metabólica o cardiovascular incluye, pero no está limitada a, obesidad, diabetes, aterosclerosis, dislipidemia, enfermedad del corazón coronaria, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), hipergrasoacidemia o síndrome metabólico, o una combinación de los mismos. La dislipidemia puede ser hiperlipidemia. La hiperlipidemia puede ser hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, o tanto hipercolesterolemia como hipertrigliceridemia. El NAFLD puede ser esteatosis hepática o esteatohepatitis. La diabetes puede ser diabetes tipo 2 o diabetes tipo 2 con dislipidemia.

En ciertas realizaciones, la administración del compuesto da como resultado una reducción de los niveles de lípidos, incluyendo niveles de triglicéridos, niveles de colesterol, resistencia a la insulina, niveles de glucosa o una combinación de los mismos. Uno o más de los niveles se pueden reducir independientemente en un 5%, 10%, 20%, 30%, 35%, o 40%. La administración del compuesto puede dar como resultado sensibilidad a la insulina o sensibilidad a la insulina hepática aumentadas. La administración del compuesto puede dar como resultado una reducción de las placas ateroscleróticas, obesidad, glucosa, lípidos, resistencia a la glucosa, colesterol, o mejora de la sensibilidad a la insulina o cualquier combinación de los mismos.

En la presente se divulga el uso de un compuesto como se describe en la presente en la fabricación de un medicamento para tratar, mejorar, retrasar o prevenir una o más de una enfermedad metabólica o una enfermedad cardiovascular.

En la presente se divulga un kit para tratar, prevenir o mejorar una o más de una enfermedad metabólica o una enfermedad cardiovascular como se describe en la presente, en donde el kit comprende: a) un compuesto como se describe en la presente; y opcionalmente b) un agente o terapia adicional como se describe en la presente. El kit puede incluir instrucciones o una etiqueta para usar el kit para tratar, prevenir o mejorar una o más de una enfermedad metabólica o enfermedad cardiovascular.

Compuestos antisentido

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

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

En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido dirigido al ácido nucleico de ANGPTL3 tiene de 10 a 30 nucleótidos de longitud. En otras palabras, los compuestos antisentido son de 10 a 30 nucleobases enlazadas. En otras realizaciones, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 8 a 80, 10 a 80, 12 a 50, 15 a 30, 18 a 24, 19 a 22, o 20 nucleobases enlazadas. 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 enlazadas de longitud, o un intervalo definido por dos cualquiera de los valores anteriores.

En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado acortado o truncado. El oligonucleótido modificado acortado o truncado puede tener un solo nucleósido deleciónado del extremo 5' (truncamiento 5'), o alternativamente del extremo 3' (truncamiento 3'). Un oligonucleótido acortado o truncado puede tener dos o más nucleósidos deleciónados del extremo 5', o alternativamente puede tener dos o más nucleósidos deleciónados del extremo 3'. Alternativamente, los nucleósidos deleciónados se pueden dispersar a

través del oligonucleótido modificado, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene uno o más nucleósidos delecionados del extremo 5' y uno o más nucleósidos delecionados del extremo 3'.

Cuando hay un único nucleósido adicional en un oligonucleótido alargado, el nucleósido adicional puede estar localizado en el extremo 5', 3' o en la parte central del oligonucleótido. Cuando hay dos o más nucleósidos adicionales, los nucleósidos añadidos pueden ser adyacentes entre sí, por ejemplo, en un oligonucleótido que tiene dos nucleósidos añadidos al extremo 5' (adición 5'), o alternativamente al extremo 3' (adición 3') o la porción central, del oligonucleótido. Alternativamente, el nucleósido añadido puede dispersarse a través del compuesto antisentido, por ejemplo, en un oligonucleótido que tiene uno o más nucleósidos añadidos al extremo 5', uno o más nucleósidos añadidos al extremo 3', y/o uno o más nucleósidos añadidos a la porción central.

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

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

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

Motivos de Compuestos Antisentido

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de ANGPTL3 tienen subunidades químicamente modificadas dispuestas en patrones, o motivos, para conferir a los compuestos antisentido propiedades como actividad inhibidora mejorada, afinidad de unión aumentada para un ácido nucleico objetivo, o resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*.

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

Los compuestos antisentido que tienen un motivo gapmer se consideran compuestos antisentido quiméricos. En un gapmer, una región interna que tiene una pluralidad de nucleótidos que soporta la escisión de RNasaH se posiciona 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 de hueco sirve generalmente como sustrato para la escisión de endonucleasa, mientras que los segmentos de ala comprenden nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, las regiones de un gapmer se diferencian por los tipos de fracciones de azúcar que comprenden cada región distinta. Los tipos de fracciones de azúcar que se usan para diferenciar las regiones de un gapmer pueden en algunas realizaciones incluir β -D-ribonucleósidos, β -D-desoxirribonucleósidos, nucleósidos 2'-modificados (tales nucleósidos 2'-modificados pueden incluir 2'-MOE, y 2'-O-CH₃, entre otros), y nucleósidos modificados con azúcar bicíclico (tales nucleósidos modificados con azúcar bicíclico pueden incluir aquellos que tienen un puente 4'-(CH₂)nO-2', donde n=1 o n=2). Preferiblemente, cada región distinta comprende fracciones de azúcar uniformes. El motivo del ala-hueco-ala se describe frecuentemente como "X-Y-Z", donde "X" representa la longitud de la región de ala 5', "Y" representa la longitud de la región de hueco, y "Z" representa la longitud de la región de ala 3'. Como se usa en la presente, un gapmer descrito como "X-Y-Z" tiene una configuración tal que el segmento de hueco está posicionado inmediatamente adyacente a cada uno del segmento de ala 5' y el segmento de ala 3'. Por tanto, no existen nucleótidos intermedios entre el segmento de ala 5' y el segmento de hueco, o el segmento de hueco y el segmento de ala 3'. Cualquiera de los compuestos antisentido descritos en la presente puede tener un motivo gapmer. En algunas realizaciones, X y Z son iguales, en otras realizaciones son diferentes. En una realización preferida, Y está

entre 8 y 15 nucleótidos. X, Y o Z pueden ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más nucleótidos. Por tanto, los gapmers incluyen, pero no están limitados a, por ejemplo 5-10-5, 4-8-4, 4-12-3, 4-12-4, 3-14-3, 2-13-5, 2-16-2, 1-18-1, 3-10-3, 2-10-2, 1-10-1, 2-8-2, 6-8-6, 5-8-5, 1-8-1, 2-6-2, 6-8-6, 5-8-5, 1-8-1, 2-6-2, 2-13-2, 1-8-2, 2-8-3, 3-10-2, 1-18-2, ó 2-18-2..

En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido es un motivo "wingmer", que tiene una configuración ala-hueco o hueco-ala, es decir, una configuración X-Y o Y-Z como se describe anteriormente para la configuración del gapmer. Por tanto, las configuraciones wingmer incluyen, pero no están limitadas a, por ejemplo 5-10, 8-4, 4-12, 12-4, 3-14, 16-2, 18-1, 10-3, 2-10, 1-10, 8-2, 2-13, o 5-13.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de ANGPTL3 poseen un motivo gapmer 5-10-5.

En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de ANGPTL3 tiene un motivo de hueco ampliado.

Ácidos Nucleicos Objetivo, Regiones Objetivo y Secuencias de Nucleótidos

Las secuencias de nucleótidos que codifican ANGPTL3 incluyen, sin limitación, las siguientes, la secuencia humana como se expone en el N° de acceso de GenBank BG400407.1 (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 1), N° acceso de GenBank BG562555.1 (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 2), N° de acceso de GenBank BG562798.1 (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 3), N° de acceso GenBank NM_014495.1 (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 4), N° de acceso de GenBank NT_032977.5, nucleótidos 15511702 a 15521082 (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 5), N° de acceso de GenBank AF162224.1 (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 6), N° de acceso de GenBank AI195524.1 (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 7), N° de acceso de GenBank BB717501.1 (incorporado en la presente como SEQ ID NO: 8). Se entiende que la secuencia expuesta en cada SEQ ID NO en los Ejemplos contenidos en la presente es independiente de cualquier modificación en una fracción de azúcar, un enlace internucleosídico o una nucleobase. Como tales, los compuestos antisentido definidos por una SEQ ID NO pueden comprender, independientemente, una o más modificaciones en una fracción de azúcar, un enlace internucleosídico o una nucleobase. Los compuestos antisentido descritos por el Número Isis (Isis N°) indican una combinación de secuencia de nucleobases y motivo.

En ciertas realizaciones, una región objetivo es una región estructuralmente definida del ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, una región objetivo puede abarcar una UTR 3', una UTR 5', un exón, un intrón, una unión exón/intrón, una región codificante, una región de inicio de la traducción, una región de terminación de la traducción u otra región del ácido nucleico definida. Las regiones estructuralmente definidas para ANGPTL3 pueden obtenerse por el número de acceso de bases de datos de secuencias como la NCBI. En ciertas realizaciones, una región objetivo puede abarcar la secuencia desde un sitio objetivo 5' de un segmento objetivo dentro de la región objetivo hasta un sitio objetivo 3' de otro segmento objetivo dentro de la región objetivo.

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

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

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

Se pueden encontrar segmentos objetivo adecuados dentro de una UTR 5', una región codificante, una UTR 3', un intrón, un exón o una unión exón/intrón. Los segmentos objetivo que contienen un codón de inicio o un

codón de terminación también son segmentos objetivo adecuados. Un segmento objetivo adecuado puede excluir específicamente una cierta región definida estructuralmente como el codón de inicio o el codón de parada.

La determinación de los segmentos objetivo adecuados puede incluir una comparación de la secuencia de un ácido nucleico objetivo con otras secuencias en todo el genoma. Por ejemplo, puede usarse el algoritmo BLAST 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 objetivo seleccionado (es decir, secuencias no objetivo o fuera del objetivo).

Puede haber variación en la actividad (por ejemplo, como se define mediante el porcentaje de reducción de los niveles del ácido nucleico objetivo) de los compuestos antisentido dentro de una región objetivo activa. En ciertas realizaciones, las reducciones en los niveles de ARNm de ANGPTL3 son indicativas de la inhibición de la expresión de la proteína de ANGPTL3. Las reducciones en los niveles de una proteína de ANGPTL3 también son indicativas de la inhibición de la expresión del ARNm objetivo. Además, los cambios fenotípicos, como una reducción del nivel de colesterol, LDL, triglicérido, o glucosa, pueden ser indicativos de la inhibición de la expresión de ARNm y/o proteína de ANGPTL3.

Hibridación

En algunas realizaciones, tiene lugar hibridación entre un compuesto antisentido divulgado en la presente y un ácido nucleico de ANGPTL3. El mecanismo más común de hibridación implica enlaces de hidrógeno (por ejemplo, enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o invertidos de Hoogsteen) entre nucleobases complementarias de las moléculas de ácido nucleico.

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

Los métodos para determinar si una secuencia hibrida específicamente con un ácido nucleico objetivo son bien conocidos en la técnica (Sambrooke y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, 2001). En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido proporcionados en la presente son específicamente hibridables con un ácido nucleico de ANGPTL3.

Complementariedad

Un compuesto antisentido y un ácido nucleico objetivo son complementarios entre sí cuando un número suficiente de nucleobases del compuesto antisentido puede unirse por hidrógeno con las nucleobases correspondientes del ácido nucleico objetivo, de tal manera que se producirá un efecto deseado (por ejemplo, inhibición antisentido de un ácido nucleico objetivo, tal como un ácido nucleico de ANGPTL3).

Un compuesto antisentido puede hibridar sobre uno o más segmentos de un ácido nucleico de ANGPTL3 de tal manera que los segmentos intermedios o adyacentes no están implicados en el evento de hibridación (por ejemplo, una estructura de giro, malapareamiento o estructura en horquilla).

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido proporcionados en la presente, o una porción especificada de los mismos, son, o son por lo menos, un 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% complementarios a un ácido nucleico de ANGPTL3, una región objetivo, segmento objetivo, o una porción especificada de los mismos. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido proporcionados en la presente, o una porción especificada de los mismos, son, o son por lo menos, un 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% complementarios con la secuencia de una o más de las SEQ ID NO: 1-5. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con un ácido nucleico objetivo puede determinarse usando métodos rutinarios.

Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de 20 nucleobases del compuesto antisentido son complementarias a una región objetivo, y por lo tanto hibridarían específicamente, 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 nucleobases de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleobases no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico objetivo tendría una complementariedad total del 77,8% con el ácido nucleico objetivo y caería por tanto dentro del alcance de la presente invención. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico objetivo puede determinarse de manera rutinaria usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineamiento local básico) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656). El porcentaje de homología, identidad o complementariedad de secuencia puede determinarse, por ejemplo, mediante el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research

Park, Madison W es), usando la configuración predeterminada, que usa el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482 489).

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido proporcionados en la presente, o porciones específicas de los mismos, son completamente complementarios (es decir, 100% complementarios) a un ácido nucleico objetivo, o a una porción específica del mismo. Por ejemplo, un compuesto antisentido puede ser completamente complementario a un ácido nucleico de ANGPTL3, o una región objetivo, o un segmento objetivo o secuencia objetivo del mismo. Como se usa en la presente, "completamente complementario" significa que cada nucleobase de un compuesto antisentido es capaz de emparejar bases de manera precisa con las nucleobases correspondientes de un ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, un compuesto antisentido de 20 nucleobases es completamente complementario a una secuencia objetivo que 400 nucleobases de longitud, siempre que haya una porción de 20 nucleobases correspondiente del ácido nucleico objetivo que sea completamente complementaria al compuesto antisentido. Completamente complementario también puede usarse en referencia a una porción específica del primer y/o el segundo ácido nucleico. Por ejemplo, una porción de 20 nucleobases de un compuesto antisentido de 30 nucleobases puede ser "completamente complementaria" a una secuencia objetivo que tiene 400 nucleobases de longitud. La porción de 20 nucleobases del oligonucleótido de 30 nucleobases es completamente complementaria a la secuencia objetivo si la secuencia objetivo tiene una porción de 20 nucleobases correspondiente en la que cada nucleobase es complementaria a la porción de 20 nucleobases del compuesto antisentido. Al mismo tiempo, el compuesto antisentido de 30 nucleobases completo puede ser completamente complementario a la secuencia objetivo, dependiendo de si las 10 nucleobases restantes del compuesto antisentido son también complementarias a la secuencia objetivo.

La localización 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 pueden estar en una posición interna del compuesto antisentido. Cuando están presentes dos o más nucleobases no complementarias, pueden ser contiguas (es decir, enlazadas) o no contiguas. En una realización, una nucleobase no complementaria está localizada en el segmento de ala de un oligonucleótido antisentido gapmer.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido que tienen, o tienen hasta 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ó 20 nucleobases de longitud comprenden no más de 4, no más de 3, no más de 2, o no más de 1 nucleobase(s) no complementaria(s) en relación a un ácido nucleico objetivo, como un ácido nucleico de ANGPTL3, o una porción especificada del mismo.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido que tienen, o tienen hasta 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ó 30 nucleobases de longitud comprenden no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2, o no más de 1 nucleobase(s) no complementaria(s) en relación a un ácido nucleico objetivo, como un ácido nucleico de ANGPTL3, o una porción especificada del mismo.

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

Identidad

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

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido, o porciones de los mismos, son por lo menos un 70%,

75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticos a uno o más de los compuestos antisentido o SEQ ID NOs, o una porción de los mismos, divulgados en la presente.

Modificaciones

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

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

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

Enlaces Internucleosídicos Modificados

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

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. Los enlaces internucleosídicos que contienen fósforo representativos incluyen, pero no están limitados a, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidoato, y fosforotioatos. Los métodos de preparación de enlaces que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de ANGPTL3 comprenden uno o más enlaces internucleosídicos modificados. En ciertas realizaciones, los enlaces internucleosídicos modificados son enlaces de fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico de un compuesto antisentido es un enlace internucleosídico de fosforotioato.

Fracciones de Azúcar Modificado

Los compuestos antisentido 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 mejorada, afinidad de unión aumentada o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, los nucleósidos comprenden fracciones de anillos de ribofuranosa químicamente modificados. Los ejemplos de anillos de ribofuranosa químicamente modificados incluyen sin limitación, la adición de grupos sustituyentes (incluyendo grupos sustituyentes 5' y 2', puentes de átomos del anillo no geminal para formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA), reemplazo del átomo de oxígeno del anillo de ribosilo con S, N(R) o C(R1)(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 (ver Solicitud internacional de PCT WO 2008/101157 Publicada el 21/08/08 para otros nucleósidos 5',2'-bis sustituidos divulgados) o reemplazo del átomo de oxígeno del anillo de ribosilo por S con sustitución adicional en la posición 2' (ver Solicitud de Patente U.S. publicada US2005-0130923, publicada el 16 de junio de 2005) o alternativamente sustitución 5' de un BNA (ver Solicitud internacional de PCT WO 2007/134181 Publicada el 22/11/07 en la que el LNA está sustituido con, por ejemplo, un grupo 5'-metilo o uno 5'-vinilo).

Los ejemplos de nucleósidos que tienen fracciones de azúcar modificado incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden grupos sustituyentes 5'-vinilo, 5'-metilo (R o S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH3 y 2'-O(CH2)2OCH3. El sustituyente en la posición 2' también puede seleccionarse de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C1-C10, OCF3, O(CH2)2SCH3, O(CH2)2-O-N(Rm)(Rn) y O-CH2-C(=O)-N (Rm)(Rn), donde cada Rm y Rn es, independientemente, H o alquilo C1-C10 sustituido o no sustituido.

Los ejemplos de ácidos nucleicos bicíclicos (BNA) incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo ribosilo 4' y 2'. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido proporcionados en la presente incluyen uno o más nucleósidos de BNA en los que el puente comprende una de las fórmulas: 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)-O-2' (ENA); 4'-C(CH₃)₂-O-2' (ver PCT/US2008/068922); 4'-CH(CH₃)-O-2' and 4'-C-H(CH₂OCH₃)-O-2' (ver Patente de U.S. 7.399.845, emitida el 15 de julio de 2008); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (ver PCT/US2008/064591); 4'-CH₂-ON(CH₃)-2' (ver Solicitud de Patente U.S. publicada US2004-0171570, publicada el 2 de septiembre de 2004); 4'-CH₂-N(R)-O-2' (ver Patente de EE. UU. 7,427,672, emitida el 23 de septiembre de 2008); 4'-CH₂-CH (ver Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem, 2009, 74, 118-134) (CH₃)-2' y 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (ver PCT/US2008/066154); y en donde R es, independientemente, H, alquilo C₁-C₁₂, o un grupo protector. Cada uno de los BNA anteriores incluye varias configuraciones de azúcar estereoquímicas incluyendo, por ejemplo, α-L-ribofuranosa y β-D-ribofuranosa (ver la solicitud internacional de PCT PCT/DK98/00393, publicada el 25 de marzo de 1999 como WO 99/14226). Previamente, también se han incorporado los BNA α-L-metilenoxi (4'-CH₂-O-2') en oligonucleótidos antisentido que mostraron actividad antisentido (Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372).

Informes adicionales relacionados con nucleósidos bicíclicos se pueden encontrar en la bibliografía publicada (ver, Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 8362-8379; Patentes U.S. N° 7.053.207; 6.268.490; 6.770.748; 6.794.499; 7.034.133; y 6.525.191; Elayadi et al., Curr. Opinion Invens. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol, 2001, 8, 1-7; y Orum et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; y U.S. 6.670.461; Solicitudes Internacionales WO 2004/106356; WO 94/14226; WO 2005/021570; Publicaciones de Patente U.S. N° US2004-0171570; US2007-0287831; US2008-0039618; Patentes U.S. N° 7.399.845; Patentes U.S. N° de Serie. 12/129,154; 60/989,574; 61/026,995; 61/026,998; 61/056,564; 61/086,231; 61/097,787; 61/099,844; Solicitudes Internacionales de PCT N° PCT/US2008/064591; PCT/US2008/066154; PCT/US2008/068922; y Solicitud Internacional de PCT Publicado WO 2007/134181).

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

x es 0, 1, ó 2;

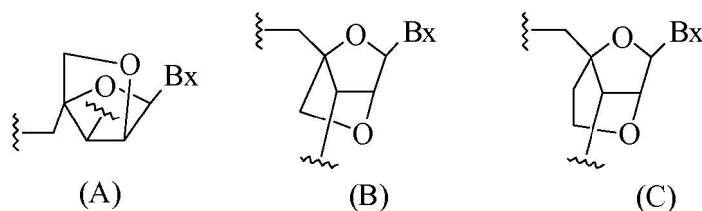
n es 1, 2, 3, ó 4;

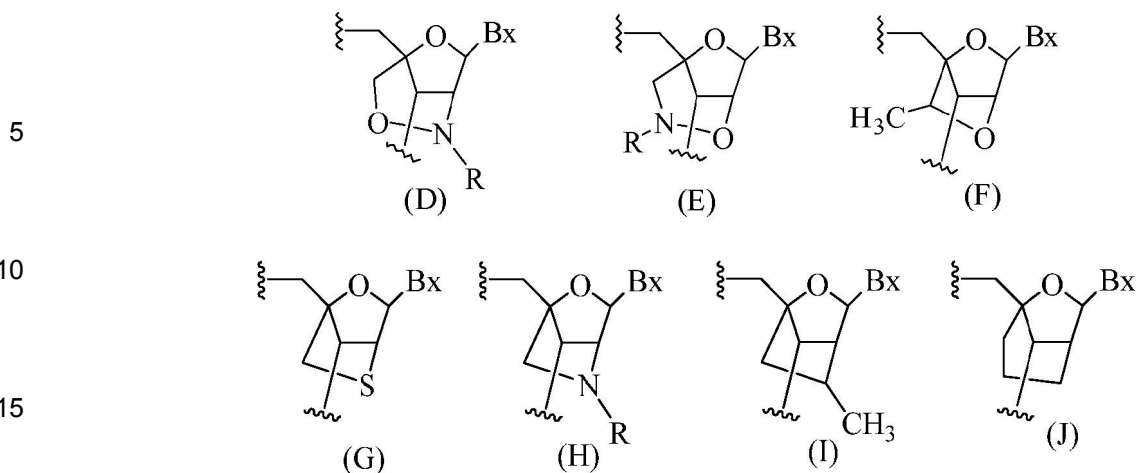
cada R_a y R_b es, independientemente, H, un grupo protector, hidroxilo, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, arilo C₅-C₂₀, arilo C₅-C₂₀ sustituido, heterociclo radical, heterociclo radical sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, 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

cada J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂, alqueno 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.

En ciertas realizaciones, el puente de una fracción de azúcar bicíclico es, -[C(R_a)(R_b)]_n-, -[C(R_a)(R_b)]_n-O-, -C(R_aR_b)-N(R)-O- or -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 donde cada R es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C₁-C₁₂.

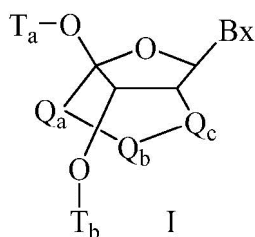
En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos incluyen, pero no están limitados a, (A) α-L-metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, (B) β-D-Metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA, (C) Etilenoxi (4'-(CH₂)₂-O-2') BNA, (D) Aminooxi (4'-CH₂-ON(R)-2') BNA, (E) Oxiamino (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA, y (F) Metil(metilenoxi) (4'-CH(CH₃)-O-2')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





20 en donde Bx es la fracción 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:



35 en la que:

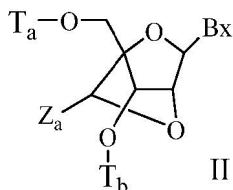
Bx es una fracción de base heterocíclica;

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

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

T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, una fracción 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:

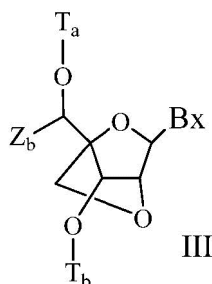
Bx es una fracción de base heterocíclica;

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

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

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

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



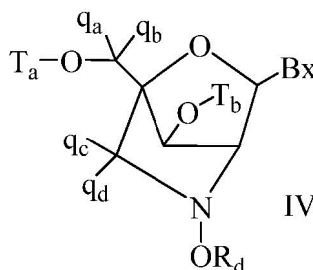
en la que:

Bx es una fracción de base heterocíclica;

T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, una fracción 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.

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



en la que:

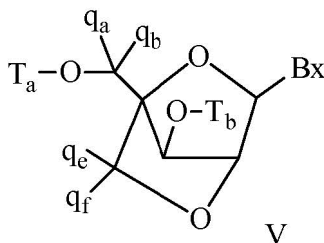
Bx es una fracción de base heterocíclica;

T_a y T_b son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, una fracción 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;

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, alcoxi C₁-C₆, alcoxi 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 una fracción de base heterocíclica;

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

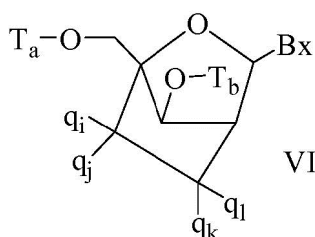
q_a, q_b, q_c y q_d son cada uno, independientemente, hidrógeno, halógeno, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, alcoxi C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂ sustituido, OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO₂J_j, NJ_jJ_k, N₃, CN, C(=O)OJ_j, C(=O)NJ_jJ_k, C(=O)J_j, O-C(=O)NJ_jJ_k, N(H)C(=NH)NJ_jJ_k, N(H)C(=O)NJ_jJ_k or N(H)C(=S)NJ_jJ_k ;
o q_e y q_f juntos son =C(qg)(qh);

q_g y q_h son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_{12} o alquilo C_1-C_{12} sustituido.

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

También se han preparado análogos de metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA y 2'-tio-BNA, (Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222). También se ha descrito la preparación de análogos de nucleósidos bloqueados que comprenden dúplex de oligodesoxirribonucleótidos como sustratos para polimerasas de ácidos nucleicos (Wengel et al., WO 99/14226). Además, se ha descrito en la técnica la síntesis de 2'-amino-BNA, un nuevo análogo de oligonucleótido de alta afinidad conformacionalmente restringido (Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039). Además, se han preparado 2'-amino- y 2'-metilamino-BNA y se ha informado anteriormente de la estabilidad térmica de sus dúplex con cadenas de ARN y ADN complementarias.

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



en la que:

B_x es una fracción de base heterocíclica;

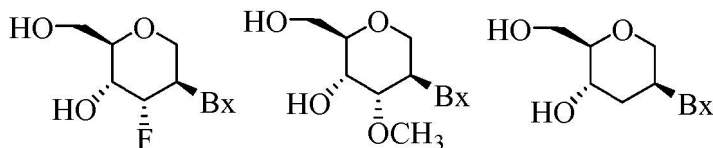
T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, una fracción fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;

cada q_i, q_j, q_k y q_l es, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_{12} , alquilo C_1-C_{12} sustituido, alqueno C_2-C_{12} , alqueno C_2-C_{12} sustituido, alquino C_2-C_{12} , alquino C_2-C_{12} sustituido, alcoxi C_1-C_{12} , alcoxi C_1-C_{12} sustituido, OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO₂J_j, NJ_jJ_k, N₃, CN, C(=O)OJ_j, C(=O)NJ_jJ_k, C(=O)J_j, O-C(=O)NJ_jJ_k, N(H)C(=NH)NJ_jJ_k, N(H)C(=O)NJ_jJ_k or N(H)C(=S)NJ_jJ_k; y

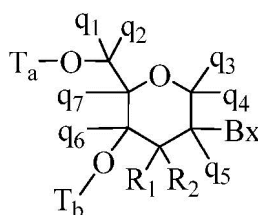
q_i y q_j o q_i y q_k juntos son =C(q_g)(q_h), en donde q_g y q_h son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_{12} o alquilo C_1-C_{12} sustituido.

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

En ciertas realizaciones, los nucleósidos se modifican mediante el reemplazo del anillo de ribosilo con un sustituto del azúcar. Dicha modificación incluye, sin limitación, el reemplazo del anillo de ribosilo por un sistema de anillo sustituto (algunas veces referidos como análogos de ADN) como un anillo morfolino, un anillo ciclohexenilo, un anillo ciclohexilo o un anillo tetrahidropirano como uno que tiene uno de la fórmula:



También se conocen en la técnica muchos otros sistemas de anillos sustitutos de azúcar biciclo y triciclo que pueden usarse para modificar nucleósidos para su incorporación en compuestos antisentido (ver, por ejemplo, el artículo de revisión: Leumann, Christian J., Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, 10, 841-854). Tales sistemas de anillos pueden someterse a varias sustituciones adicionales para mejorar la actividad. Ver por ejemplo compuestos que tienen la Fórmula VII:



VII

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

Bx es una fracción de base heterocíclica;

T_a y T_b son cada uno, independientemente, un grupo de enlace internucleosídico que enlaza el análogo de nucleósido de tetrahidropirano con el compuesto antisentido o uno de T_a y T_b es un grupo de enlace internucleosídico que enlaza el análogo de nucleósido de tetrahidropirano con el compuesto antisentido y el otro de T_a y T_b es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado enlazado o un grupo terminal 5' o 3'; q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ son cada uno independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alquenilo C₂-C₆, alquenilo C₂-C₆ sustituido, alquinilo C₂-C₆ o alquinilo C₂-C₆ sustituido; y cada uno de R₁ y R₂ se selecciona de hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alcoxi sustituido o no sustituido, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ y CN, en donde X es O, S o NJ₁ y cada J₁, J₂ y J₃ es, independientemente, H o alquilo C₁-C₆.

En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos THP modificados de fórmula VII en donde q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ son cada uno H (M). En ciertas realizaciones, por lo menos uno de q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ es distinto de H. En ciertas realizaciones, por lo menos uno de q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ es metilo. En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos THP de fórmula VII en donde uno de R₁ y R₂ es fluoro (K). En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos de THP de fórmula VII en donde uno de R₁ y R₂ es metoxietoxi. En ciertas realizaciones, R₁ es fluoro y R₂ es H; R₁ es H y R₂ es fluoro; R₁ es metoxi y R₂ es H, y R₁ es H y R₂ es metoxietoxi. Los métodos para las preparaciones de azúcares modificados son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En los nucleótidos que tienen fracciones de azúcar modificado, las fracciones de nucleobases (naturales, modificadas o una combinación de los mismos) se mantienen para la hibridación con un objetivo de ácido nucleico apropiado.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de ANGPTL3 comprenden uno o más nucleótidos que tienen fracciones de azúcar modificado. En ciertas realizaciones, la fracción de azúcar modificado es 2'-MOE. En ciertas realizaciones, los nucleótidos 2'-MOE modificados están dispuestos en un motivo gapmer. En ciertas realizaciones, la fracción de azúcar modificado es un nucleósido bicíclico que tiene un grupo puente (4'-CH(CH₃)-O-2'). En ciertas realizaciones, los nucleótidos (4'-CH(CH₃)-O-2') modificados están dispuestos a lo largo de las alas de un motivo gapmer.

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

En nucleótidos que tienen fracciones de azúcar modificado, las fracciones de nucleobases (naturales, modificadas o una combinación de los mismos) se mantienen para la hibridación con un objetivo de ácido nucleico apropiado.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de ANGPTL3 comprenden uno o más nucleótidos que tienen fracciones de azúcar modificado. En ciertas realizaciones, la fracción de azúcar modificado es 2'-MOE. En ciertas realizaciones, los nucleótidos 2'-MOE modificados están dispuestos en un motivo gapmer.

Nucleobases Modificadas

Las modificaciones o sustituciones de nucleobases (o bases) son estructuralmente distinguibles de, pero funcionalmente intercambiables con, nucleobases de origen natural o sintéticas no modificadas. Tanto las nucleobases naturales como las modificadas son capaces de participar en enlaces de hidrógeno. Tales modificaciones de nucleobases pueden impartir estabilidad de nucleasas, afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a compuestos antisentido. Las nucleobases modificadas incluyen nucleobases sintéticas y naturales como, por ejemplo, 5-metilcitosina (5-me-C). Ciertas sustituciones de nucleobases, incluyendo sustituciones de 5-metilcitosina, son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de un compuesto

antisentido para un ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2° C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278).

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

Las fracciones de bases heterocíclicas también pueden incluir aquellas en las 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, incluyendo 2 aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de ANGPTL3 comprenden una o más nucleobases modificadas. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido acortados o de hueco ampliado dirigidos a un ácido nucleico de ANGPTL3 comprenden una o más nucleobases modificadas. En ciertas realizaciones, la nucleobase modificada es 5-metilcitosina. En ciertas realizaciones, cada citosina es una 5-metilcitosina.

Composiciones y Métodos para Formular Composiciones Farmacéuticas

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

El compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de ANGPTL3 puede utilizarse en composiciones farmacéuticas combinando el compuesto antisentido con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable adecuado. Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye solución salina tamponada con fosfato (PBS). El PBS es un diluyente adecuado para su uso en composiciones que se van a administrar por vía parenteral. Por consiguiente, en una realización, en los métodos descritos en la presente se emplea una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de ANGPTL3 y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, el diluyente farmacéuticamente aceptable es PBS. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos antisentido abarcan cualquier sal, éster farmacéuticamente aceptable o sal de dicho éster, o cualquier otro oligonucleótido que, tras la administración a un animal, incluyendo un humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito o residuo biológicamente activo del mismo. Por consiguiente, por ejemplo, la divulgación también se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de compuestos antisentido, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de tales profármacos, y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, sales de sodio y potasio.

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

Compuestos Antisentido Conjugados

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

También pueden modificarse los compuestos antisentido para tener uno o más grupos estabilizadores que están generalmente unidos a uno o a ambos extremos terminales de compuestos antisentido para mejorar propiedades como, por ejemplo, estabilidad de nucleasas. Incluidas en los grupos estabilizadores están las estructuras de tapa. Estas modificaciones terminales protegen el compuesto antisentido que tiene ácidos nucleicos

terminales de la degradación por exonucleasas, y pueden ayudar a la administración y/o localización dentro de una célula. La tapa puede estar presente en el extremo terminal 5' (tapa 5), o en el extremo terminal 3' (tapa 3'), o puede estar presente en ambos extremos terminales. Las estructuras de tapa son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, tapas desoxiasísticas invertidas. Grupos estabilizadores 3' y 5' adicionales que pueden usarse para tapar uno o ambos extremos de un compuesto antisentido para impartir estabilidad a las nucleasas incluyen los divulgados en la WO 03/004602 publicada el 16 de enero de 2003.

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 de ANGPTL3 pueden probarse in vitro en una variedad de tipos de células. Los tipos de células usados para tales análisis están disponibles de vendedores comerciales (por ejemplo, American Type Culture Collection, Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walkersville, MD) y las células se cultivan de acuerdo con las instrucciones del vendedor usando reactivos comercialmente disponibles (por ejemplo, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Los tipos de células ilustrativos incluyen, pero no están limitados a, células HepG2, células Hep3B, células Huh7 (carcinoma hepatocelular), hepatocitos primarios, células A549, fibroblastos GM04281 y células LLC-MK2.

Prueba in vitro de oligonucleótidos antisentido

En la presente se describen métodos para el tratamiento de células con oligonucleótidos antisentido, que se pueden modificar apropiadamente para el tratamiento con otros compuestos antisentido.

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

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

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

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

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

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

Otra técnica usada para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye la electroporación (Sambrooke y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, 2001).

Las células se tratan con oligonucleótidos antisentido mediante métodos rutinarios. Las células se recogen típicamente 16-24 horas después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido, en cuyo momento se miden los niveles de ARN o proteína de los ácidos nucleicos objetivo mediante métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente. En general, cuando los tratamientos se realizan en múltiples repeticiones, los datos se presentan como la media de los tratamientos repetidos.

La concentración de oligonucleótido antisentido utilizado varía de línea celular a línea celular. Los métodos para determinar la concentración óptima de oligonucleótidos antisentido para una línea celular particular son bien

conocidos en la técnica. 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.

Aislamiento de ARN

El análisis de ARN puede realizarse en ARN celular total o ARNm poli(A)+. Los métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica (Sambrooke y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, 2001). El ARN se prepara usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, usando el Reactivo TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con los protocolos recomendados por el fabricante.

Análisis de la inhibición de niveles o expresión objetivo

La inhibición de los niveles o la expresión de un ácido nucleico de ANGPTL3 puede ensayarse en una variedad de formas conocidas en la técnica (Sambrooke y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, 2001). Por ejemplo, los niveles de ácido nucleico objetivo pueden cuantificarse mediante, por ejemplo, análisis de transferencia Northern, reacción en cadena de la polimerasa competitiva (PCR) o PCR cuantitativa en tiempo real. El análisis de ARN puede realizarse en ARN celular total o ARNm poli(A)+. Los métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. El análisis de transferencia de Northern también es también rutinario en la técnica. La PCR en tiempo real cuantitativa puede llevarse a cabo convenientemente usando el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM® 7600, 7700 o 7900 disponible comercialmente, disponible de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

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

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

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 se usa luego como sustrato para la amplificación por PCR en tiempo real. La RT y las reacciones de PCR en tiempo real se realizan secuencialmente en la misma muestra. Los reactivos de RT y PCR en tiempo real se obtienen de Invitrogen (Carlsbad, CA). Las reacciones de RT, y PCR en tiempo real se llevan a cabo por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

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

Las sondas y los cebadores están diseñados para hibridar con un ácido nucleico de ANGPTL3. Los métodos para diseñar sondas y cebadores de PCR en tiempo real son bien conocidos en la técnica, y pueden incluir el uso de software como el software PRIMER EXPRESS® (Applied Biosystems, Foster City, CA).

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

En la Tabla 2 se presentan cebadores y sondas usados para medir la expresión de GAPDH en los tipos de células descritos en la presente. Las sondas de PCR de GAPDH tienen JOE enlazado covalentemente al extremo 5' y TAMRA o MGB enlazados covalentemente al extremo 3', donde JOE es el colorante informador fluorescente y TAMRA o MGB es el colorante neutralizante. En algunos tipos de células, los cebadores y la sonda diseñados para una secuencia GAPDH de una especie diferente se usan para medir la expresión de GAPDH. Por ejemplo, un conjunto de sonda y cebador GAPDH humano se usa para medir la expresión de GAPDH en células y líneas celulares derivadas de mono.

Tabla 2

Cebadores y sondas GAPDH para su uso en PCR en tiempo real				
Nombre de objetivo	Especie	Descripción de Secuencia	Secuencia (5'a 3')	SEQ ID NO
GAPDH	Humano	Cebador Directo	CAACGGATTGGTCGTATTGG	15
GAPDH	Humano	Cebador Inverso	GGCAACAATATCCACTTTACCAGAGT	16
GAPDH	Humano	Sonda	CGCCTGGTCACCAGGGCTGCT	17
GAPDH	Humano	Cebador Directo	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	18
GAPDH	Humano	Cebador Inverso	GAAGATGGTGATGGGATTTC	19
GAPDH	Humano	Sonda	CAAGCTTCCC GTTCTCAGCC	20
GAPDH	Humano	Cebador Directo	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	18
GAPDH	Humano	Cebador Inverso	GAAGATGGTGATGGGATTTC	19
GAPDH	Humano	Sonda	TGGAATCATATTGGAACATG	21
GAPDH	Ratón	Cebador Directo	GGCAAATTC AACGGCACAGT	22
GAPDH	Ratón	Cebador Inverso	GGGTCTCGCTCCTGGAAGAT	23
GAPDH	Ratón	Sonda	AAGGCCGAGAATGGGAAGCTTGCA TC	24
GAPDH	Rata	Cebador Directo	TGTTCTAGAGACAGCCGCATCTT	25
GAPDH	Rata	Cebador Inverso	CACCGACCTTCACCATCTTGT	26
GAPDH	Rata	Sonda	TTGTGCAGTGCCAGCCTCGTCTCA	27

Las sondas y los cebadores para su uso en PCR en tiempo real se diseñaron para hibridar con secuencias específicas del objetivo. Los cebadores y las sondas y las secuencias de ácido nucleico objetivo con las que se hibridan se presentan en la Tabla 3. Las sondas de PCR específicas del objetivo tienen FAM enlazado covalentemente al extremo 5' y TAMRA o MGB enlazados covalentemente al extremo 3', donde FAM es el colorante fluorescente y TAMRA o MGB es el colorante neutralizante.

Tabla 3

Cebadores y sondas específicos de objetivo de genes para uso en PCR en tiempo real				
Especie	SEQ ID NO objetivo	Descripción de Secuencia	Secuencia (5 'a 3')	SEQ ID NO
Humano	4	Cebador Directo	CTTCAATGAAACGTGGGAGAACT	28
Humano	4	Cebador Inverso	TCTCTAGGCCCAACCAAAATTC	29
Humano	4	Sonda	AAATATGGTTTTGGGAGGCTTGAT	30
Ratón	6	Cebador Directo	CAGAAGTAACATCACTCAAAAGTTTTGTAG	31
Ratón	6	Cebador Inverso	GACTTAATTGTTTATACTGTTCTTCCACACT	32
Ratón	6	Sonda	CAGCAAGACAACAGCATAAGAGAACTCCTCCA	33

Análisis de los Niveles de Proteína

La inhibición antisentido de los ácidos nucleicos de ANGPTL3 puede evaluarse midiendo los niveles de proteína de ANGPTL3. Los niveles de proteína de ANGPTL3 pueden evaluarse o cuantificarse de una variedad de maneras bien conocidas en la técnica, como inmunoprecipitación, análisis de transferencia Western (inmunotransferencia), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayos de proteínas cuantitativos, ensayos de actividad de proteínas (por ejemplo, ensayos de actividad de caspasa), inmunohistoquímica,

inmunocitoquímica o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) (Sambrooke y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, 2001).) Los anticuerpos dirigidos a un objetivo pueden identificarse y obtenerse de una variedad de fuentes, tales como el catálogo de anticuerpos MSRS (Aerie Corporation, Birmingham, MI), o pueden prepararse mediante métodos convencionales de generación de anticuerpos monoclonales o policlonales bien conocidos en la técnica.

Prueba in vivo de compuestos antisentido

Los compuestos antisentido, por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido, se prueban en animales para evaluar su capacidad de inhibir la expresión de ANGPTL3 y producir cambios fenotípicos. Las pruebas pueden realizarse en animales normales o en modelos experimentales de enfermedades. Para la administración a animales, los oligonucleótidos antisentido se formulan en un diluyente farmacéuticamente aceptable, como solución salina tamponada con fosfato. La administración incluye vías de administración parenteral. Después de un período de tratamiento con oligonucleótidos antisentido, el ARN se aísla del tejido y se miden los cambios en la expresión de ácido nucleico de ANGPTL3. También se miden los cambios en los niveles de proteína de ANGPTL3.

Ciertas Indicaciones

En la presente se divulgan métodos para tratar a un individuo que comprenden administrar una o más composiciones farmacéuticas como se describe en la presente. En ciertas realizaciones, el individuo tiene una enfermedad metabólica y/o una enfermedad cardiovascular. En ciertas realizaciones, el individuo tiene aterosclerosis, esteatosis hepática o hiperlipidemia.

Por consiguiente, en la presente se divulgan métodos para mejorar un síntoma asociado con una enfermedad metabólica o una enfermedad cardiovascular. También se divulgan en la presente métodos para mejorar un síntoma asociado con aterosclerosis, esteatosis hepática o hiperlipidemia en un sujeto con necesidad de ello. En la presente se divulga un método para reducir la velocidad de aparición de un síntoma asociado con una enfermedad metabólica o una enfermedad cardiovascular. En la presente se divulga un método para reducir la velocidad de aparición de un síntoma asociado a aterosclerosis, esteatosis hepática o hiperlipidemia. En la presente se divulga un método para reducir la gravedad de un síntoma asociado con una enfermedad metabólica o una enfermedad cardiovascular. En la presente se divulga un método para reducir la gravedad de un síntoma asociado con aterosclerosis, esteatosis hepática o hiperlipidemia. En tales realizaciones, los métodos comprenden administrar a un individuo con necesidad de ello una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto dirigido a un ácido nucleico de ANGPTL3.

En ciertas realizaciones, la administración de un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de ANGPTL3 da como resultado la reducción de la expresión de ANGPTL3 en por lo menos aproximadamente un 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99%, o un intervalo definido por dos cualquiera de estos valores.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto antisentido dirigido a ANGPTL3 se usan para la preparación de un medicamento para tratar a un paciente que padece de, o es susceptible a, una enfermedad metabólica o enfermedad cardiovascular. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto antisentido dirigido a ANGPTL3 se usan para la preparación de un medicamento para tratar a un paciente que padece de, o es susceptible a, aterosclerosis, esteatosis hepática o hiperlipidemia.

En ciertas realizaciones, los métodos descritos en la presente incluyen administrar un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que tiene una porción de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 nucleobases contiguas como se describe en la presente de una secuencia enumerada en la SEQ ID NO: 34-182.

Administración

En ciertas realizaciones, los compuestos y las composiciones como se describen en la presente se administran por vía parenteral.

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

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

Ciertas Terapias de Combinación

En ciertas realizaciones, un primer agente que comprende el oligonucleótido modificado de la invención se coadministra con uno o más agentes secundarios. En ciertas realizaciones, tales segundos agentes están diseñados para tratar la misma enfermedad, trastorno o afección que el primer agente descrito en la presente. En ciertas realizaciones, tales segundos agentes están diseñados para tratar una enfermedad, trastorno o afección diferente como el primer agente descrito en la presente. En ciertas realizaciones, tales segundos agentes están diseñados para tratar un efecto secundario no deseado de una o más composiciones farmacéuticas como se describe en la presente. En ciertas realizaciones, los segundos agentes se coadministran con el primer agente para tratar un efecto no deseado del primer agente. En ciertas realizaciones, los segundos agentes se coadministran con el primer agente para producir un efecto combinatorio. En ciertas realizaciones, los segundos agentes se coadministran con el primer agente para producir un efecto sinérgico.

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 en momentos 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.

En ciertas realizaciones, los segundos agentes incluyen, pero no están limitados a, ácido ascórbico.

EJEMPLOS

Divulgación no limitativa

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

Ejemplo 1: Inhibición antisentido de tipo angiopoyetina 3 humana por compuestos oligoméricos

Se diseñó una serie de compuestos oligoméricos para dirigirse a diferentes regiones de tipo angiopoyetina 3, usando secuencias publicadas enumeradas en la Tabla 1. Los compuestos se muestran en la Tabla 4. Todos los compuestos en la Tabla 4 son oligonucleótidos quiméricos ("gapmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos por una región central de "hueco" compuesta de 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (5' y 3') por "alas" de cinco nucleótidos. Las alas están compuestas de 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, también conocidos como nucleótidos 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son fosforotioatos en todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citosina son 5-metilcitosinas. Los compuestos oligoméricos en la Tabla 4 hibridan específicamente con una molécula de ácido nucleico objetivo que codifica una tipo angiopoyetina 3 y están compuestos de regiones que aumentan la afinidad de unión, estas regiones siendo las "alas" de los compuestos oligoméricos. Los compuestos oligoméricos comprenden cada uno una región que provoca actividad de RNasa H, siendo esta región la región de "hueco".

Los compuestos se analizaron por su efecto sobre los niveles de ARNm objetivo de genes mediante PCR cuantitativa en tiempo real como se describe en otros ejemplos de la presente, usando los cebadores y sonda específicos de objetivo mostrados en la Tabla 3 (SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, y SEQ ID NO: 30). Los datos son medias de experimentos en los que las células Huh7 se trataron con 150 nM de los compuestos oligoméricos divulgados usando OLIGOFECTAMINE™. En la Tabla 4 se muestra la SEQ ID NO de la secuencia a la que se dirige cada compuesto oligomérico.

Una reducción en la expresión se expresa como porcentaje de inhibición en la Tabla 4. Si la hay, "N.D." indica "no determinado". Las regiones objetivo para las que estos compuestos oligoméricos son inhibidores se denominan en la presente "segmentos objetivo validados".

Tabla 4

Inhibición de niveles de ARNm de tipo angiopoyetina 3 humana por oligonucleótidos quiméricos que tienen alas 2'-MOE y hueco de desoxi					
N° ISIS	SEQ ID NO Objetivo	Objetivo	Secuencia (5'a 3')	% Inhib.	SEQ ID NO
337529	1	548	ATCTGTTGTGATGTCGATAA	66	34
337527	2	336	GTATTTAGTCAAGTTTAGAG	39	35
337528	2	429	TATTACAGATTTTACACAT	21	36
337526	3	33	CGTGGAAGTGTCTTCTCTG	63	37

(continuación)

Inhibición de niveles de ARNm de tipo angiopoietina 3 humana por oligonucleótidos quiméricos que tienen alas 2'-MOE y hueco de desoxi					
Nº ISIS	SEQ ID NO	Objetivo	Secuencia (5'a 3')	% Inhib.	SEQ ID NO
337459	4	22	AGCTTAATTGTGAACATTTT	73	38
337460	4	61	ATTCTGGAGGAAATAACTAG	34	39
233675	4	116	AAATCTTGATTTTGGCTCTG	61	40
233676	4	121	ATAGCAAATCTTGATTTTGG	52	41
337461	4	126	CTAACATAGCAAATCTTGAT	53	42
337462	4	131	ATCGTCTAACATAGCAAATC	43	43
337463	4	154	AGGCCATTGGCTAAAATTTT	37	44
337464	4	171	CATGTCCCAACTGAAGGAGG	41	45
337465	4	180	CTTTAAGACCATGTCCCAAC	0	46
337466	4	203	GCCCTTCGTCTTATGGACAA	28	47
337467	4	214	TCATTAATTTGGCCCTTCGT	38	48
337468	4	223	TGAAATATGTCATTAATTTG	0	49
233690	4	247	GACTGATCAAATATGTTGAG	53	50
337469	4	271	GTTTGCAGCGATAGATCATA	56	51
337470	4	277	TCACTGGTTTGCAGCGATAG	62	52
337471	4	364	AGTTCAAGTGACATATTCTT	52	53
337472	4	496	AGTGAAGTTACTTCTGGGTG	59	54
337473	4	502	GTTTAAAGTGAAGTTACTTC	50	55
337474	4	510	CTACAAAAGTTTTAAGTGAA	25	56
337475	4	558	GGTCTTCCACGGTCTGGAGA	70	57
337476	4	624	TAGTCCTTCTGAGCTGATTT	66	58
337477	4	637	GGTTCTTGAATACTAGTCCT	80	59
337478	4	648	AAATTTCTGTGGGTTCTTGA	74	60
337479	4	665	TGGCTTGGAAGATAGAGAAA	77	61
233710	4	683	AGTAGTTCCTTGGTGCTCTTG	82	62
337480	4	694	TGAAGAAAGGGAGTAGTTCT	60	63
337481	4	701	ATTCAACTGAAGAAAGGGAG	59	64
337482	4	710	TCTTATTATTATTCAACTGAA	32	65
337483	4	734	AGGAATGCCATCATGTTTTA	39	66
337484	4	762	CTCTGTTATAAATGGTGTA	65	67
337485	4	767	TTCACCTCTGTTATAAATGG	31	68
337486	4	772	GTATGTTACCTCTGTTATA	47	69

(continuación)

Inhibición de niveles de ARNm de tipo angiopoietina 3 humana por oligonucleótidos quiméricos que tienen alas 2'-MOE y hueco de desoxi					
Nº ISIS	SEQ ID NO	Objetivo	Secuencia (5'a 3')	% Inhib.	SEQ ID NO
337487	4	777	CACTTGTATGTTACCTCTG	75	70
337488	4	782	CATGCCACTTGTATGTTAC	44	71
337489	4	806	AGAGTTGCTGGGTCTGATGG	52	72
337490	4	840	CTGATATAACATCACAGTAG	54	73
337491	4	850	CATGGACTACCTGATATAAC	60	74
233717	4	862	TGAATTAATGTCCATGGACT	85	75
337492	4	874	TCTATTCGATGTTGAATTAA	13	76
337493	4	909	AGTTCTCCCACGTTTCATTG	80	77
337494	4	918	CATATTTGTAGTTCTCCAC	62	78
337495	4	923	AAAACCATATTTGTAGTTCT	25	79
337496	4	930	GCCTCCCAAAACCATATTTG	35	80
337497	4	953	GCCCAACCAAAATTCTCCAT	70	81
233721	4	959	CTCTAGGCCCAACCAAAATT	73	82
233722	4	964	ATCTTCTCTAGGCCCAACCA	91	83
337498	4	995	AACATAATTAGATTGCTTCA	26	84
337499	4	1016	GTCTTCCAACCTCAATTCGTA	56	85
337500	4	1023	CTTCCAGTCTTCCAACCTCA	38	86
337501	4	1094	AACTAGATGTAGCGTATAGT	65	87
337502	4	1162	TGATCCCAAGTAGAAAACAC	33	88
337503	4	1213	CACCAGCCTCCTGAATAACC	32	89
337504	4	1245	TTAGGTTGTTTTCTCCACAC	68	90
337505	4	1301	TAATCCTCTTCTCCTCTCTG	32	91
337506	4	1315	TGAGACTTCCAAGATAATCC	63	92
337507	4	1320	CATTTTGAGACTTCCAAGAT	48	93
337508	4	1333	GAGTATAACCTTCCATTTTG	54	94
337509	4	1364	TGGATGGATCAACATTTTGG	67	95
337510	4	1385	TTCAAAGCTTTCTGAATCTG	62	96
337511	4	1397	TGCCTCAGTTCATTCAAAGC	58	97
337512	4	1410	TGCCTTTTAAATTTGCCTCA	64	98
337513	4	1443	ATTAACCTGGAATGAGGTTA	65	99
337514	4	1450	AGACCACATTAACCTTGAAT	62	100
337515	4	1458	AGATTATTAGACCACATTAA	44	101

(continuación)

Inhibición de niveles de ARNm de tipo angiopoyetina 3 humana por oligonucleótidos quiméricos que tienen alas 2'-MOE y hueco de desoxi					
Nº ISIS	SEQ ID NO	Objetivo	Secuencia (5'a 3')	% Inhib.	SEQ ID NO
337516	4	1463	ATACCAGATTATTAGACCAC	65	102
337517	4	1470	GGATTTAATACCAGATTATT	64	103
337518	5	1678	ACTGACTTACCTGATTTTCT	0	104
337519	5	2294	ACCTTGTAAGTCTTCATTGG	52	105
337520	5	3809	CAGTGTTATTCAGATTGTAC	56	106
337521	5	4068	AGTGTCTTACCATCATGTTT	56	107
337522	5	5100	ACAGATGTAAATAACACTTT	19	108
337523	5	5252	GTCCCCTTACCATCAAGCCT	49	109
337524	5	7150	GGGAAGATACTTTGAAGATA	50	110
337525	5	7504	CACCAGCCTCCTAAAGGAGA	27	111

Ejemplo 2: Inhibición antisentido de tipo angiopoyetina 3 de ratón por compuestos oligoméricos

Se diseñó una serie de compuestos oligoméricos para dirigirse a diferentes regiones de tipo angiopoyetina 3 de ratón, usando las secuencias publicadas enumeradas en la Tabla 1. Los compuestos se muestran en la Tabla 5. Todos los compuestos de la Tabla 5 son oligonucleótidos quiméricos ("gapmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuesta por una región central de "hueco" que consiste de 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (5' y 3') por "alas" de cinco nucleótidos. Las alas están compuestas de 2'-O- (2-metoxietil) nucleótidos, también conocidos como nucleótidos 2'-MOE. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son fosforotioatos en todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citosina son 5-metilcitosinas. Los compuestos oligoméricos en la Tabla 5 hibridan específicamente con una molécula de ácido nucleico objetivo que codifica tipo angiopoyetina 3 y están compuestos de regiones que aumentan la afinidad de unión, estas regiones siendo las "alas" de los compuestos oligoméricos. Los compuestos oligoméricos comprenden cada uno una región que provoca actividad de RNasa H, esta región siendo la región "hueco".

Los compuestos se analizaron para su efecto sobre los niveles de ARNm objetivo del gen mediante PCR cuantitativa en tiempo real como se describe en otros ejemplos en la presente, usando los cebadores y sonda específicos del objetivo mostrados en la Tabla 3 (SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, y SEQ ID NO: 33). Los datos son medias de experimentos en los que los hepatocitos primarios de ratón se trataron con 150 nM de los compuestos oligoméricos divulgados usando LIPOFECTIN™. Los compuestos oligoméricos de control usados fueron las SEQ ID NO: 9 y 10. En la Tabla 5 se muestra la SEQ ID NO de la secuencia a la que se dirige cada compuesto oligomérico.

Una reducción en la expresión se expresa como porcentaje de inhibición en la Tabla 5. Si la hay, "N.D." indica "no determinado". Las regiones objetivo para las que estos compuestos oligoméricos son inhibidores se denominan en la presente "segmentos objetivo validados". Los oligonucleótidos antisentido de la Tabla 5 también pueden tener reactividad cruzada con el ARNm de ANGPTL3 humano (acceso de GENBANK NM_014495.1, incorporado en la presente como SEQ ID NO: 4), dependiendo del número de nucleobases malapareadas que el oligonucleótido murino tiene con la secuencia de ANGPTL3 humana. "Sitio de Inicio de Objetivo Humano" indica el nucleótido más 5' en el ARNm humano al que se dirige el oligonucleótido antisentido. "Sitio de Parada de Objetivo Humano" indica el nucleótido más 3' en el ARNm humano al que se dirige el oligonucleótido antisentido. Los 'malapareamientos' indican el número de nucleobases por las que el oligonucleótido murino está malapareado con la secuencia del gen humano. La designación "n/a" indica que había más de 3 malapareamientos entre el oligonucleótido murino y la secuencia del gen humano. Cuanto mayor es la complementariedad entre el oligonucleótido murino y la secuencia del gen humano, más probable es que el oligonucleótido murino pueda reaccionar de manera cruzada con la secuencia del gen humano.

Tabla 5

Inhibición de los niveles de 3 ARNm de tipo angiopoyetina de ratón por oligonucleótidos quiméricos que tienen alas 2'-MOE y separación de desoxi

Nº ISIS	SEQ ID NO Objetivo	Sitio Objetivo	Secuencia (5' a 3')	% Inhib	SEQ ID NO	Sitio de inicio de objetivo humano	Malapareamientos con objetivo humano
233671	6	19	AATAATTTAATTGTGTGCAT	13	112	n/a	n/a
233672	6	56	CACTCTGGATGCAATTACTA	66	113	n/a	n/a
233673	6	68	AAGGTCTGGATCCACTCTGG	74	114	n/a	n/a
233674	6	100	TTTGGCTCTGAAGGTGCAGA	66	115	n/a	n/a
233675	6	110	AAATCTTGATTTTGGCTCTG	80	40	116	0
233676	6	115	ATAGCAAATCTTGATTTTGG	49	41	121	0
233677	6	124	TCATCCAACATAGCAAATCT	24	116	130	2
233678	6	129	TGACATCATCCAACATAGCA	66	117	135	3
233679	6	134	AATTTTGACATCATCCAACA	76	118	140	3
233680	6	139	GCTAAAATTTTGACATCATC	72	119	145	2
233681	6	148	AGGCCATTTCGCTAAAATTTT	52	120	154	1
233682	6	160	CCCAGCTGCAGGAGGCCATT	77	121	166	2
233683	6	165	CATGACCCAGCTGCAGGAGG	51	122	171	3
233684	6	172	TTAAGTCCATGACCCAGCTG	71	123	178	3
233685	6	182	GACAAAATCTTTAAGTCCAT	27	124	188	2
233686	6	187	TTATGGACAAAATCTTTAAG	29	125	193	1
233687	6	226	TTGAGCTTCTGAAATATGTC	56	126	232	2
233688	6	231	ATATGTTGAGCTTCTGAAAT	53	127	237	2
233689	6	236	ATCAAATATGTTGAGCTTCT	47	128	242	2
233690	6	241	GACTGATCAAATATGTTGAG	73	50	247	0
233691	6	266	GGTTCGAAGTGATAGGTCAT	63	129	n/a	n/a
233692	6	317	TAGTGTAGATGTAGTTCTTC	44	130	323	2
233693	6	349	GACATGTTCTTCACCTCCTC	80	131	355	3
233694	6	365	TGAGTTCAGTTCTACTGACA	78	132	371	3
233695	6	373	TCAAGCTTTGAGTTCAGTTC	71	133	379	2
233696	6	394	GTCTTCTCTTCCAGCAGACT	71	134	n/a	n/a
233697	6	405	GTTGAAGGGCTGTCTTCTCT	75	135	n/a	n/a
233698	6	415	CTGACCTTGTTGAAGGGC	92	136	n/a	n/a
233699	6	423	CCAAAGCCCTGACCTTGTGT	60	137	n/a	n/a
233700	6	435	TTAGCTGCTCCTCCAAAGCC	68	138	n/a	n/a

(continuación)

Inhibición de los niveles de 3 ARNm de tipo angiopoyetina de ratón por oligonucleótidos quiméricos que tienen alas 2'-MOE y separación de desoxi

Nº ISIS	SEQ ID NO Objetivo	Sitio Objetivo	Secuencia (5' a 3')	% Inhib	SEQ ID NO	Sitio de inicio de objetivo humano	Malapareamientos con objetivo humano
233701	6	451	CTTAGAATTAAGTTGGTTAG	49	139	457	3
233702	6	474	GGTGCTCCTGAGCCCCAGCT	82	140	n/a	n/a
233703	6	488	TGATGTTACTTCTGGGTGCT	63	141	494	2
233704	6	511	TGCTGTTCTACAAAACCTTTT	79	142	517	3
233705	6	535	AGGAGTTCTCTTATGCTGTT	86	143	n/a	n/a
233706	6	540	TCTGGAGGAGTTCTCTTATG	58	144	n/a	n/a
233707	6	545	CACACTCTGGAGGAGTTCTC	77	145	n/a	n/a
233708	6	632	GGGTTCTTGAATACCAGTCT	58	146	638	2
233709	6	649	GAAAGAGAATTTTCTGAGGG	29	147	655	3
233710	6	677	AGTAGTTCTTGGTGCTCTTG	68	62	683	0
233711	6	730	GCAGGAAGGTCATCTTGTTTC	62	148	n/a	n/a
233712	6	739	GAGCAGTCGGCAGGAAGGTC	62	149	n/a	n/a
233713	6	778	TACACGCCACTTGTATGTTTC	55	150	784	1
233714	6	787	TTAATAGTGACACGCCACT	62	151	n/a	n/a
233715	6	816	AGACATTAAACCCTTGGGAG	47	152	n/a	n/a
233716	6	838	CTGCCTGATTGGGTATCACA	76	153	n/a	n/a
233717	6	856	TGAATTAATGTCCATGGACT	61	75	862	0
233718	6	871	CCATCTTCCGGTGTTGAAT	64	154	877	3
233719	6	884	GAAGTCCTGTGAGCCATCTT	69	155	n/a	n/a
233720	6	935	TTCTCCATCGAGCCTCCCAA	56	156	941	1
233721	6	953	CTCTAGGCCCAACCAAAATT	67	82	959	0
233722	6	958	ATCTTCTCTAGGCCCAACCA	63	83	964	0
233723	6	975	GTTGGACTATAGCATAGATC	70	157	n/a	n/a
233724	6	988	ATGTAGTTAGACTGTTGGAC	57	158	n/a	n/a
233725	6	1033	ACGTAGTGCTTGCTGTCTTT	81	159	n/a	n/a
233726	6	1055	GCCCAGGTGAAAGGAGTATT	70	160	n/a	n/a
233727	6	1081	TGTAGCGTGTAGTTGGTTTC	38	161	1087	1
233728	6	1086	CCACATGTAGCGTGTAGTTG	59	162	1092	3
233729	6	1091	CTCAGCCACATGTAGCGTGT	57	163	n/a	n/a
233730	6	1096	GCAATCTCAGCCACATGTAG	62	164	n/a	n/a

(continuación)

Inhibición de los niveles de 3 ARNm de tipo angiopoyetina de ratón por oligonucleótidos quiméricos que tienen alas 2'-MOE y separación de desoxi

N° ISIS	SEQ ID NO Objetivo	Sitio Objetivo	Secuencia (5' a 3')	% Inhib	SEQ ID NO	Sitio de inicio de objetivo humano	Malapareamientos con objetivo humano
233731	6	1138	ATCAGGTCTGTGTGCTCTGG	75	165	n/a	n/a
233732	6	1149	ATGTAGAAAACATCAGGTCT	66	166	n/a	n/a
233733	6	1160	TCTGTGATTCCATGTAGAAA	61	167	1166	3
233734	6	1186	TCTGGACAGTAGAGCTGTCC	46	168	1192	3
233735	6	1191	AACCTTTCTGGACAGTAGAGC	58	169	n/a	n/a
233736	6	1209	ACCACCAGCCACCTGAGTAA	60	170	1215	2
233737	6	1229	TTCTCCACATATGTCATTCC	56	171	n/a	n/a
233738	6	1236	GGTTGTTTTCTCCACATATG	70	172	n/a	n/a
233739	6	1277	TGGTCTGGATTTGGTTCTGG	71	173	n/a	n/a
233740	6	1283	TCTCTCTGGTCTGGATTTGG	73	174	n/a	n/a
233741	6	1324	TAGAGCTTTCTGCTCTGAGG	64	175	n/a	n/a
233742	6	1363	GTGGTGGGCTGGAGCATCAT	57	176	n/a	n/a
233743	6	1376	TGAAGCTTCTTAGGTGGTGG	55	177	n/a	n/a
233744	6	1390	TGTCTCAGTTCAGTTGAAGC	60	178	n/a	n/a
233745	6	1430	TCGGGAGGACTTTAATATTT	50	179	n/a	n/a
233746	7	13	GGAAGTTCTCCCTCCTGTCC	49	180	n/a	n/a
233747	8	202	TAACAATGAGTTTAAACCTA	17	181	n/a	n/a
233748	8	210	TCTGATCTTAACAATGAGTT	0	182	n/a	n/a

Ejemplo 3: Diseño y selección de compuestos oligoméricos en dúplex dirigidos a tipo angiopoyetina 3

Una serie de dúplex, incluyendo ARNcd y miméticos de los mismos, que comprenden compuestos oligoméricos y sus complementos se pueden diseñar para dirigirse a tipo angiopoyetina 3. La secuencia de nucleobases de la cadena antisentido del dúplex comprende por lo menos una porción de un oligonucleótido dirigido a tipo angiopoyetina 3 como se divulga en la presente. Los extremos de las cadenas pueden modificarse mediante la adición de una o más nucleobases naturales o modificadas para formar un saliente. La cadena de sentido del dúplex de ácido nucleico se diseña y se sintetiza luego como el complemento de la cadena antisentido y también puede contener modificaciones o adiciones a cualquiera de los extremos terminales. Las cadenas sentido y antisentido del dúplex comprenden de aproximadamente 17 a 25 nucleótidos, o de aproximadamente 19 a 23 nucleótidos. Alternativamente, las cadenas sentido y antisentido comprenden 20, 21 ó 22 nucleótidos.

Por ejemplo, en una realización, ambas cadenas del dúplex de ARNcd serían complementarias sobre las nucleobases centrales, teniendo cada una salientes uno o en ambos extremos terminales.

Por ejemplo, un dúplex que comprende una cadena antisentido que tiene la secuencia CGAGAGGCGGACGGGACCG (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 183) y que tiene un saliente de dos nucleobases de desoxitimidina (dT) tendría la siguiente estructura:

cgagaggcggacgggaccgTT Cadena Antisentido (SEQ ID NO: 184)

||||||||||||||||

5 TTgctctccgcctgccctggc Complemento (SEQ ID NO: 185)

Los salientes pueden variar de 2 a 6 nucleobases y estas nucleobases pueden ser o no complementarias al ácido nucleico objetivo. En otra realización, los dúplex pueden tener un saliente en solo un extremo terminal.

10 En otra realización, un dúplex que comprende una cadena antisentido que tiene la misma secuencia, por ejemplo CGAGAGGCGGACGGGACCG (SEQ ID NO: 183), puede prepararse con extremos romos (sin saliente de cadena sencilla) como se muestra:

15 cgagaggcggacgggaccg Cadena Antisentido (SEQ ID NO: 183)

||||||||||||||||

20 gctctccgcctgccctggc Complemento (SEQ ID NO: 186)

El dúplex de ARN puede ser unimolecular o bimolecular; es decir, las dos cadenas pueden ser parte de una única molécula o pueden ser moléculas separadas.

25 Las cadenas de ARN del dúplex pueden sintetizarse mediante métodos rutinarios para el experto en la técnica o adquirirse de Dharmacon Research Inc. (Lafayette, CO). Una vez sintetizadas, las cadenas complementarias son apareadas. Las cadenas simples se alicuotan y diluyen a una concentración de 50 μ M. Una vez diluida, se combinan 30 μ l de cada cadena con 15 μ l de una solución 5X de tampón de apareamiento. La concentración final de dicho tampón es 100 mM de acetato de potasio, 30 mM de HEPES-KOH pH 7.4, y 2 mM de acetato de magnesio. El volumen final es de 75 μ l. Esta solución se incuba durante 1 minuto a 90° C y luego se centrifuga durante 15 segundos. Se permite que el tubo asiente durante 1 hora a 37° C, en cuyo momento los dúplex de ARNcd se usan en experimentación. La concentración final del dúplex ARNcd es 20 μ M.

35 Una vez preparados, los compuestos en dúplex se evalúan en cuanto a su capacidad de modular tipo angiopoyetina 3. Cuando las células alcanzaron un 80% de confluencia, se trataron con compuestos en dúplex. Para células cultivadas en placas de 96 pocillos, los pocillos se lavan una vez con 200 μ l de medio de suero reducido OPTI-MEM-1™ (Gibco BRL) y luego se tratan con 130 μ l de OPTI-MEM-1™ que contiene 12 μ g/ml de LIPOFECTIN™ (Gibco BRL) y el compuesto antisentido en dúplex deseado a una concentración final de 200 nM (una proporción de 6 μ g/ml de LIPOFECTIN™ por 100 nM de compuesto antisentido dúplexM). Después de 5 horas de tratamiento, el medio se reemplaza con medio nuevo. Las células se recogen 16 horas después del tratamiento, momento en el que se aísla el ARN y se mide la reducción del objetivo mediante RT-PCR.

45 **Ejemplo 4: inhibición antisentido de tipo angiopoyetina 3 de ratón por compuestos oligoméricos: estudios de respuesta a la dosis**

Se seleccionaron tres oligonucleótidos para estudios adicionales de respuesta a la dosis. Los hepatocitos primarios de ratón se trataron con 6,25, 25, 100 o 400 nM de ISIS 233693 (SEQ ID NO: 131), ISIS 233698 (SEQ ID NO: 136), o ISIS 233725 (SEQ ID NO: 159), o el oligonucleótido de control aleatorio ISIS 113529 (gapmer 5-10-5, CTCTTACTGTGCTGTGGACA, incorporada en la presente como SEQ ID NO: 11) y se midieron los niveles de ARNm como se describe en otros ejemplos de este documento. Las células no tratadas sirvieron como el control al que se normalizaron los datos.

Los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla 6. Los datos son medias de tres experimentos y se expresan como porcentaje de inhibición en relación con el control no tratado.

Tabla 6

Inhibición de la expresión de ARNm de tipo angiopoyetina 3 en hepatocitos primarios de ratón				
Tratamiento	% De inhibición			
	Dosis (nM)			
	6,25	25	100	400
ISIS 233693	45	77	87	87
ISIS 233698	0	13	33	52
ISIS 233725	28	65	66	79
ISIS 113529	0	0	0	0

Como se muestra en la Tabla 6, ISIS 233693, 233698 y 233725 redujeron los niveles de ARNm de tipo angiopoyetina 3 de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 5: Efectos de la inhibición antisentido de tipo angiopoyetina 3: estudios in vivo en ratones C57BL/6

Se eligieron dos oligonucleótidos dirigidos a tipo angiopoyetina 3 de ratón para estudios in vivo. Se inyectó a ratones C57BL/6 macho alimentados con pienso normal dos veces a la semana con dosis de 50 mg/kg de o ISIS 233693 (SEQ ID NO: 131) o ISIS 233698 (SEQ ID NO: 136) durante dos semanas. Cada grupo de tratamiento estaba compuesto por 5 animales. Un grupo de animales recibió inyecciones de solución salina dos veces por semana durante 2 semanas. Este grupo inyectado con solución salina sirvió como el grupo de control con el que se compararon los grupos tratados con oligonucleótidos.

Después del período de tratamiento de 2 semanas, se sacrificaron los ratones y se evaluaron los niveles de ARNm de tipo angiopoyetina 3 en el hígado. Los niveles de expresión de ARNm se cuantificaron mediante PCR en tiempo real como se describe en otros ejemplos en la presente. En relación con los ratones tratados con solución salina, el ISIS 233693 provocó una disminución del 44% en los niveles de ARNm de tipo angiopoyetina 3. El ISIS 233698 provocó una disminución del 41% en los niveles de ARNm de tipo angiopoyetina 3. Los datos demuestran que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido de tipo angiopoyetina 3 puede inhibir eficazmente la expresión del ARNm objetivo en el hígado.

Al final del estudio se midieron el peso del bazo, el peso corporal y el peso del hígado. Los pesos medios de tejidos y corporales medidos (en gramos) al final del período de tratamiento se muestran en la Tabla 7. Como se muestra en la Tabla 7, el peso corporal, el peso del hígado y el peso del bazo no se vieron afectados por el tratamiento con oligonucleótidos.

Tabla 7

Efecto de la inhibición antisentido de la expresión de tipo angiopoyetina 3 en los pesos de tejidos y corporales en ratones magros			
Tratamiento	Peso corporal	Peso del hígado	Peso del bazo
Solución Salina	24	1.1	0.1
ISIS 233693	23	1.1	0.1
ISIS 233698	22	1.0	0.1

Al finalizar el estudio, se evaluaron los niveles de colesterol, HDL, LDL, triglicéridos y glucosa en suero de los animales mediante análisis de rutina usando un analizador clínico Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY). También se midieron las transaminasas ALT y AST en suero, aumentos que pueden indicar hepatotoxicidad. No se observaron niveles de AST o ALT asociados con toxicidad hepática. Los niveles de glucosa (GLUC), colesterol (CHOL), LDL, HDL y triglicéridos (TRIG) en suero medidos se presentan en la Tabla 8 como el resultado medio de cada grupo de tratamiento en mg/dl.

Tabla 8

Efecto de la inhibición antisentido de la expresión de tipo angiopoyetina 3 en glucosa, lípidos y transaminasas en suero en ratones magros					
Tratamiento	CHOL	GLU	HDL	TG	LDL
Solución Salina	80	172	58	109	14
ISIS 233693	70	251	53	72	10
ISIS 233698	87	266	67	84	12

Como se muestra en la Tabla 8, el tratamiento con ISIS 233693 e ISIS 233698 redujo los triglicéridos en suero. El tratamiento con ISIS 233693 redujo el colesterol total.

Ejemplo 6: Efectos de la inhibición antisentido de tipo angiopoyetina 3: estudios de respuesta a la dosis in vivo en ratones alimentados con alto contenido de grasa

Se informa que la raza de ratón C57BL/6 es susceptible a la formación de placa aterosclerótica inducida por hiperlipidemia. Por consiguiente, estos ratones se alimentaron con una dieta alta en grasas y se usaron en los siguientes estudios para evaluar los efectos de oligonucleótidos antisentido de tipo angiopoyetina 3 sobre la expresión de ARNm.

Se colocaron ratones C57BL/6 macho en una dieta alta en grasas que contenía un 60% de calorías de grasa (por ejemplo, Research Diet D12492, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ). Los ratones que recibieron la dieta alta en grasas se dividieron en grupos de tratamiento. Tres grupos recibieron inyecciones dos veces por semana de ISIS 233693 (SEQ ID NO: 131) a dosis de 10 mg/kg, 25 mg/kg o 50 mg/kg, durante 6 semanas. Tres grupos adicionales recibieron inyecciones dos veces por semana de ISIS 233698 (SEQ ID NO: 136) a dosis de 10 mg/kg, 25 mg/kg o 50 mg/kg, durante 6 semanas.

Un grupo de animales alimentados con alto contenido de grasa recibió inyecciones de solución salina dos veces por semana durante 6 semanas. Este grupo inyectado con solución salina sirvió como el grupo de control con el que se compararon los grupos tratados con oligonucleótidos.

Después del período de tratamiento de 6 semanas, se sacrificaron los ratones y se evaluaron los niveles de ARNm de tipo angiopoyetina 3 en el hígado. Los niveles de expresión de ARNm se cuantificaron mediante PCR en tiempo real como se describe en otros ejemplos en la presente. Los resultados se presentan en la Tabla 9 como el porcentaje de inhibición medio en relación con el control tratado con solución salina.

Tabla 9

Inhibición antisentido de la expresión de tipo angiopoyetina 3 en el hígado de ratones alimentados con alto contenido de grasa: estudio de respuesta a la dosis	
Tratamiento	% de inhibición
ISIS 233693, 10 mg/kg	73
ISIS 233693, 25 mg/kg	88
ISIS 233693, 50 mg/kg	93
ISIS 233698, 10 mg/kg	17
ISIS 233698, 25 mg/kg	39
ISIS 233698, 50 mg/kg	55

Estos datos muestran que los oligonucleótidos antisentido dirigidos al ARNm de tipo angiopoyetina 3 reducen eficazmente la expresión de ARNm objetivo en el hígado de una manera dependiente de la dosis.

El peso corporal se monitorizó durante todo el estudio. El peso del bazo, el peso de la almohadilla adiposa, y el peso del hígado se midieron al final del estudio. Los pesos medio de tejidos y cuerpo medidos al final del período de tratamiento se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Inhibición antisentido de la expresión de tipo angiopoyetina 3 en pesos de tejidos y corporal en ratones alimentados con alto contenido de grasa: estudio de respuesta a la dosis

Tratamiento	Peso corporal	Hígado	Bazo	Almohadilla adiposa
Solución Salina	36	1.2	0.1	2.1
ISIS 233693, 10 mg/kg	37	1.5	0.1	2.0
ISIS 233693, 25 mg/kg	34	1.4	0.1	1.3
ISIS 233693, 50 mg/kg	32	1.5	0.1	1.1
ISIS 233698, 10 mg/kg	38	1.4	0.1	1.8
ISIS 233698, 25 mg/kg	33	1.2	0.1	1.5
ISIS 233698, 50 mg/kg	33	1.5	0.1	1.5

Estos datos demuestran que el peso corporal, el peso del bazo y el peso del hígado no se vieron afectados. El peso de la almohadilla adiposa se redujo de una manera dependiente de la dosis mediante el tratamiento con ISIS 233698. El tratamiento con ISIS 233698 también redujo el peso de la almohadilla adiposa.

Al finalizar el estudio, se evaluaron los niveles de colesterol, triglicéridos y glucosa en suero de los animales mediante análisis de rutina usando un Analizador Clínico Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY). También se midieron las transaminasas ALT y AST en suero, aumentos que pueden indicar hepatotoxicidad, usando un Analizador Clínico Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY). Los niveles de colesterol (CHOL) y triglicéridos (TRIG) en suero medidos se presentan en la Tabla 11 como el resultado medio de cada grupo de tratamiento en mg/dl. También se muestran los niveles medios de HDL y LDL, así como los niveles medios de glucosa (GLUC). ALT y AST, que también se muestran en la Tabla 11, también se muestran como el resultado medio de cada grupo de tratamiento, en unidades internacionales/l (IU/l).

Tabla 11

Efectos de la inhibición antisentido de tipo angiopoyetina 3 en glucosa, colesterol, triglicéridos y transaminasas hepáticas en suero en ratones alimentados con alto contenido de grasa

Tratamiento	Total	AST	CHOL	HDL	LDL	TRIG	GLUC
Solución Salina	22	47	177	143	31	120	244
ISIS 233693, 10 mg/kg	23	60	151	127	23	81	263
ISIS 233693, 25 mg/kg	21	62	125	106	18	57	254
ISIS 233693, 50 mg/kg	52	79	147	125	22	44	206
ISIS 233698, 10 mg/kg	28	55	151	120	27	101	285
ISIS 233698, 25 mg/kg	16	53	135	110	23	89	248
ISIS 233698, 50 mg/kg	192	175	158	126	31	77	215

Como se muestra en la Tabla 11, en comparación con el tratamiento con solución salina, el tratamiento con ISIS 233693 o ISIS 233698 dio como resultado niveles de colesterol disminuidos y una disminuciones dependientes de la dosis de los triglicéridos en suero. El ISIS 233693 e ISIS 233698 también dieron como resultado una ligera disminución en HDL que se observa comúnmente en ratones cuando se prueban agentes hipolipidémicos debido al hecho de que los ratones, a diferencia de los humanos y otras especies, llevan el 90% de su colesterol en suero como partículas de HDL. Además, el tratamiento con ISIS 233693 disminuyó el LDL.

Ejemplo 7: Efectos de la inhibición antisentido de niveles tipo angiopoyetina 3 in vivo: triglicéridos hepáticos

La esteatosis hepática se refiere a la acumulación de lípidos en el hígado, o "hígado graso", que con

frecuencia está provocada por el consumo de alcohol, diabetes e hiperlipidemia y puede progresar a daño hepático en etapa terminal. Dadas las consecuencias perjudiciales de una condición de hígado graso, es útil identificar compuestos que prevengan o mejoren la esteatosis hepática. La esteatosis hepática se puede evaluar tanto mediante la medición del contenido de triglicéridos en tejidos como mediante el examen histológico del tejido hepático.

En una realización adicional, se evaluó el contenido de triglicéridos en el tejido hepático en los animales descritos en el Ejemplo 6. El contenido de triglicéridos en el tejido hepático se midió usando el ensayo Triglyceride GPO (Roche Diagnostics, Inobjetivopolis, IN). Los resultados para cada grupo de tratamiento se normalizaron para el control tratado con solución salina y se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12

Efectos de la inhibición antisentido de tipo angiopoyetina 3 en los triglicéridos hepáticos en ratones alimentados con alto contenido de grasa	
Tratamiento	% Control
ISIS 233693, 10 mg/kg	82
ISIS 233693, 25 mg/kg	54
ISIS 233693, 50 mg/kg	31
ISIS 233698, 10 mg/kg	55
ISIS 233698, 25 mg/kg	41
ISIS 233698, 50 mg/kg	47

Como se muestra en la Tabla 12, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos a tipo angiopoyetina 3 da como resultado una reducción dependiente de la dosis en los triglicéridos hepáticos.

Ejemplo 8: Efectos de la inhibición antisentido de tipo angiopoyetina 3: estudios in vivo con ISIS 233693 en ratones alimentados con alto contenido de grasa

En un estudio similar al descrito en el Ejemplo 6, se colocaron ratones C57BL/6 macho en una dieta rica en grasas que contenía un 60% de calorías de grasa (por ejemplo, Research Diet D12492, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ). Los ratones que recibieron la dieta alta en grasas se dividieron en grupos de tratamiento. Un grupo recibió inyecciones dos veces por semana de ISIS 233693 (SEQ ID No: 131) a dosis de 50 mg/kg, durante 6 semanas.

Los oligonucleótidos se disolvieron en solución salina para inyección. Un grupo de animales alimentados con alto contenido de grasa recibió inyecciones de solución salina dos veces por semana durante 6 semanas. Este grupo inyectado con solución salina sirvió como el grupo de control con el que se compararon los grupos tratados con oligonucleótidos.

Después del período de tratamiento de 6 semanas, se sacrificaron los ratones y se evaluaron los niveles de ARNm de tipo angiopoyetina 3 en el hígado. Los niveles de expresión de ARNm se cuantificaron mediante PCR en tiempo real como se describe en otros ejemplos de la presente. El ISIS 233693 provocó una reducción del 88% en los niveles de ARNm objetivo.

El peso corporal se monitorizó durante todo el estudio. Al final del estudio se midieron el peso del bazo, el peso de la almohadilla adiposa, y el peso del hígado. El peso corporal, el peso del hígado, el peso del bazo y el peso de la almohadilla adiposa medios para los animales tratados con solución salina solos fueron de 33 g, 1,2 g, 0,1 g, 0,7 g, respectivamente. El peso corporal, el peso del hígado, el peso del bazo y el peso de la almohadilla adiposa medios para los animales tratados con ISIS 233693 fueron de 31 g, 1,6 g, 0,2 g y 0,2 g, respectivamente. El tratamiento con ISIS 233693 redujo el peso de la almohadilla adiposa en un 71%.

Al finalizar el estudio, se evaluaron los niveles de colesterol, triglicéridos y glucosa en suero de los animales mediante análisis clínicos rutinarios (por ejemplo, en una instalación de pruebas clínicas como BTS, una división de Lab Corp, San Diego, CA). También se midieron las transaminasas ALT y AST en suero, y la proteína en suero, aumentos que pueden indicar hepatotoxicidad, y los niveles de bilirrubina, aumentos que pueden indicar toxicidad renal. No se observaron aumentos tóxicos como indicadores de la función hepática o renal aberrante con el tratamiento con ISIS 233693. El ISIS 233693 provocó una reducción en los niveles de triglicéridos y glucosa en suero, pero no alteró los niveles de colesterol, LDL, o HDL en suero.

La esteatosis hepática se refiere a la acumulación de lípidos en el hígado, o "hígado graso", que con frecuencia está provocada por el consumo de alcohol, diabetes e hiperlipidemia y puede progresar a daño hepático en etapa terminal. Dadas las consecuencias perjudiciales de una condición de hígado graso, es útil identificar compuestos que prevengan o mejoren la esteatosis hepática. La esteatosis hepática se puede evaluar tanto mediante la medición del contenido de triglicéridos en tejidos como mediante el examen histológico del tejido hepático.

El contenido de triglicéridos del tejido hepático se midió usando el ensayo Triglyceride GPO (Roche Diagnostics, Inobjetivopolis, IN). Los resultados medios para el grupo de tratamiento con ISIS 233693 se normalizaron para el control tratado con solución salina. El tratamiento con ISIS 233693 provocó una reducción del 75% en los niveles de triglicéridos en el hígado.

El análisis histológico se realizó mediante procedimientos rutinarios. Brevemente, se adquirieron muestras de hígado, se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% y se procesaron para la tinción de H&E y la evaluación de la morfología del hígado. Alternativamente, el tejido hepático se adquirió, se congeló, se seccionó y posteriormente se tiñó con tinción de aceite rojo O para visualizar depósitos de lípidos y se contratiñeron con eosina para marcar el citoplasma. Las muestras preparadas se evaluaron mediante microscopía óptica.

Según se evaluó mediante tinción con aceite rojo O y análisis histológico, los hígados de animales tratados con ISIS 233693 presentaron un contenido de grasa reducido en comparación con los hígados de control tratados con solución salina.

Por lo tanto, los compuestos oligoméricos dirigidos a tipo angiopoyetina 3 mejoran la esteatosis hepática según se evalúa tanto mediante la medición del contenido de triglicéridos tisulares como mediante el examen histológico del tejido hepático.

Tomados en conjunto, los estudios in vivo mostrados en la presente indican que la reducción de oligonucleótidos antisentido de tipo angiopoyetina 3 da como resultado reducciones dependientes de la dosis en el ARNm objetivo hepático, así como reducciones en los niveles de triglicéridos en suero y en el hígado. Además, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a tipo angiopoyetina 3 provocaron disminuciones en los niveles de colesterol en suero tanto en ratones magro como alimentados con alto contenido de grasa. Además, se observó una reducción en el peso de la almohadilla adiposa sin reducciones similares en el peso corporal o de órganos, lo que indica una reducción específica del objetivo en el contenido de grasa. Por lo tanto, también se divulga un método para reducir el colesterol en suero, los triglicéridos en suero, los triglicéridos hepáticos o el peso de la almohadilla adiposa para afecciones como la hiperlipidemia.

Ejemplo 9: Efectos de la inhibición antisentido de tipo angiopoyetina 3 en la aterosclerosis: tratamiento con ISIS 233693 en de ratones LDLr^{-/-}

El efecto de ISIS 233693 como agente antiaterosclerótico se evaluó en ratones knockout receptores de LDL alimentados con una dieta hipercolesterolémica; un modelo utilizado para estudiar la aterosclerosis (Ishibashi et al., J Clin. Invest. mayo1994; 93: 1885-93).

Tratamiento

Se alimentaron ratones C57B1/6 con knockout del gen del receptor de LDL (Jackson Labs, N° 2207) con una dieta Harlan Tekland, TD 94059 (37% de grasa KCal, la mitad de manteca de cacao, 1,25% de colesterol). Cuatro semanas después del inicio de la dieta, los ratones se dividieron en dos grupos que consistían de 6-8 ratones cada uno para el tratamiento. El primer grupo recibió inyecciones subcutáneas dos veces a la semana de ISIS 233693 (SEQ ID No: 131) a dosis de 25 mg/kg, durante 16 semanas. El segundo grupo recibió inyecciones subcutáneas dos veces a la semana del oligonucleótido de control malapareado, ISIS 141923 (CCTTCCCTGAAGGTTCTCC, incorporado en la presente como SEQ ID NO: 187) a dosis de 25 mg/kg, durante 16 semanas.

Los oligonucleótidos se disolvieron en solución salina para inyección. Un grupo de animales alimentados con alto contenido de grasa recibió inyecciones de solución salina dos veces por semana durante 16 semanas. Este grupo inyectado con solución salina sirvió como el grupo de control con el que se compararon los grupos tratados con oligonucleótidos.

Se tomaron muestras de sangre cada 4 semanas. Al final del período de tratamiento, los ratones se sacrificaron y se recogieron el hígado y la aorta para su análisis posterior.

Análisis de ARN

Se extrajo el ARN del tejido hepático para el análisis por PCR en tiempo real de ANGPTL3 usando un conjunto de cebador sonda de ANGPTL3 (secuencia directa CACCTGGGCAGTCACGAAA, designada en la presente como SEQ ID NO: 188, secuencia inversa GGAGGGCCCCAGGGATAT, designada en la presente como SEQ ID NO: 189; secuencia sonda CACGCTACATGTGGCTGAGATTCGTGG, designada en la presente como SEQ ID NO: 190). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de ANGPTL3 murino, en relación al control de PBS. Como se muestra en la Tabla 13, el tratamiento con ISIS 233693 dio como resultado una reducción significativa del ARNm de ANGPTL3 en comparación con el control de PBS. El tratamiento con el oligonucleótido control, ISIS 141923, no dio como resultado una reducción significativa de ANGPTL3, como se esperaba.

Tabla 13

Inhibición de ARNm de ANGPTL3 en hígado de ratón LDLr ^{-/-} en relación con el control de PBS	
	% de inhibición
ISIS 141923	13
ISIS 233693	90

Niveles de colesterol y lípidos

Los triglicéridos en plasma e hígado, y el colesterol se extrajeron mediante el método de Bligh y Dyer (Bligh, E y Dyer, W, Can J Biochem Physiol, 37, 911-917, 1959) y se midieron con el uso de un kit de triglicéridos comercialmente disponible (DCL Triglyceride Reagent; Diagnostic Chemicals Ltd.). Los resultados se presentan en las Tablas 14-17. La Tabla 14 demuestra que el tratamiento con ISIS 233693 dio como resultado una disminución significativa en los niveles de colesterol del 58% en la semana 16 en comparación con el control de PBS. La disminución en los niveles de colesterol total fue el resultado de una disminución significativa en los niveles de colesterol LDL del 58% en comparación con el control, como se presenta en la Tabla 15. La Tabla 16 muestra una disminución de HDL que probablemente depende del modelo de ratón, como se ha detallado con anterioridad. De forma similar, la Tabla 17 demuestra que el tratamiento con ISIS 233693 disminuyó los niveles de triglicéridos en un 75% en la semana 16 en comparación con el control de PBS.

Tabla 14

Efecto sobre los niveles de colesterol totales (mg/dl) en ratones LDLr ^{-/-}					
	Semana 0	Semana 4	Semana 8	Semana 12	Semana 16
PBS	1,313	1,618	1,398	1,083	1,629
ISIS 141923	1262	1710	1624	1102	1167
ISIS 233693	1353	1070	930	558	683

Tabla 15

Efecto sobre los niveles de colesterol LDL (mg/dl) en ratones LDLr ^{-/-}					
	Semana 0	Semana 4	Semana 8	Semana 12	Semana 16
PBS	1,031	1,120	1,001	909	1,204
ISIS 141923	1022	1185	1116	902	843
ISIS 233693	1075	731	648	453	511

Tabla 16

Efecto sobre los niveles de colesterol HDL (mg/dl) en ratones LDLr ^{-/-}					
	Semana 0	Semana 4	Semana 8	Semana 12	Semana 16
PBS	154	166	169	145	300
ISIS 141923	139	171	179	171	278
ISIS 233693	153	116	103	97	159

Tabla 17

Efecto sobre los niveles de triglicéridos (mg/dl) en ratones LDLr ^{-/-}					
	Semana 0	Semana 4	Semana 8	Semana 12	Semana 16
PBS	230	177	134	140	268
ISIS 141923	180	154	164	156	159
ISIS 233693	191	68	61	72	67

Evaluación de la lesión aterosclerótica

Se evaluó la gravedad de la lesión aterosclerótica en las aortas recogidas de ratones después de perfusión con PBS, seguido de solución de PBS de formalina (5% de formalina en PBS). La aorta completa del ratón se diseccionó de la aorta ascendente proximal hasta la bifurcación de la arteria iliaca utilizando un microscopio de disección. La grasa adventicia se eliminó, y la aorta se abrió longitudinalmente, se inmovilizó plana sobre una cera de disección negra, se tiñó con Sudán IV y se fotografió con un aumento fijo. Las fotografías se digitalizaron, y las áreas aórticas totales y las áreas de lesión se calcularon usando el Adobe Photoshop versión 7.0 y el software NIH Scion Image (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/Default.html>). Los resultados, presentados en la Tabla 18, se informaron como un porcentaje del área aórtica total que contenía lesiones. Como se presentó, el tratamiento con ISI 233693 dio como resultado una disminución significativa en lesiones aórticas y la mejora de la afección aterosclerótica.

Tabla 18

Efecto en el área de lesión (% del área de la aorta total) en ratones LDLr ^{-/-}	
	área de la lesión (%)
PBS	44
ISIS 141923	40
ISIS 233693	18

Función hepática

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones en plasmas de transaminasas usando un analizador de química clínica automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron las concentraciones en plasma de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) y los resultados se presentan en las Tablas 19 y 20 expresadas en IU/l. Las mediciones se realizaron cada cuatro semanas. La semana 0 es al comienzo del tratamiento y cuatro semanas después del inicio de la dieta alta en grasas.

Tabla 19

Efecto en ALT hepáticas (IU/l) de ratones LDLr ^{-/-}					
	Semana 0	Semana 4	Semana 8	Semana 12	Semana 16
PBS	29	35	39	36	36
ISIS 141923	30	32	32	33	60
ISIS 233693	20	48	70	83	91

Tabla 20

Efecto en AST hepáticas (IU/l) de ratones LDLr ^{-/-}					
	Semana 0	Semana 4	Semana 8	Semana 12	Semana 16
PBS	49	63	61	82	73
ISIS 141923	57	57	61	60	81
ISIS 233693	51	60	90	95	108

Ejemplo 10: Efecto de la inhibición antisentido de tipo angiopoyetina 3 en ratones LDLr^{-/-} transgénicos apoB100 humanos

El efecto de ISIS 233693 como agente reductor de lípidos se evaluó en ratones knockout receptores de LDL transgénicos apoB-100 humanos alimentados con una dieta hipercolesterolémica. Los ratones utilizados en estos estudios se han descrito en una publicación anterior Sanan et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 4544-4549). En resumen, esta raza de ratón es un cruce híbrido entre el ratón LDLr^{-/-} descrito originalmente por Ishibashi et al. (J. Clin. Invest. 92: 883-893), que es un híbrido de las razas 129sv y C57BL/6, y el ratón transgénico apoB-100 humano (Linton et al, J. Clin. Invest. 92: 3029-3037), que es un híbrido de las razas SJL y C57BL/6B. La reproducción indicó que los rasgos de sobreexpresión de LDLr^{-/-} y de apoB fueron homocigotos, y los ratones mostraron un aumento masivo de LDL que contenía apoB-100.

Tratamiento

Los ratones se alimentaron con una dieta Harlan Tekland, TD 88137 o "dieta occidental" (21% de grasa de leche anhidra (grasa de mantequilla), 34% de sacarosa y un total de 0,2% de colesterol). Una semana después del inicio de la dieta, los ratones se dividieron en grupos que consistían de 5 ratones cada uno para el tratamiento. La primera cohorte recibió inyecciones subcutáneas dos veces por semana de ISIS 233693 (SEQ ID No: 131) a dosis de 12,5 mg/kg, 25 mg/kg o 50 mg/kg durante 4 semanas. La segunda cohorte recibió inyecciones subcutáneas dos veces a la semana del oligonucleótido de control, ISIS 141923 (SEQ ID NO: 187) a dosis de 12,5 mg/kg o 50 mg/kg, durante 4 semanas.

Los oligonucleótidos se disolvieron en solución salina para inyección. Un grupo de animales alimentados con alto contenido de grasa recibió inyecciones de solución salina dos veces por semana durante 4 semanas. Este grupo inyectado con solución salina sirvió como el grupo de control con el que se compararon los grupos tratados con oligonucleótidos.

Los ratones se pesaron semanalmente. Al final del período de tratamiento, los ratones se sacrificaron y se recogieron muestras de sangre, hígado, riñón, bazo y almohadillas adiposas para su análisis posterior.

Análisis de ARN

Se extrajo ARN del tejido hepático para análisis por PCR en tiempo real de ANGPTL3 usando un conjunto de cebador sonda de ANGPTL3 (secuencia directa CACCTGGGCAGTCACGAAA, designada en la presente como SEQ ID NO: 187, secuencia inversa GGAGGGCCCCAGGGATAT, designada en la presente como SEQ ID NO: 188, secuencia de sonda CACGCTACATGTGGCTGAGATTCGTGG, designada en la presente como SEQ ID NO: 189) y de ARNm de ApoCIII usando un conjunto de cebador sonda de ApoCIII (Directa: TGCAGGGCTACATGGAACAA, incorporado en la presente como SEQ ID NO: 12; Inversa: CGGACTCCTGCACGCTACTT, incorporada en la presente como SEQ ID NO: 13; Sonda: CTCCAAGACGGTCCAGGATGCGC, incorporada en la presente como SEQ ID NO: 14). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de ANGPTL3 murino y ApoCIII murino, en

relación al control de PBS. Como se muestra en la Tabla 21, el tratamiento con ISIS 233693 e ISIS 233725 dio como resultado una reducción significativa dependiente de la dosis del ARNm de ANGPTL3 en comparación con el control con PBS. El tratamiento con ISIS 233693 también dio como resultado la inhibición del ARNm de ApoCIII a 50 mg/kg/semana.

También se midieron los niveles de ARN de la proteína de unión a ácidos grasos del hígado (LFABP) mediante PCR en tiempo real. Los resultados se presentan en la Tabla 21 y demuestran que la inhibición de ANGPTL3 por oligonucleótidos ISIS también influye en el transporte de ácidos grasos en el hígado, inhibiendo LFABP. El tratamiento con el oligonucleótido control, ISIS 141923, no dio como resultado una reducción significativa de ANGPTL3, LFABP o apoCIII, como se esperaba.

Tabla 21

Porcentaje de inhibición de ARNm de ANGPTL3 y LFABP en hígado de ratón en relación con el control de PBS				
ISIS No	Dosis (mg/kg)	ANGPTL3	ApoCIII	LFABP
233693	50	95	39	53
	25	90	25	12
	12.5	77	8	10
233725	50	91	27	80
	25	79	27	51
	12.5	62	12	11

Niveles de colesterol y lípidos

Los triglicéridos en plasma e hígado y el colesterol se extrajeron mediante el método de Bligh y Dyer (Bligh, E y Dyer, W, Can J Biochem Physiol, 37, 911-917, 1959.) y se midieron con el uso de un kit de triglicéridos comercialmente disponible (DCL Triglyceride Reagent; Diagnostic Chemicals Ltd.). Los resultados se presentan en la Tabla 22. El estudio demuestra que el tratamiento con ISIS 233693 e ISIS 233725 disminuyó los niveles de colesterol en un 63% y 37%, respectivamente, a 25 mg/kg/semana en comparación con el control de PBS. La disminución en los niveles de colesterol total fue principalmente el resultado de disminuciones significativas en los niveles de colesterol LDL en un 63% y 34% respectivamente, en comparación con el control, tal como se presenta. La ligera disminución en HDL puede ser dependiente del modelo de ratón como se ha detallado anteriormente ya que la disminución de HDL se observa comúnmente en ratones cuando se prueban agentes hipolipidémicos en ratones. El estudio demuestra que el tratamiento con ISIS 233693 e ISIS 233725 disminuyó los niveles de triglicéridos en un 82% y 70% respectivamente, a 25 mg/kg/semana en comparación con el control de PBS.

Por lo tanto, el tratamiento con oligonucleótidos ISIS dirigidos a ANGPTL3 provoca mejoras significativas del perfil de lípidos en plasma en este modelo de ratón.

Tabla 22

Efecto en los niveles de lípidos en plasma (mg/dl)					
	Dosis (mg/kg)	Colesterol total	HDL	LDL	Triglicéridos
PBS		2534	430	1591	1022
ISIS 141923	50	1730	347	998	945
	12.5	2489	412	1512	1168
ISIS 233693	50	982	256	585	243
	25	944	245	596	184
	12.5	1480	307	990	281
ISIS 233725	50	1407	325	862	403
	25	1587	312	1052	309
	12.5	2060	370	1366	522

Glucosa

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS en la producción de glucosa, los valores de glucosa en plasma se determinaron usando un Beckman Glucose Analyzer II (Beckman Coulter) mediante un método de glucosa oxidasa. Los resultados se presentan en la Tabla 23 y demuestran que el tratamiento con ISIS 233693 e ISIS 233725 dio como resultado una disminución de los niveles de glucosa en plasma ambos en un 40% a 50 mg/kg/semana en comparación con el control de PBS.

Tabla 23

Efecto en los niveles de glucosa en plasma (mg/dl)		
	Dosis (mg/kg)	Glucosa
PBS		341
ISIS 141923	50	334
	12.5	315
ISIS 233693	50	203
	25	261
	12.5	255
ISIS 233725	50	203
	25	280
	12.5	284

Función hepática

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones en plasma de transaminasas usando un analizador automático de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron las concentraciones en plasma de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) y los resultados se presentan en la Tabla 24 expresados en IU/l.

Como se demuestra por este estudio, el tratamiento con ISIS 233693 no produjo ningún aumento significativo en los niveles de transaminasas y, por lo tanto, no produjo ningún efecto adverso sobre la función hepática. Este ensayo, así como el análisis de ARN, establecen que el ISIS 233693 es un oligonucleótido antisentido potente y tolerable dirigido a ANGPTL3.

Tabla 24

Efecto sobre las transaminasas en plasma (IU/l)			
	Dosis (mg/kg)	Total	AST
PBS		57	80
ISIS 141923	50	61	88
	12.5	43	79
ISIS 233693	50	138	152
	25	43	70
	12.5	45	87
ISIS 233725	50	1443	736
	25	217	194
	12.5	88	138

Pesos de cuerpo y órganos

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre el peso de los órganos, se recogieron los órganos y se tomó el peso después de la finalización del estudio. Los resultados se presentan en la Tabla 25 y demuestran que el tratamiento con oligonucleótidos ISIS no tiene efecto sobre los pesos del hígado, el bazo o el riñón. El tratamiento con ISIS 233693 disminuyó el peso de la almohadilla adiposa de los ratones en un 77% a 50 mg/kg/semana en comparación con el control de PBS.

Tabla 25

Efecto en el peso de los órganos (g)					
	Dosis mg/kg/semana)	Hígado	Riñón	Bazo	Grasa
PBS		1.45	0.35	0.09	1.49
ISIS 141923	50	1.42	0.33	0.11	0.70
	12.5	1.39	0.32	0.09	0.95
ISIS 233693	50	1.65	0.33	0.15	0.35
	25	1.42	0.32	0.13	0.51
	12.5	1.49	0.35	0.11	0.89

Ejemplo 11: Efectos de la inhibición antisentido de ANGPTL3 en comparación con la inhibición de fenofibrato en ratones C57BL/6

El ISIS 233693 dirigido a ANGPTL3 de ratón en comparación con fenofibrato se evaluó en ratones C57BL/6 sin tratamiento previo. El fenofibrato es un tratamiento comercialmente disponible para hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia en sujetos y se sabe que reduce los niveles de colesterol, lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y triglicéridos, y aumenta los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Se inyectó a un grupo de cinco ratones C57BL/6 macho alimentados con pienso normal dos veces a la semana con dosis de 50 mg/kg de ISIS 233693 (SEQ ID NO: 131) durante seis semanas. Un segundo grupo de ratones se trató con fenofibrato, administrado como una alimentación por sonda diaria de 50 mg/kg/semana. Un grupo de animales recibió inyecciones de PBS dos veces por semana durante 6 semanas. Este grupo inyectado con PBS sirvió como el grupo de control con el que se compararon los grupos tratados con oligonucleótidos.

Después del período de tratamiento de 6 semanas, se sacrificaron los ratones y se evaluaron los niveles de ARNm de ANGPTL3 en el hígado. Los niveles de expresión de ARNm se cuantificaron mediante PCR en tiempo real, como se describe en otros ejemplos en la presente. En relación con los ratones tratados con PBS, el ISIS 233693 provocó una disminución del 85% en los niveles de ARNm de ANGPTL3. Los datos demuestran que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido de ANGPTL3 puede inhibir eficazmente la expresión del ARNm objetivo en el hígado.

Niveles de colesterol y lípidos

Los triglicéridos y colesterol en plasma e hígado se extrajeron mediante el método de Bligh y Dyer (Bligh, E y Dyer, W, Can J Biochem Physiol, 37, 911-917, 1959) y se midieron con el uso de un kit de triglicéridos comercialmente disponible (DCL Triglyceride Reagent; Diagnostic Chemicals Ltd.). Los resultados se presentan en la Tabla 26. El estudio demuestra que el tratamiento con ISIS 233693 disminuyó los niveles de colesterol en un 23% a 50 mg/kg/semana en comparación con el control de PBS. El estudio demuestra que el tratamiento con ISIS 233693 disminuyó los niveles de triglicéridos en un 38% a 50 mg/kg/semana en comparación con el control de PBS. El tratamiento con fenofibrato no tuvo efecto sobre los niveles de colesterol o triglicéridos.

Por lo tanto, el tratamiento con oligonucleótidos ISIS dirigidos a ANGPTL3 provoca mejoras significativas del perfil de lípidos en plasma en este modelo de ratón.

Tabla 26

Efecto en los niveles de lípidos en plasma (mg/dl)				
	Colesterol total	HDL	LDL	Triglicéridos
PBS	87	75	17	90
ISIS 233693	67	54	16	56
Fenofibrato	96	85	16	94

Glucosa

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la producción de glucosa, los valores de glucosa en plasma se determinaron usando un Beckman Glucose Analyzer II (Beckman Coulter) mediante un método de glucosa oxidasa. Los resultados se presentan en la Tabla 27 y demuestran que el tratamiento con ISIS 233693 dio como resultado una disminución de los niveles de glucosa en plasma en un 19% a 50 mg/kg/semana en comparación con el control de PBS. El tratamiento con fenofibrato no tuvo efecto sobre los niveles de glucosa.

Tabla 27

Efecto en los niveles de glucosa en plasma (mg/dl)	
	Glucosa
PBS	242
ISIS 233693	196
Fenofibrato	228

Función hepática

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, se midieron las concentraciones en plasma de transaminasas usando un analizador automático de química clínica (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron las concentraciones en plasma de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) y los resultados se presentan en la Tabla 28 expresada en IU/l.

Como se demostró por este estudio, el tratamiento con ISIS 2336393 o fenofibrato no provocó ningún aumento significativo en los niveles de transaminasas y, por lo tanto, no produjo ningún efecto adverso sobre la función hepática.

Tabla 28

Efecto sobre las transaminasas plasmáticas (IU/l)		
	Total	AST
PBS	23	83
ISIS 233693	38	70
Fenofibrato	34	70

Efecto sobre los niveles de NEFA en plasma y 3HB

Se analizaron los niveles de NEFA y 3-HB en los grupos de ratones y se muestran en la Tabla 29. Los niveles de NEFA y 3-HB, como indicadores de la oxidación de grasas, no se vieron afectados significativamente por el tratamiento con oligonucleótidos ISIS. El tratamiento con fenofibrato aumentó la oxidación de las grasas, como se indica por los aumentos en los niveles de NEFA y 3HB.

Tabla 29

Efecto en los niveles de NEFA y 3HB		
	NEFA	3HB
PBS	0.90	393
ISIS 233693	0.98	447
Fenofibrato	1.20	641

Pesos de órganos

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre el peso de los órganos, se recogieron los órganos y se tomó el peso después de la finalización del estudio. Los resultados se presentan en la Tabla 30 y demuestran que el tratamiento con ISIS 233693 no tiene efecto sobre el peso del hígado, el bazo o el riñón. El tratamiento con ISIS 233693 disminuyó el peso del tejido adiposo blanco de los ratones en un 45% a 50 mg/kg/semana en comparación con el control con PBS.

Tabla 30

Efecto en el peso de los órganos (g)				
	Hígado	Bazo	Riñón	Tejido adiposo blanco
PBS	1.1	0.12	0.35	0.53
ISIS 233693	1.3	0.1	0.35	0.29
Fenofibrato	1.3	0.08	0.37	0.39

Ejemplo 12: Efectos de la inhibición antisentido de ANGPTL3 en ratas Sprague-Dawley

Se evaluaron el ISIS 360363 (GTGACATATTCTTCACCTCT; SEQ ID NO: 191) y el ISIS 360382 (TTTAAGTGACGTTACCTCTG; SEQ ID NO: 192), ambos gapmers MOE 5-10-5 dirigidos a la secuencia de ARNm de rata SEQ ID NO: 193 (Nº de Acceso Genbank XM_233218.1) en las posiciones de inicio 333 y 476, respectivamente, en ratas Sprague Dawley.

Dos grupos de ratas Sprague Dawley alimentadas con pienso normal se inyectaron semanalmente con dosis de 50 mg/kg de ISIS 360363 o ISIS 360382 durante seis semanas. Un grupo de animales recibió inyecciones de PBS dos veces por semana durante 6 semanas. Este grupo inyectado con PBS sirvió como el grupo de control con el que se compararon los grupos tratados con oligonucleótidos.

Análisis de ARN

Se extrajo ARN del tejido hepático para análisis por PCR en tiempo real de ANGPTL3. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de ANGPTL3 de rata, en relación con el control de PBS. Como se muestra en la Tabla 31, el tratamiento con ISIS 360363 e ISIS 360382 dio como resultado una reducción significativa del ARNm de ANGPTL3 en comparación con el control de PBS.

Tabla 31

Inhibición del ARNm de ANGPTL3 en hígado de rata Sprague Dawley en relación con el control de PBS	
ISIS No	% de inhibición
360363	70
360382	89

Niveles de colesterol y lípidos

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

(DCL Triglyceride Reagent ; Diagnostic Chemicals Ltd.). Los resultados se presentan en la Tabla 26. El estudio demuestra que el tratamiento con ISIS 360363 y 360382 disminuyó los niveles de triglicéridos en un 67% y 81% respectivamente, en comparación con el control de PBS. Por lo tanto, el tratamiento con oligonucleótidos ISIS dirigidos a ANGPTL3 provoca mejoras significativas del perfil de triglicéridos en plasma en este modelo de rata. El tratamiento con oligonucleótidos ISIS en este modelo no tuvo ningún efecto sobre los niveles de colesterol total o de LDL.

Tabla 32

Efecto sobre los niveles de triglicéridos en plasma (mg/dl)	
PBS	136
ISIS 360363	45
ISIS 360382	26

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc.
Rosanne M. Crooke
Mark J. Graham
Richard Lee
Kenneth W. Dobie

<120> MODULACION DE TIPO ANGIOPOYETINA 3

<130> BIOL0120WO

<150> 61/293,604

<151> 2010-01-08

<160> 193

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 833

<212> ADN

<213> H. sapiens

<400> 1

```

attaatttca aaactaaaaa tcgtcagcac agagtatgtg taaaaatctg taatacaaat 60
ttttaaactg atgcttcatt ttgctacaaa ataatttgga gtaaatgttt gatatgattt 120
atztatgaaa cctaatagaag cagaattaaa tactgtatta aaataagttc gctgtcttta 180
aacaaatgga gatgactact aagtcacatt gactttaaca tgaggtatca ctatacctta 240
tttgttaaaa tatatactgt atacatttta tatattttaa cacttaatac tatgaaaaca 300
aataattgta aaggaatctt gtcagattac agtaagaatg aacatatttg tggcatcgag 360
ttaaagttta tatttcccct aaatatgctg tgattctaata acattcgtgt aggttttcaa 420
gtagaaataa acctcgtaac aagttactga acgtttaaac agcctgacaa gcatgtatat 480
atgtttaaaa ttcaataaac aaagacccag tccctaaatt atagaaattt aaattattct 540
tgcatgttta tcgacatcac aacagatccc taaatcccta aatccctaaa gattagatac 600
aaatttttta ccacagtatc acttgtcaga atttattttt aacatatgat tttttaaaac 660
tgccagtaag aaatttttaa tttaaccctat ttgttaagga tatagtgcc aagttaattg 720
gtgacctacc tttgtcaata cttagcataa tgtatttcaa aattatccaa tatacctgtc 780
atattaatct attatgtcca cttttttaag atatgtatga cctatgtgaa tct 833

```

<210> 2

<211> 795

<212> ADN

<213> H. sapeins

<400> 2

	ggtctaataa	tctggtatta	aatccttaag	agaaagcttg	agaaatagat	tttttttatac	60
	ttaaagtcac	tgtctatttta	agattaaaca	tacaatcaca	taaccttaaa	gaataccggt	120
	tacattttctc	aatcaaaaatt	cttataatac	tatttgTTTT	aaattttgtg	atgtgggaat	180
5	caatttttaga	tggtcacaat	ctagattata	atcaataggt	gaacttatta	aataactttt	240
	ctaaataaaa	aatttagaga	cttttatttt	aaaaggcatc	atatgagcta	atatcacaac	300
	tttcccagtt	taaaaaacta	gtactcctgt	taaaactcta	aacttgacta	aatacagagg	360
	actggttaatt	gtacagttct	taaatgttgt	agtattaatt	tcaaaaactaa	aaatcgtcag	420
	cacagagtat	gtgtaaaaat	ctgtaataca	aattttttaa	ctgatgcttc	attttgctac	480
10	aaaataattt	ggagtaaatg	tttgatatga	tttatttatg	aaacctaattg	aagcagaatt	540
	aaatactgta	ttaaaaataag	ttcgctgtct	ttaaacaatt	ggagatgact	actaagtcac	600
	attgacttta	acatgaggta	tcactatacc	ttattgttaa	acatatatac	tgtatacatt	660
	ttatatattt	taacacttaa	tactatgaaa	acaaataatt	gtaaggaatc	ttgtcagatt	720
	acagtaagaa	tgaacatatt	tgtggcatcg	agttaaagtt	tatatttccc	ctaaaatatg	780
15	cttgtgattc	taata					795

<210> 3

<211> 743

<212> ADN

20 <213> H. sapiens

<400> 3

	atatatagag	ttaagaagtc	taggtctgct	tccagaagaa	aacagttcca	cgttgcttga	60
25	aattgaaaat	caagataaaa	atgttcacaa	ttaagctcct	tctttttatt	gttcctctag	120
	ttatttcctc	cagaattgat	caagacaatt	catcatttga	ttctctatct	ccagagccaa	180
	aatcaagatt	tgctatgtta	gacgatgtaa	aaatttttagc	caatggcctc	cttcagttgg	240
	gacatggtct	taaagacttt	gtccataaga	cgaaggggcc	aaatttattg	gacatatattc	300
30	aaaaactcaa	catatttgat	cagtcttttt	atgatctatc	gctgcaaacc	agtgaaatca	360
	aagaagaaga	aaaggaactg	agaagaacta	catataaact	acaagtcaaa	aatgaagagg	420
	taaagaatat	gtcacttgaa	ctcaactcaa	aacttgaaag	cctcctagaa	gaaaaaattc	480
	tacttcaaca	aaaagtgaag	tatttagaag	agcaactaac	taacttaatt	caacaatcaa	540
	cctgaaactc	cagaacaccc	agaagtaact	tcacttaaaa	ctttgtagaa	aaacaagata	600
35	atagcatcaa	agaccttctc	cagaccgtgg	aagaccaata	taaacaatta	aaccaacagc	660
	aaaaaacaaa	caatcacaca	cacacacaca	ccaacacaac	tctttttggc	gccccattgc	720
	cctccaaaaa	aattttttaa	cac				743

<210> 4

40 <211> 1496

<212> ADN

<213> H. sapiens

<400> 4

45

50

55

60

65

	ggcacgagga	aaatcaagat	aaaaatgttc	acaattaagc	tccttctttt	tattgttcct	60
	ctagttat	cctccagaat	tgatcaagac	aattcatcat	ttgattctct	atctccagag	120
	ccaaaatcaa	gatttgctat	gttagacgat	gtaaaaat	tagccaatgg	cctccttcag	180
5	ttgggacatg	gtcttaaaga	ctttgtccat	aagacgaagg	gccaaattaa	tgacatat	240
	caaaaactca	acatat	tcagtctttt	tatgatctat	cgctgcaa	cagtgaatc	300
	aaagaagaag	aaaaggaact	gagaagaact	acatat	tacaagtcaa	aatgaagag	360
	gtaaagaata	tgtcacttga	actcaactca	aaacttgaaa	gcctcctaga	agaaaaaatt	420
	ctacttcaac	aaaaagtga	atatttagaa	gagcaactaa	ctaactta	tcaaaatcaa	480
10	cctgaaactc	cagaacaccc	agaagtaact	tcacttaaaa	cttttgtaga	aaaacaagat	540
	aatagcatca	aagaccttct	ccagaccgtg	gaagaccaat	ataaacaatt	aaaccaacag	600
	catagtcaaa	taaaagaaat	agaaaatcag	ctcagaagga	ctagtattca	agaaccaca	660
	gaaat	tatcttccaa	gccaagagca	ccaagaacta	ctcccttct	tcagttgaat	720
	gaaataagaa	atgtaaaaca	tgatggcatt	cctgctgaat	gtaccaccat	ttataacaga	780
15	ggtgaacata	caagtggcat	gtatgccatc	agaccagca	actctcaagt	ttttcatgtc	840
	tactgtgatg	ttatatcagg	tagtccatgg	acattaattc	aacatcgaat	agatggatca	900
	caaaacttca	atgaaacgtg	ggagaactac	aaatatggtt	ttgggaggct	tgatggagaa	960
	ttttggttgg	gcctagagaa	gatatactcc	atagtgaagc	aatctaatta	tgttttacga	1020
20	attgagttgg	aagactggaa	agacaacaaa	cattatattg	aatattcttt	ttacttggga	1080
	aatcacgaaa	ccaactatac	gctacatcta	gttgcgatta	ctggcaatgt	ccccaatgca	1140
	atcccggaaa	acaaagattt	ggtgttttct	acttgggatc	acaaagcaaa	aggacacttc	1200
	aactgtccag	agggttattc	aggaggctgg	tggtggcatg	atgagtgtgg	agaaaaaac	1260
	ctaaatggtg	aatataacaa	accaagagca	aaatctaagc	cagagaggag	aagaggatta	1320
25	tcttgaagt	ctcaaatgg	aaggttatac	tctataaaat	caaccaaatt	gttgatccat	1380
	ccaacagatt	cagaaagctt	tgaatgaact	gaggcaaat	taaaaggcaa	taatttaaac	1440
	attaacctca	ttccaagtta	atgtggtcta	ataatctggt	attaaatcct	taagag	1496

<210> 5
 <211> 9381
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

35	ttccaaaaga	actaaagtac	agtttgagaa	atgcatactt	aattcattac	ttttttcccc	60
	tcaactttta	taataaattt	acccaacaaa	aaagtttatt	tttgacttgt	aaatctctta	120
	aaatcataaa	aaagtaaaat	tagcttttaa	aaacaggtag	tcaccatagc	attgaatgtg	180
40	tagtttataa	tacagcaaag	ttaaatacaa	tttcaaatta	cctattaagt	tagttgctca	240
	tttctttgat	ttcatttagc	attgatctaa	ctcaatgtgg	aagaaggtta	cattcgtgca	300
	agttaacacg	gcttaatgat	taactatggt	cacctaccaa	ccttaccttt	tctgggcaaa	360
	tattggtata	tatagagtta	agaagtctag	gtctgcttcc	agaagaaaac	agttccacgt	420
	tgcttgaaat	tgaaaatcaa	gataaaaatg	ttcacaatta	agctccttct	ttttattgtt	480
45	cctctagtta	tttctccag	aattgatcaa	gacaattcat	catttgattc	tctatctcca	540
	gagccaaaat	caagatttgc	tatgttagac	gatgtaaaaa	ttttagccaa	tggcctcctt	600

50

55

60

65

	cagttgggac	atgggtcttaa	agactttgtc	cataagacga	agggccaaat	taatgacata	660
	tttcaaaaac	tcaacatatt	tgatcagtct	ttttatgatc	tatcgctgca	aaccagtga	720
	atcaaagaag	aagaaaagga	actgagaaga	actacatata	aactacaagt	caaaaatgaa	780
5	gaggtaaaga	atatgtcact	tgaactcaac	tcaaaaacttg	aaagcctcct	agaagaaaaa	840
	atttctacttc	aacaaaaagt	gaaatattta	gaagagcaac	taactaactt	aattcaaaat	900
	caacctgaaa	ctccagaaca	cccagaagta	acttcactta	aagtaagtag	aaaataaaga	960
	gggttcacgt	ttatgttttc	aatgtggatc	ttttaaaaaa	aatattttcta	aggcatgccca	1020
	tttgaaatac	tttggtgcat	tggtgaaata	cttttttttc	caagaaaaat	aatctccaga	1080
	aaataaaatt	tcctattata	atttcaagtt	agttttttgt	ttccctaagt	ttatatatga	1140
10	aaacactgaa	aatttgcatt	ttatatgaaa	attacaaatc	ggttaaatta	tacaatctag	1200
	aacactatgt	cattacacta	ttgtaaatta	ctgaaggtaa	gtaaaaagtt	aaaaaaaaatt	1260
	taaaactatt	ctccagtgtt	taaaacagat	taaataatac	agtaaatgga	aaagattttat	1320
	tcatatgaaa	atatgtctggg	ctttttcttt	taattgaagt	tcagaaaaatc	aaattttaga	1380
	gatagtacaa	tttaaaataa	atgttaagga	caaaaatatg	tgctatttga	aagaagcata	1440
15	caaggggaag	gaattgccaa	tattcatttt	tcaaatccat	tattagttta	aaaattttaga	1500
	ttatgatagt	gttacaggaa	attaatagaa	aagaaagagg	aaagcaactt	ataaccaacc	1560
	tactctctat	atccagactt	ttgtagaaaa	acaagataat	agcatcaaa	accttctcca	1620
	gaccgtggaa	gaccaatata	aacaattaaa	ccaacagcat	agtcaataa	aagaaataga	1680
	aaatcaggt	agtcagtatt	ttaatggat	gtcccacttt	tcacacaggt	tcgataaaaac	1740
20	actgaatcct	aaaatttatt	acaagcttta	actggatcat	gagtaaaatt	atcacatcag	1800
	cataactgtt	aaaattgcag	gctctgaagc	taataaaacta	cctgcattta	aacctaggct	1860
	ctaaaacttt	gtgtgacctt	gaataaatta	cttcacccct	ttatctctca	gtttcctcac	1920
	atatactaca	aagataataa	cagaacttat	aggattattg	taagaaaaaa	aatttaattca	1980
	tagcagccaa	tgctatctta	ctaaaattca	aattagatca	tgttttctctt	tgctcaaaac	2040
25	cacacaatga	ctttccattt	cactcatatt	ggctcttttag	accaagatta	cccaaccctt	2100
	cgtcatctca	ctgacttcac	ctcctctact	ctagtatttc	tgaccgcttt	accgatattc	2160
	aaacacatca	aacatactgc	cacctcaaag	cctttgcccct	tggtgtttcc	tctaactgga	2220
	acgctcttct	gccctgggtat	ctacgtggcc	cactctctga	tttcccttag	ggctggtatc	2280
	aaacaaaaaa	ttcccaatga	agacttacaa	ggtcacttaa	ccaaaaatca	caaccgcctg	2340
30	gtcccatccc	tgaaaaacttc	tacttcctta	gctacttttc	tcttgacacac	tcacctttat	2400
	ttaacataac	ataaaattttt	gttattttatc	tcttctattc	ctgcactaaa	atgtaagctc	2460
	tgtgaatata	gggattttttt	ccattattctt	catatttttcc	attattttgta	tataactcag	2520
	aatatagaat	actgtatggc	acacagtagg	catttctggt	gaattaataa	atgtaactgc	2580
	atattcacac	agaagcgtgt	gctatgatta	ttattacttg	gattactaga	aatagtgtgc	2640
35	ctcataatta	aaggtaacaa	ttcaacaatg	taattaatct	acaatgtaaa	catctggtga	2700
	agtgcagag	ggaagcactt	gttttagaaaa	aagctatgtc	agaatccatg	tattctaata	2760
	tgagtagaaa	tagtttaaaa	atattaataa	tactctcaaa	cagctattca	agaggattca	2820
	aaaaacataa	tataaaactca	gagaaactgg	taaacaaaaat	catttttcaag	agatataaaa	2880
	caaatattat	taccaattttc	cactaaacaa	acataatggt	agtagtgctg	ctaaaagggtt	2940
40	ttttatcaac	tacttttggt	ttccatactt	tccttcttat	gatgttatta	ttctaatttc	3000
	ttttcaatta	tatctttttac	tatgattaaa	tgaacctgct	ccccaaagca	aatgtttact	3060
	atagtaatat	acattgtgtc	taaaaataaa	aatgtgtgaa	gaaacccaaa	caatgaattt	3120
	ctgagttgga	agaagagtta	gatcatttaa	ctttctcata	tttaaattaa	aaaaacaaaa	3180
	ctctaaaaat	ttaagtaact	ttaagatcac	atagttactt	agtagaaaag	agtaataacc	3240
45	agcaagcaaa	ctttacaata	gataaggtcc	aataaggtcc	taggaaatat	cattcatgcc	3300
	agcatcaaaa	aactaacact	aataatgcaa	gatattatat	attctgcttt	tcttactgtc	3360
	aatgagaaaa	actatcattc	aataaattgc	aaacccaaca	cacttaataa	aaaataaaat	3420
	gttactgcta	aactaacgat	aaactactga	atatatagaa	agtaagcaaa	caacttgcc	3480
	aacctgocaa	catctacaga	tatgtttaca	ggtcaaaaat	tatcaaatga	tcaagaaagc	3540
50	ctggttcaaa	ttatgtatta	tgtctttatc	acaggtctga	agatcagtaa	gacctaaaa	3600
	tgaaaattat	taaaacttaa	atctgaacag	aatatcaaat	atattttatt	catataaata	3660
	aaagaatata	ttacaatatt	ctaagcaaa	cagctctctac	ttttggcctt	gctctgtttt	3720
	ccgaccaatg	tctgcttttt	tgcttgcctt	tattttttta	tcttattaaa	taatgtccct	3780
	gattaaatat	tttgagaaca	ggtaatctgt	acaatctgaa	taacactggt	tatctaaata	3840
	tcaaacaccg	ttataacatt	atgaactgaa	agacaaactg	tacttctgac	atccttactc	3900
55	agatttcccc	taattgtata	ttcagtatca	ttttaaaaaa	cagattttata	ttctttttatc	3960
	agctcagaag	gactagtatt	caagaaccga	cagaaatttc	tctatcttcc	aagccaagag	4020
	caccaagaac	tactcccttt	cttcagttga	atgaaataag	aaatgtaaaa	catgtggta	4080
	agacactttg	gtgggttttc	ttcttgaagc	tattattatc	aaattcccta	ttcttagggac	4140
	ttgttctaga	ctaaaagata	gttaagagat	atccatcaaa	tacaatgtat	caacctaaac	4200
60	tgatgctgg	ggttcttttt	acaccctata	aaagacatac	ctaagacaat	cagagaaata	4260
	caaatatgga	cttgattatt	agataatata	gaaggtttat	taattttctt	agatgtgatc	4320
	atggtattgc	agttttaaag	gagaacaatc	tcctgtttta	gagatacatg	ctgaaatatt	4380
	tacggagtta	aaggtcactg	gactccagac	tggtgataga	acaagactct	gtctctaaaa	4440
65	aataattaat	tttttaaaag	aaaatagttt	ggtaagatga	ttcttacatt	cttaataaac	4500

	acgccatcta	agaaaaatgc	tttaacataa	acattactga	aaaaatgcta	catttgccac	4560
	aacttcataa	aatgtcaagt	gaaatctcaa	gctccaaaga	tattattcct	attactaaat	4620
	ctgatgtaat	aacattttat	tgattctagg	cattcctgct	gaatgtacca	ccattttataa	4680
	cagaggtgaa	catacaagtg	gcatgtatgc	catcagaccc	agcaactctc	aagtttttca	4740
5	tgtctactgt	gatgttatat	caggtaaaac	ctgtctaagg	agaatagaca	gtagttagtt	4800
	caacttactc	attacgtatt	aggaagatta	acctgggtat	cattgtttta	tacatatata	4860
	tatgaaatat	atatgagtat	tcgtataaat	ataatacttt	taccttggtt	atgtattttac	4920
	tcaatattct	ccttttcctc	taaaataatc	tgaagtgact	attatcaata	agtttactat	4980
	gccaaaattc	attaattgcc	tttcacttaa	cttttgggac	cataataaat	aataaaatgt	5040
10	attgccataa	cattaataaa	ctaccttaca	aaaccaccaa	ttaaaatcaa	acaaacaaaa	5100
	aagtgttatt	tacatctgtc	aacataaatc	tactaaaaat	acatgatttc	attcattata	5160
	ttcaggtagt	ccatggacat	taattcaaca	tcgaatagat	ggatcacaaa	acttcaatga	5220
	aacgtgggag	aactacaaat	atggttttgg	gaggcttgat	ggtaagggga	ctacattcaa	5280
	tcattcattc	acttgcta	ctacaaatat	tacttgagaa	cctcttatgg	accaggtatt	5340
15	aggaaaagta	gtaacgaacg	agaagcagtc	tcagccttca	tataatttat	tatcaaacaa	5400
	ttacacattt	gttagtaaat	tacacttatt	acaactgtta	ttatttgaat	tatatttatc	5460
	acaattacat	gtctgttctt	aaatatactt	atcacaaatt	aattccacgg	cttacaatga	5520
	tcataactat	aattattaaa	gacaattttg	attaaatggt	atgtcataag	tagtaactgt	5580
	tacaaaatag	ctgtgaaaag	aacctactct	agcattagtc	actctattct	ctcattacg	5640
20	ttttacatat	caattaattg	gaagttaaaa	ggaccaggaa	actcagacat	acagtataca	5700
	ttttaaaatt	tcaattattt	aaatataata	tatagaatgt	atggcttata	atgaattagt	5760
	taactcaatg	caaattattc	tatttttgatt	acaaatagta	aaataagcaa	gataaaaata	5820
	cagatgttta	aaatccaaaa	agcacatata	aaaatccatg	aatgatgtct	aagtactcac	5880
	ttataaagta	gaagacattc	attattatat	caaattttta	aatgctcagt	actatttgac	5940
25	cattttaaaa	ttttgtattc	aaactaccag	tgaagccctt	acctagaagg	tatactcagt	6000
	gataagtttt	gtagctccaa	atcttcta	agttagtgta	accccaaat	aaaaggctga	6060
	caggtaagtc	gagaatactc	acttaattct	ggtaagaaag	caaccattt	gtacttgtat	6120
	ttaccagcaa	tccttaaaat	gaagcttcct	actaactcaa	tagcaataag	acaatagtga	6180
	atgtttaatg	aaaacagtat	tttataaata	ctttaataaa	aaggattgtg	atgaagaaca	6240
30	atctattttat	atttgttatt	tgttttta	tccaataaaa	ataattttta	aaattacaga	6300
	aaaaagttat	taagaaccat	gcttttaaat	ttaaaatgat	tttttaaat	tattcctgtc	6360
	tttttctaca	aaagaaagcat	acattaagca	aaataccaaag	gccagggtta	catttgaaga	6420
	aagtgcacatt	attattactc	aagtctctag	gaatacttaa	cacatctctt	gactgtatat	6480
	ggatgttaat	aaatagctga	cagtaaagtt	tatccatata	aagacttgca	aatattcctc	6540
35	taccaatgac	gagactttta	aatatctata	ataatgtaac	acatttcact	ggtgaaacat	6600
	gtcttgatcat	atgcattata	gaaaggataa	tcagactttc	agttatatta	atatttttaa	6660
	cattttttgtg	cacatagcta	tcttcaataa	aattgtttta	aaagggtatta	ttttaagata	6720
	cactaaaatg	atcaagggat	tcaagactaa	acaactcaat	tagttgcacc	aataaaaaac	6780
	acttaaaaaa	actgtcagtg	tccaacctgt	acttaataac	tcacagattt	ttaaaacttt	6840
40	tcttttcagg	agaatttttg	ttgggcctag	agaagatata	ctccatagtg	aagcaatcta	6900
	attatgtttt	acgaattgag	ttggaagact	ggaaagacaa	caaacattat	attgaatatt	6960
	ctttttactt	gggaaatcac	gaaaccaact	atacgctaca	tctagttgcg	attactggca	7020
	atgtccccaa	tgcaatcccg	gaaaacaaag	atttggtgtt	ttctacttgg	gatcacaaaag	7080
	caaaaggaca	cttcaactgt	ccagaggggt	attcaggtat	ctttttctga	taccaatact	7140
45	ttattttcat	atcttcaaa	tatctccca	cattattagc	tattatctgc	aatgacaact	7200
	tttaaaaatc	cgaatcccaa	ataagcgttt	tctctctaga	cgaaaacctc	ttaaactataa	7260
	tgaaagtgtt	cattctagtt	caatcaggta	ttttacctct	aatcttctc	agattttcta	7320
	ttttttggta	gtgtatagat	tatttatata	gattatttaa	aattgggact	tatacagatt	7380
	attttaaaact	gggatacatg	catctaaaac	actgtaatat	ttataagaaa	ggaagataaa	7440
50	cttacgggga	aatacagtaa	cagtaactac	atacgagtct	gtacccatta	aattgcata	7500
	ctatctcctt	taggaggtcg	gtgggtggcat	gatgagtgtg	gagaaaacaa	cctaaatggt	7560
	aaatataaca	aaccaagagc	aaaatctaag	ccagagagga	gaagaggatt	atcttggaag	7620
	tctcaaaatg	gaaggttata	ctctataaaa	tcaaccaaaa	tggtgatcca	tccaacagat	7680
	tcagaaagct	ttgaatgaac	tgaggcaaat	ttaaaaggca	ataattttaa	cattaacctc	7740
	attccaagtt	aatgtggtct	aataatctgg	tattaaatcc	ttaagagaaa	gcttgagaaa	7800
55	tagatttttt	ttatctttaa	gtcactgtct	atttaagatt	aaacatacaa	tcacataacc	7860
	ttaaagaata	ccgtttacat	ttctcaatca	aaattcttat	aatactattt	gttttaaatt	7920
	ttgtgatgtg	ggaatcaatt	ttagatggtc	acaactaga	ttataatcaa	tagtggaact	7980
	tatttaataa	cttttctaaa	taaaaaat	agagactttt	atttttaaag	gcatcatatg	8040
	agctaataatc	acaactttcc	cagtttaaaa	aactagtact	cttggtaaaa	ctctaaactt	8100
60	gactaaatac	agaggactgg	taattgtaca	gttctttaat	gttgtagtat	taatttcaa	8160
	actaaaaatc	gtcagcacag	agtatgtgta	aaaatctgta	atacaaat	ttaaactgat	8220
	gcttcatttt	gctacaaaat	aatttggagt	aaatgtttga	tatgatattt	ttatgaaacc	8280
	taatgaagca	gaattaaata	ctgtattaaa	ataagttcgc	tgtcttttaa	caaatggaga	8340
65	tgactactaa	gtcacattga	ctttaacatg	aggatcact	ataccttatt	tgttaaaata	8400

5	tatactgtat	acatthttata	tattthtaaca	cttaataacta	tgaaaaacaaa	taattgtaaa	8460
	ggaatcttgt	cagattacag	taagaatgaa	catatthtggt	gcatcgagtt	aaagthttata	8520
	thttccctaa	atatgctgtg	attctaatac	attcgtgtag	gtthttcaagt	agaaataaac	8580
	ctcgtaacaa	gttactgaac	gtthtaaacag	cctgacaagc	atgtatatat	gtthtaaaatt	8640
	caataaacaa	agaccagtc	cctaaattat	agaaatttaa	attattcttg	catgtttatc	8700
	gacatcacaa	cagatcccta	aatccctaaa	tccctaaaga	ttagatacaa	atthttttacc	8760
	acagtatcac	ttgtcagaat	ttatthtttaa	atatgattth	ttaaaactgc	cagtaagaaa	8820
	thtttaaatta	aaccatthtg	ttaaaggata	tagtgcccaa	gttatatggt	gacctacctt	8880
10	tgtcaatact	tagcattatg	tattthcaaat	tatccaatat	acatgtcata	tatatthttta	8940
	tatgtcacat	atataaaaaga	tatgtatgat	ctatgtgaat	cctaagtaaa	tattthgttc	9000
	cagaaaagta	caaaataata	aaggtaaaaa	taatctataa	thtttcaggac	cacagactaa	9060
	gctgtcgaaa	ttaacgctga	thttthttagg	gccagaatac	caaaatggct	cctctcttcc	9120
	cccaaaattg	gacaatthtca	aatgcaaaat	aattcattat	ttaatatatg	agttgcttcc	9180
15	tctatthtggt	thcctthaaaa	aaaaaaaaaa	ctctcatagg	acatgtthtca	thttgttctc	9240
	thtcaggagta	gtaaattaga	cgtthttcccc	atataaagct	thttthctacc	agaaagatac	9300
	thtctggtaga	agaagagaaa	ggagctctth	atggttcaca	cgactgtctc	ctgtccctaac	9360
	tactthtgctt	aaagtgtctca	a				9381

20 <210> 6
 <211> 1449
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

25 <400> 6

30	aataattgag	acaaaaaaat	gcacacaatt	aaattattcc	thtttgtht	tcctthtagta	60
	attgcatcca	gagtggatcc	agacctthtca	tcattthgatt	ctgcaccttc	agagccaaaa	120
	tcaagattth	ctatgtthgga	tgatgtcaaa	atthttagcga	atggcctcct	gcagctgggt	180
	catggactta	aagattthtg	ccataagact	aagggacaaa	ttaacgacat	atthtcagaag	240
	ctcaacatat	ttgatcagtc	thttthtatgac	ctatcacttc	gaaccaatga	aatcaaaagaa	300
	gaggaaaagg	agctaagaag	aactacatct	acactacaag	ttaaaaacga	ggaggtgaag	360
	aacatgtcag	tagaactgaa	ctcaaagctt	gagagtctgc	tggaaagagaa	gacagccctt	420
35	caacacaagg	tcagggctth	ggaggagcag	ctaaccaact	taattctaag	cccagctggg	480
	gctcaggagc	accagaagt	aacatcactc	aaaagtthttg	tagaacagca	agacaacagc	540
	ataagagaa	tcctccagag	tgtggaagaa	cagtataaac	aattaagtca	acagcacatg	600
	cagataaaa	aaatagaaaa	gcagctcaga	aagactggta	ttcaagaacc	ctcagaaaaat	660
	tctctthtct	ctaaatcaag	agcaccaaga	actactcccc	ctcttcaact	gaacgaaaca	720
40	gaaaatacag	aacaagatga	ccttcctgcc	gactgctctg	ccgtthtataa	cagaggcgaa	780
	catacaagt	gcgtgtacac	tattaaacca	agaaactccc	aagggtthtaa	tgtctactgt	840
	gatacccaat	caggcagtc	atggacatta	attcaacacc	ggaaagatgg	ctcacaggac	900
	ttcaacgaaa	catgggaaaa	ctacgaaaag	ggctthtggga	ggctcgatgg	agaattthtgg	960
	ttgggcctag	agaagatcta	tgtatatagtc	caacagtcta	actacattth	acgactcgag	1020
45	ctacaagact	ggaaagacag	caagcactac	gttgaatact	cctthtcacct	gggcagtcac	1080
	gaaaccaact	acacgctaca	tgtggctgag	attgctggca	atatccctgg	ggccctccca	1140
	gagcacacag	acctgatgtt	thtctacatgg	aatcacagag	caaagggaca	gctctactgt	1200
	ccagaaagt	actcaggtgg	ctggtggtgg	aatgacatat	gtggagaaaa	caacctaaat	1260
50	ggaaaataca	acaaaccag	aaccaaatcc	agaccagaga	gaagaagagg	gatctactgg	1320
	agacctcaga	gcagaaagct	ctatgctatc	aaatcatcca	aaatgatgct	ccagcccacc	1380
	acctaagaag	cttcaactga	actgagacaa	aataaaagat	caataaatta	aatattaaag	1440
	tcctccga						1449

55 <210> 7
 <211> 510
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

60 <400> 7

65

	tgttggccta	ctggacagga	gggagaagtt	ccaaattgct	taaaattgaa	taattgagac	60
	aaaaaatgca	cacaattaaa	ttattccttt	ttgttggtcc	tttagtaatt	gcattccagag	120
	tggatccaga	cctttcatca	tttgattctg	caccttcaga	gccaaaatca	agatttgcta	180
5	tgttggatga	tgtcaaaaatt	ttagcgaatg	gcctcctgca	gctgggtcat	ggacttaaag	240
	attttgtcca	taagactaag	ggacaaaatta	acgacatatt	tcagaagctc	aacatatttg	300
	atcagtcttt	ttatgaccta	tcacttcgaa	ccaatgaaat	caaagaagag	gaaaaggagc	360
	taagaagaac	tacatctaca	ctacaagtta	aaaacgagga	ggtgaagaac	acttcagtag	420
	aactgaactc	aaagcttgag	agtctgctgg	aagagaagac	agcccttcaa	cacaaggtca	480
10	gggctttgga	ggagcagcta	accaaacttaa				510

<210> 8

<211> 271

<212> ADN

15 <213> Mus musculus

<400> 8

20	gagggatcta	ctggagacct	cagagcagaa	agctctatgc	tatcaaataca	tccaaattga	60
	tgtctccaccc	caccacctaa	gaagcttcaa	ctgaactgag	acaaaataaa	agatcaataa	120
	attaaatatt	aaattcctcc	cgatcactgt	agtaatctgg	tattaaaatt	ttaatggaaa	180
	gcttgagaat	tgaatttcaa	ttagggttaa	actcattggt	aagatcagat	atcaccgaat	240
	caacgtaaac	aaaatttatc	tttttcaatc	t			271

25 <210> 9

<220>

30 <223> Oligonucleótido Sintético

<400> 9
000

35 <210> 10

<220>

<223> Oligonucleótido Sintético

40 <400> 10
000

<210> 11

<211> 20

45 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Oligonucleótido Sintético

<400> 11
ctcttactgt gctgtggaca 20

<210> 12

55 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Cebador

<400> 12
tgcagggcta catggaacaa 20

65 <210> 13

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 13
 10 cggactcctg cacgctactt 20
 <210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sonda
 <400> 14
 20 ctccaagacg gtccaggatg cgc 23
 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 15
 caacggattt ggtcgtattg g 21
 <210> 16
 <211> 26
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 16
 ggcaacaata tccactttac cagagt 26
 <210> 17
 45 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> Sonda
 <400> 17
 cgctgtgtca ccagggtgc t 21
 55 <210> 18
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador
 <400> 18
 65 gaaggtgaag gtcggagtc 19

5 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 10 <400> 19
 gaagatgggtg atgggatttc 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 20 <400> 20
 caagcttccc gttctcagcc 20
 <210> 21
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 30 <400> 21
 tggaatcata ttggaacatg 20
 <210> 22
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Cebador
 <400> 22
 ggcaaattca acggcacagt 20
 45 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador
 <400> 23
 gggctctcgct cctggaagat 20
 55 <210> 24
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sonda
 <400> 24
 65 aaggccgaga atgggaagct tgtcatc 27

5 <210> 25
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 10 <400> 25
 tgttctagag acagccgcat ctt 23

 <210> 26
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 26
 caccgacctt caccatcttg t 21

 <210> 27
 <211> 24
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Sonda

 <400> 27
 ttgtgcagtg ccagcctcgt ctca 24

 35 <210> 28
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Cebador

 <400> 28
 cttcaatgaa acgtgggaga act 23
 45 <210> 29
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador

 <400> 29
 55 tctctaggcc caaccaaact tc 22

 <210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 65 <400> 30

aaatatggtt ttggaggct tgat 24

5 <210> 31
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Cebador
<400> 31
cagaagtaac atcactcaaa agttttgtag 30

15 <210> 32
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Cebador
<400> 32
gacttaattg ttatactgt tcttcacac t 31

25 <210> 33
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Sonda
<400> 33
cagcaagaca acagcataag agaactctc ca 32

35 <210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético
<400> 34
atctgttg atgtcgataa 20

45 <210> 35
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético
<400> 35
gtatttagtc aagtttagag 20

55 <210> 36
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético

65

<400> 36
 tattacagat ttttacacat 20

 5 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 37
 cgtggaactg ttttctctg 20

 15 <210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 38
 agcttaattg tgaacattt 20
 25 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 39
 attctggagg aaataactag 20
 35 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 45 <400> 40
 aaatcttgat ttggctctg 20

 <210> 41
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 55 <400> 41
 atagcaaadc ttgatttgg 20

 <210> 42
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> Oligonucleótido Sintético

<400> 42
 ctaacatagc aaatcttgat 20
 5 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 43
 atcgtctaac atagcaaadc 20
 15 <210> 44
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 44
 25 aggcattgg ctaaaatttt 20
 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 35 <400> 45
 catgtcccaa ctgaaggagg 20
 <210> 46
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 45 <400> 46
 cttaagacc atgtccaac 20
 <210> 47
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 47
 gccctcgtc ttatggacaa 20
 60 <210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 48
 tcattaattt ggcccttcgt 20
 5
 <210> 49
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 49
 15 tgaaatatgt cattaattg 20
 <210> 50
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 25 <400> 50
 gactgatcaa atatgttgag 20
 <210> 51
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 35 <400> 51
 gttgcagcg atagatcata 20
 <210> 52
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 52
 tcactggttt gcagcगतag 20
 50 <210> 53
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 53
 agttcaagtg acatatctt 20
 60 <210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 5 <400> 54
 agtgaagtta cttctgggtg 20

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

 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 15 <400> 55
 gttttaagtg aagttacttc 20

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

 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 25
 <400> 56
 ctacaaaagt ttaagtgaa 20

 <210> 57
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 57
 ggtcttcac ggtctggaga 20

 40 <210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 58
 tagtcctct gagctgattt 20
 50
 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 59
 60 ggtcttgaa tactagtcct 20

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

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 5 <400> 60
 aaatttctgt ggttcttga 20
 <210> 61
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 15 <400> 61
 tggcttggaa gatagagaaa 20
 <210> 62
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 25 <400> 62
 agtagttctt ggtgctcttg 20
 <210> 63
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 35 <400> 63
 tgaagaaagg gagtagttct 20
 40 <210> 64
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 64
 50 attcaactga agaaagggag 20
 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 60 <400> 65
 tcttatttca tcaactgaa 20
 <210> 66
 <211> 20
 65 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 5
 <400> 66
 aggaatgcca tcatgttta 20
 <210> 67
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 67
 ctctgttata aatggtgta 20
 20 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 68
 30 ttcacctctg ttataaatgg 20
 <210> 69
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 69
 40 gtatgttcac ctctgttata 20
 <210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 50 <400> 70
 cactgtgatg ttcacctctg 20
 <210> 71
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 60 <400> 71
 catgccactt gtatgttcac 20
 <210> 72
 65 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 72
 agagttgctg ggtctgatgg 20

 10 <210> 73
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 73
 ctgatataac atcacagtag 20
 20
 <210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 74
 30 catggactac ctgatataac 20

 <210> 75
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 40 <400> 75
 tgaattaatg tccatggact 20

 <210> 76
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 50
 <400> 76
 tctattcgat gttgaattaa 20

 <210> 77
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 77
 agttctccca cgtttcattg 20

 65 <210> 78

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 78
 catatttgta gttctccac 20
 10 <210> 79
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 79
 20 aaaaccatat ttgtagtct 20
 <210> 80
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 30 <400> 80
 gcctcccaa accatattg 20
 <210> 81
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 40 <400> 81
 gcccaaccaa aattctccat 20
 <210> 82
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 82
 ctctaggccc aaccaaatt 20
 55 <210> 83
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 83
 atcttctcta ggccaacca 20
 65

5 <210> 84
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 10 <400> 84
 aacataatta gattgctca 20
 <210> 85
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 20 <400> 85
 gtctccaac tcaattcgta 20
 <210> 86
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 30 <400> 86
 cttccagtc ttccaactca 20
 <210> 87
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 87
 aactagatgt agcgtatagt 20
 45 <210> 88
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 88
 55 tgatcccaag tagaaaacac 20
 <210> 89
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 65 <400> 89

caccagcctc ctgaataacc 20

5 <210> 90
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético
<400> 90
ttaggtgtt ttccacac 20

15 <210> 91
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético
<400> 91
taatcctctt ctcctctcg 20

25 <210> 92
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético
<400> 92
tgagacttc aagataatcc 20

35 <210> 93
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético
<400> 93
cattttgaga cttcaagat 20

45 <210> 94
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético
<400> 94
gagtataacc ttccatttg 20

55 <210> 95
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético

65

<400> 95
 tggatggatc aacatttgg 20
 5 <210> 96
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 96
 ttcaaagctt tctgaatctg 20
 15 <210> 97
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 97
 tgccctcagtt cattcaaagc 20
 25 <210> 98
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 98
 35 tgccctttaa attgcctca 20
 <210> 99
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 45 <400> 99
 attaactgg aatgaggta 20
 <210> 100
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 55 <400> 100
 agaccacatt aactggaat 20
 <210> 101
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 65 <223> Oligonucleótido Sintético

<400> 101
 agattattag accacattaa 20
 5 <210> 102
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 102
 ataccagatt attagaccac 20
 15 <210> 103
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 103
 25 ggatttaata ccagattatt 20
 <210> 104
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 35 <400> 104
 actgacttac ctgattttct 20
 <210> 105
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 45 <400> 105
 acctgtaag tcttcattgg 20
 <210> 106
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 106
 cagtgttatt cagattgtac 20
 60 <210> 107
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 107
 agtgtcttac catcatgttt 20
 5
 <210> 108
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 108
 15 acagatgtaa ataacacttt 20
 <210> 109
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 25 <400> 109
 gtccccttac catcaagcct 20
 <210> 110
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 35 <400> 110
 gggaagatac ttgaagata 20
 <210> 111
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 111
 caccagcctc ctaaaggaga 20
 50 <210> 112
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 112
 aataatttaa ttgtgtgcat 20
 60 <210> 113
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 5 <400> 113
 cactctggat gcaattacta 20

 <210> 114
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 15 <400> 114
 aaggtctgga tccactctgg 20

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

 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 25
 <400> 115
 ttggctctg aaggtgcaga 20

 <210> 116
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 116
 tcatccaaca tagcaaatct 20

 40 <210> 117
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 117
 50 tgacatcatc caacatagca 20

 <210> 118
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 118
 60 aattttgaca tcatccaaca 20

 <210> 119
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 5 <400> 119
 gctaaaattt tgacatcatc 20
 <210> 120
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 15 <400> 120
 aggccattcg ctaaaattt 20
 <210> 121
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 25 <400> 121
 cccagctgca ggaggccatt 20
 <210> 122
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 35 <400> 122
 catgacccag ctgcaggagg 20
 40 <210> 123
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 123
 50 ttaagtccat gaccagctg 20
 <210> 124
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 60 <400> 124
 gacaaaatct ttaagtccat 20
 <210> 125
 <211> 20
 65 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 5 <400> 125
 ttatggacaa aatctttaag 20
 <210> 126
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 126
 ttgagcttct gaaatatgtc 20
 <210> 127
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 127
 atatgttgag cttctgaaat 20
 30 <210> 128
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 128
 40 atcaaatatg ttgagcttct 20
 <210> 129
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 50 <400> 129
 gggtcgaagt gataggtcat 20
 <210> 130
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 60 <400> 130
 tagtgtagat gtagttctc 20
 <210> 131
 65 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 131
 gacatgttct tcacctctc 20

 10 <210> 132
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 132
 tgagttcagt tctactgaca 20
 20
 <210> 133
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 133
 30 tcaagcttg agttcagtc 20

 <210> 134
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 40 <400> 134
 gtcttctctt ccagcagact 20

 <210> 135
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 50
 <400> 135
 gttgaagggc tgtcttctc 20

 <210> 136
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 136
 ctgacctgt gttgaagggc 20

 65 <210> 137

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 137
 ccaaagccct gaccttgtgt 20
 10 <210> 138
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 138
 20 ttagctgctc ctcaaagcc 20
 <210> 139
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 30 <400> 139
 cttagaatta agttggtag 20
 <210> 140
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 40 <400> 140
 ggtgctcctg agccccagct 20
 <210> 141
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 141
 tgatgttact tctgggtgct 20
 55 <210> 142
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 142
 65 tgctgttcta caaaactttt 20

5 <210> 143
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 10 <400> 143
 aggagtcttc ttatgctgtt 20
 <210> 144
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 20 <400> 144
 tctggaggag ttctcttatg 20
 <210> 145
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 30 <400> 145
 cacactctgg aggagtcttc 20
 <210> 146
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 146
 gggttcttga ataccagtct 20
 45 <210> 147
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 147
 gaaagagaat ttctgaggg 20
 55 <210> 148
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 148
 65 gcaggaaggt catctgttc 20

5 <210> 149
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 10 <400> 149
 gagcagtcgg caggaaggtc 20
 <210> 150
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 20 <400> 150
 tacacgccac ttgtatgttc 20
 <210> 151
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 151
 ttaatagtg acacgccact 20
 35 <210> 152
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 152
 agacattaaa ccctgggag 20
 45 <210> 153
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 153
 55 ctgcctgatt gggtatcaca 20
 <210> 154
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 65 <400> 154

ccatctttcc ggtgtgaat 20

5 <210> 155
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético
<400> 155
gaagtcctgt gagccatctt 20

15 <210> 156
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético
<400> 156
ttctccatcg agcctcccaa 20

25 <210> 157
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético
<400> 157
gttggactat agcatagatc 20

35 <210> 158
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético
<400> 158
atgtagttag actgttgac 20

45 <210> 159
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético
<400> 159
acgtagtgtct tgctgtcttt 20

55 <210> 160
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido Sintético

65

<400> 160
 gccacaggtga aaggagtatt 20
 5 <210> 161
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 161
 ttagcgtgt agtgggttc 20
 15 <210> 162
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 162
 ccacatgtag cgtgtagttg 20
 25 <210> 163
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 163
 35 ctccagccaca ttagcgtgt 20
 <210> 164
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 45 <400> 164
 gcaatctcag ccacatgtag 20
 <210> 165
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 55 <400> 165
 atcaggtctg tggctctgg 20
 <210> 166
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 65 <223> Oligonucleótido Sintético

<400> 166
 atgtagaaaa catcaggtct 20
 5 <210> 167
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 167
 tctgtgattc catgtagaaa 20
 15 <210> 168
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 168
 25 tctggacagt agagctgtcc 20
 <210> 169
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 35 <400> 169
 aactttctgg acagtagagc 20
 <210> 170
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 45 <400> 170
 accaccagcc acctgagtaa 20
 <210> 171
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 171
 ttctccacat atgtcattcc 20
 60 <210> 172
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 172
 ggtgttttc tccacatatg 20
 5
 <210> 173
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 173
 15 tggctctggat ttggttctgg 20
 <210> 174
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 25 <400> 174
 tctctctggt ctggattgg 20
 <210> 175
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 35 <400> 175
 tagagctttc tgctctgagg 20
 <210> 176
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 176
 gtggtgggct ggagcatcat 20
 50 <210> 177
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 177
 60 tgaagcttct taggtggtgg 20
 <210> 178
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 5 <400> 178
 tgtctcagtt cagttgaagc 20

 <210> 179
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 15 <400> 179
 tcgggaggac ttaatatatt 20

 <210> 180
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 25 <400> 180
 ggaacttctc cctcctgtcc 20

 <210> 181
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 181
 taacaatgag tttaaaccta 20

 40 <210> 182
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 182
 50 tctgatctta acaatgagtt 20

 <210> 183
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 <400> 183
 60 cgagaggcgg acgggaccg 19

 <210> 184
 <211> 21
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 5 <400> 184
 cgagaggcgg acgggaccgt t 21
 <210> 185
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 15 <400> 185
 ttgctctccg cctgccctgg c 21
 <210> 186
 <211> 19
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 25 <400> 186
 gctctccgcc tgccctggc 19
 <210> 187
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 35 <400> 187
 ccttcctga aggttctcc 20
 <210> 188
 <211> 19
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 45 <400> 188
 cacctgggca gtcacgaaa 19
 <210> 189
 <211> 18
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 189
 60 ggaggggccc agggatat 18
 <210> 190
 <211> 27
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

5 <400> 190
cacgctacat gtggctgaga ttogtgg 27

<210> 191
<211> 20
10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

15 <400> 191
gtgacatatt cttcacctct 20

<210> 192
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

25 <400> 192
tttaagtac gttacctctg 20

<210> 193
<211> 1272
<212> ADN
<213> Rattus norvegicus

30

35 <400> 193

	atgcacacaa	ttaagctgct	ccttttttgtt	gttcctctag	taatttcgctc	cagagttgat	60
	ccagaccttt	cgccatttga	ttctgtaccg	tcagagccaa	aatcaagatt	tgctatgttg	120
	gatgatgtca	aaattttagc	caatggcctc	ctgcagctgg	gtcatggtct	taaagatttt	180
40	gtccataaga	caaagggaca	aattaatgac	atatttcaga	agctcaacat	atgtgatcag	240
	tggtttttatg	acctatcact	tcaaaccaat	gaaatcaaag	aagaggaaaa	ggagctaaga	300
	agaaccacat	ctaaactaca	agttaaaaac	gaagagggtga	agaatatgtc	acttgaactg	360
	aactcaaagc	ttgaaagtct	actggaggag	aagatggcgc	tccaacacag	agtcagggct	420
	ttggaggaac	agctgaccag	cttggttcag	aacccgcctg	gggctcggga	gcacccagag	480
45	gtaacgtcac	ttaaaagttt	tgtagaacag	caagataaca	gcataagaga	actcctccag	540
	agtgtggaag	aacaatataa	acaactaagt	caacagcaca	ttcagataaa	agaaatagaa	600
	aatcagctca	gaaagactgg	cattcaagaa	cccactgaaa	attctcttta	ttctaaacca	660
	agagcaccaa	gaactactcc	ccctcttcat	ctgaagggaag	caaaaaatat	agaacaagat	720
50	gatctgcctg	ctgactgctc	tgccatttat	aacagagggtg	aacatacaag	tggcgtgtat	780
	actattagac	caagcagctc	tcaagtgttt	aatgtctact	gtgacaccca	atcaggagaa	840
	ttctggtttg	gcctagagaa	gatctacgct	atagtcaaac	agtctaacta	catcttacga	900
	ctggagctac	aagactggaa	ggacagcaag	cactatgctg	aatattcctt	tcatctgggc	960
	aatcatgaaa	ccaactacac	gctacatgtg	gctgagattg	ctgccaatat	ccctgaggcc	1020
55	ctaccagaac	acagagacct	gatgttttct	acatgggatc	acagagcaaa	gggacagctc	1080
	tactgtccag	aaagttatct	aggtggctgg	tggttcagtg	acatgtgtgg	agaaaaaac	1140
	ctaaatggta	aatacaacaa	acccagagcc	aaatccaaac	cagagcggag	aagagggatc	1200
	tcctggaggc	ctcggggcgg	aaagctctac	tctatcaaat	catctaaaat	gatgctccag	1260
60	ccgaccacct	aa					1272

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado quimérico de 10 a 30 nucleósidos unidos de longitud dirigida a un ácido nucleico que codifica la tipo angiopoyetina 3 (ANGPTL3) en donde el oligonucleótido modificado comprende por lo menos un enlace internucleosídico modificado, fracción de azúcar modificado y/o nucleobase modificada, para su uso en un método para tratar o prevenir la esteatosis hepática o esteatohepatitis en un animal que comprende administrar el compuesto al animal.
- 10 **2.** El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde la esteatosis hepática es enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD) o la esteatohepatitis es esteatohepatitis no alcohólica (NASH).
- 15 **3.** El compuesto para el uso de cualquier reivindicación anterior, en el que la expresión de apoC-III, niveles de triglicéridos, niveles de colesterol, niveles de lipoproteína de baja densidad (LDL) y/o niveles de glucosa se reducen en el animal, y opcionalmente en el que la administración da como resultado una sensibilidad a la insulina mejorada.
- 20 **4.** El compuesto para el uso de cualquier reivindicación anterior, en el que el oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases por lo menos un 90%, por lo menos un 95% o 100% complementaria a cualquiera de las SEQ ID NO: 1-5 como se mide sobre la totalidad de dicho oligonucleótido modificado.
- 25 **5.** El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el animal es un humano.
- 6.** El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde por lo menos un enlace internucleosídico es un enlace internucleosídico de fosforotioato, en donde por lo menos un azúcar modificado es un azúcar bicíclico, en donde por lo menos un azúcar modificado comprende un 2'-O-metoxietilo, un puente (4'-CH (CH₃)-O-2'), o un puente (4'-(CH₂)_n-O-2') en donde n es 1 ó 2, y/o en donde la nucleobase modificada es una 5-metilcitosina.
- 30 **7.** El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el oligonucleótido modificado consiste de 15 a 30, 18 a 24, 19 a 22, o 20 nucleósidos enlazados.
- 8.** El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el oligonucleótido modificado comprende:
 - 35 (a) un segmento de hueco que consiste de desoxinucleósidos enlazados;
 - (b) un segmento de ala 5' que consiste de nucleósidos enlazados; y
 - (c) un segmento de ala 3' que consiste de nucleósidos enlazados;
 en donde el segmento de hueco está posicionado entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3' y en donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado.
- 40 **9.** El compuesto para el uso de la reivindicación 8, en donde el oligonucleótido modificado consiste de:
 - 45 (a) un segmento de hueco que consiste de 10 desoxinucleósidos enlazados;
 - (b) un segmento de ala 5' que consiste de 5 nucleósidos enlazados; y
 - (c) un segmento de ala 3' que consiste de 5 nucleósidos enlazados;
 en donde el segmento de hueco está posicionado entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', y en donde opcionalmente cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar 2'-O-metoxietilo.
- 50 **10.** El compuesto para el uso de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde el oligonucleótido modificado consiste de 20 nucleósidos enlazados, el segmento de hueco 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 2'-O-metoxietilo y por lo menos un enlace internucleosídico es un enlace de fosforotioato, y en donde opcionalmente todos los residuos de citosina son 5-metilcitosinas.
- 55 **11.** El compuesto para el uso de la reivindicación 3, en donde los niveles se reducen independientemente en por lo menos un 5%, 10%, 20%, 30%, 35% o 40%.
- 60 **12.** El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el oligonucleótido modificado está conjugado.
- 65 **13.** El compuesto para el uso de la reivindicación 12, en donde el oligonucleótido modificado está conjugado con un grupo conjugado de carbohidrato.