



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

INVENTARIO

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD



Organización y
Digitalización CSA Ltda

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

08-33378

54. TÍTULO

MODULACION DE LA EXPRESION DEL RECEPTOR GLUCOCORTICOIDE.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

C12N 15/11

71. SOLICITANTE

JOHNSON & JOHNSON PHARMACEUTICAL RESEARCH & DEVELOPMENT, L.L.C.

DOMICILIO

RARITAN, NEW JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA.

74. APODERADO

JIMENA ESTOBAR URIBE

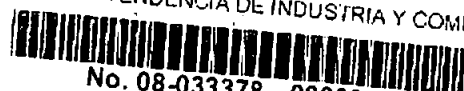
22. BOGOTÁ, D. C.,

99



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-033378- -00000-0000

Fecha: 2008-04-03 15:25:18 Dep. 2020 NUECREACION
Ita. 11 PATENTE/II Evt. 378 FASE NACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 133

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 14 Abril 2008

SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I



Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: Johson & Johnson Pharmaceutical
Research & Development, L.L.C

Dirección: 920 U.S. Route 202, Raritan, New
Jersey 08869, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Raritan, New
Jersey, Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: New Jersey, Estados
Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: JIMENA ESCOBAR URIBE

Dirección: Cra. 11 No. 86-53 piso 6

Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889

E-mail: Jiescobar@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número 39.779.452T.P 68228

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER ANEXOS

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No: PCT/ES2006/036527

Fecha: 19 de septiembre de 2006

Publicación Internacional No: WO 2007/035759 A1

Fecha: 29 de marzo de 2007

6 TÍTULO (54) MODULACION DE LA EXPRESION DEL RECEPTOR GLUCOCORTICOIDE

7

Clasificación Internacional (51)

C12N 15/11

8

Prioridad

SI



NO



(33) País de Origen
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

(32) Fecha

19 de septiembre de 2005

(31) Número de Solicitud

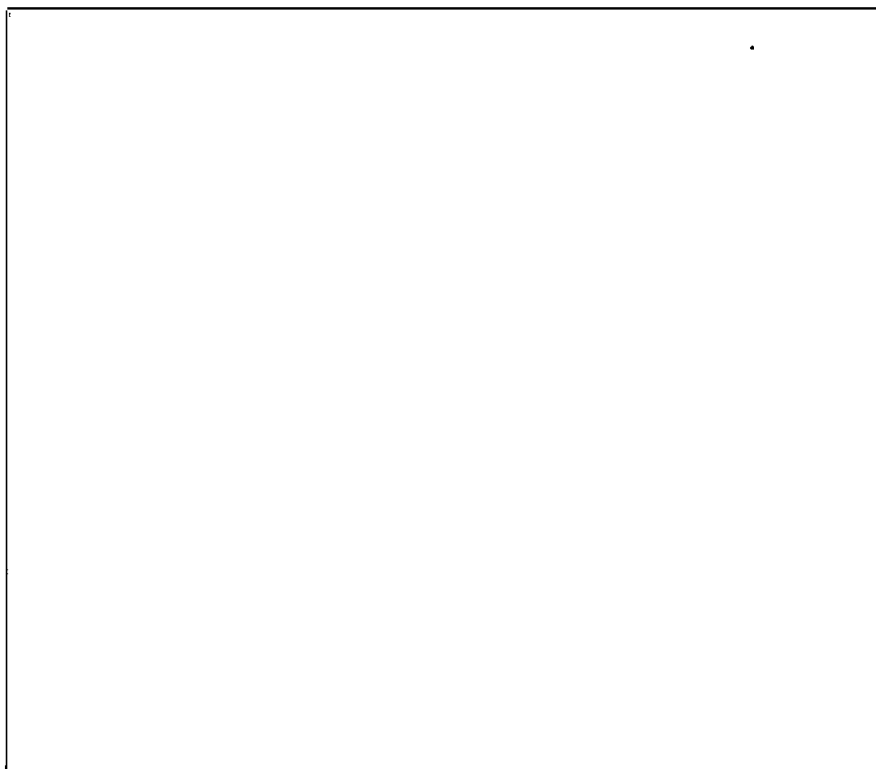
60/718.685

9

Comprobante de pago No: 08-22.388

Fecha: 13 de marzo de 2008

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☒ Otros

11 FIGURA CARACTERÍSTICA**12 Solicito la concesión de la patente**NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBEFIRMA: 

C.C. 39.779.452 de Usaquén

T.P. 68.228

As. 3123/PCT

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 22,398
FECHA : MARZO 13 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-033378- -00000-0000

Fecha: 2008-04-03 15:25:18 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTE Y II Eve: 378 FASE NACIONAL I
Act. 411 PRESENTACION Folios: 133

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE RODET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	2661311	13/03/2008	21,030,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	501,000.00

SCR: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXOS

INVENTORES

- 1.) **MONIA, Brett, P.**
(2306 Casa Hermosa Court, Encinitas, California 92024, Estados Unidos de América);
- 2.) **MICKAY, Robert**
(12467 Golden Eye Lane, Poway, California 92064, Estados Unidos de América);
- 3.) **FREIER, Susan, M.**
(2946 Renault Street, San Diego, California 92122, Estados Unidos de América);
- 4.) **BHANOT, Sanjay**
(8094 Pasco Arrayan, Carlsbad, California 92009, Estados Unidos de América);
- 5.) **WATTS, Lynnetta**
(7778 Calle Mejor, Carlsbad, California 92009, Estados Unidos de América).

RESUMEN DE LA INVENCION

Los compuestos, composiciones y métodos se proveen para la modulación de la expresión del receptor glucocorticoide; las composiciones
5 comprenden compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos antisentido los cuales tienen propiedades particulares in vivo, dirigidos hacia ácidos nucleicos que codifican el receptor glucocorticoide; se proveen los métodos de uso de estos compuestos para la modulación de la expresión del receptor glucocorticoide y para el tratamiento de enfermedades.

10

15

20 MA

P08/360F

MODULACION DE LA EXPRESION DEL RECEPTOR GLUCOCORTICOIDE

LISTADO DE SECUENCIA

5 En la presente invención se incorpora como referencia una forma que se lee por computadora del listado de secuencia, en un disco, que contiene el nombre del archivo BIOL0065WOSEQ.txt, el cual es de 37,122 bytes (medido en MS-DOS) y se creó 19 de septiembre del 2006.

CAMPO DE LA INVENCION

10 En la presente invención se describen compuestos, composiciones y métodos para la modulación de la expresión del receptor glucocorticoide en una célula, tejido o animal.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Puesto que la gluconeogénesis incrementada se considera como la fuente principal de producción de glucosa incrementada en la diabetes, se han investigado numerosos blancos terapéuticos para la inhibición de la producción de glucosa hepática. Debido a la capacidad de los antagonistas del receptor glucocorticoide (también conocido como subfamilia del receptor nuclear 3, grupo C, miembro 1; NR3C1; GCCR; GCR; GRL; receptor

20

glucocorticoide, linfocito) para mejorar la diabetes en modelos animales, dichos compuestos se encuentran entre las terapias potenciales a ser exploradas. Sin embargo, existen efectos sistémicos detrimentales de antagonistas del receptor glucocorticoide/ incluyendo activación del eje HPA
5 (Link, Curr Opin Investig Drugs, 2003, 4, 421-429). La actividad incrementada del eje HPA se asocia con la supresión de la acción inflamatoria relacionada con el sistema inmune, la cual puede incrementar la susceptibilidad a los agentes infecciosos y neoplasmos. Las condiciones asociadas con la supresión de la inflamación mediada por el sistema inmune a través de
10 defectos en el eje HPA, o sus tejidos blanco, incluyen síndrome de Cushing, estrés crónico, alcoholismo crónico y depresión melancólica (Chrousos, N Engl J Med, 1995, 332, 1351-1362). Por lo tanto, es de gran valor para desarrollar antagonistas del receptor glucocorticoide específico del hígado y específico de la grasa.

15

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se dirige a compuestos oligoméricos dirigidos a y que se hibridan con una molécula de ácido que codifica GCCR el
20 cual modula la expresión de GCCR. En la presente invención se proveen oligonucleótidos quiméricos referidos como "gapmers", que comprenden una región deoxinucleótido o "gap" (abertura) flanqueada en cada uno de los extremos 5' y 3' con "alas" comprendidas de uno a cuatro 2'-O-metoxietil

nucleótidos. Las regiones de deoxinucleótido de los oligonucleótidos de la invención están comprendidas de más de diez deoxinucleótidos, por lo tanto los gapmers de la presente invención tienen una "abertura-dilatada" en comparación con los compuestos quiméricos que comprenden una región de
5 abertura de diez deoxinucleótido, tales como las que se ejemplifican en la Publicación de E.U.A. 2005-0164271, la cual se incorpora en la presente invención como referencia en su totalidad. En algunas modalidades, en comparación con los oligonucleótidos que tienen la misma secuencia que comprenden una región de diez deoxinucleótidos flanqueada en ambos
10 extremos 5' y 3' con cinco 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, oligonucleótidos de abertura-dilatada que tienen una potencia comparable o mejorada sin acumulación mejorada del oligonucleótido en el hígado. Por lo tanto, las modalidades de la presente invención incluyen oligonucleótidos de abertura-dilatada dirigidos a GCCR en donde la potencia es comparable con o mejor
15 que aquella de un oligonucleótido que tiene la misma secuencia que comprende una región de diez deoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos 5' y 3' con cinco 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos sin la acumulación mejorada del oligonucleótido en tejidos blanco.

Otra modalidad de la presente invención incluye oligonucleótidos
20 de abertura-dilatada dirigidos a GCCR en donde las concentraciones renales de dicho oligonucleótido son comparables con o están disminuidas con respecto a aquel oligonucleótido que tiene la misma secuencia que comprende una región de diez deoxinucleótidos flanqueada en ambos

extremos 5' y 3' con cinco 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos a la vez que se mantiene o se mejora la potencia en los tejidos blanco tal como el hígado.

Adicionalmente se proveen métodos para la modulación de la expresión de GCCR en células, tejidos o, animales que comprenden poner en
5 contacto a dichas células, tejidos o, animales con uno o más de los compuestos o composiciones de la presente invención. Por ejemplo, en una modalidad, los compuestos o composiciones de la presente invención se pueden utilizar para reducir la expresión de GCCR en células, tejidos o animales.

10 En una modalidad, la presente invención provee un método para tratar una enfermedad o condición mediada por la expresión de glucocorticoide en un animal que comprende poner en contacto al animal con una cantidad efectiva de un compuesto de la invención. Las enfermedades o
condiciones incluyen diabetes, diabetes Tipo 2, obesidad, síndrome
15 metabólico X, hiperglucemia, hiperlipidemia, o esteatosis hepática. En algunas modalidades, la hiperlipidemia se asocia con lípidos elevados tales como colesterol en sangre o triglicéridos elevados en sangre. Los lípidos en sangre incluyen lípidos en plasma y lípidos en suero. Adicionalmente se proveen métodos para disminuir los niveles de lípidos en sangre, métodos para reducir
20 la masa grasa corporal, métodos para disminuir los niveles de triglicéridos en hígado, y métodos para mejorar la sensibilidad a la insulina en un animal mediante la administración de un compuesto de la invención.

También se provee un método para disminuir los niveles de glucosa en sangre en un animal que comprende administrar un compuesto de la invención. Los niveles de glucosa en sangre pueden ser los niveles de glucosa en ayuno o durante la alimentación, y los niveles de glucosa en sangre incluyen los niveles de glucosa en suero o plasma. Adicionalmente se proveen métodos para incrementar la sensibilidad a la insulina y para inhibir la salida de la glucosa hepática.

Otro aspecto de la presente invención es un método para retrasar o prevenir el inicio de un incremento en los niveles de lípidos en sangre o de glucosa en sangre en un animal mediante la administración de un compuesto de la invención.

La presente solicitud también se refiere a la Solicitud de E.U.A. No. 60/718,684, la cual se incorpora como referencia en su totalidad. La presente solicitud también se refiere a la Solicitud de E.U.A. No. 11/231,243 y a la Solicitud PCT No. PCT/US2005/033837, cada una de las cuales se incorpora en la presente invención como referencia en su totalidad.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Revisión

En la presente invención se describen compuestos oligoméricos, incluyendo oligonucleótidos antisentido y otros compuestos antisentido para uso en la modulación de la expresión de las moléculas de ácido nucleico que

codifican GCCR. Esto se logra al proveer compuestos oligoméricos que hibridan con una o más moléculas blanco de ácido nucléico que codifican GCCR.

De conformidad con la presente invención son composiciones y métodos para la modulación de la expresión de GCCR (también conocido como receptor glucocorticoide; subfamilia del receptor nuclear 3, grupo C, miembro 1; GR; GRL; y NR3C1). Listados en el Cuadro 1 se encuentran los números de acceso GENBANK® de las secuencias que se pueden utilizar para diseñar los compuestos oligoméricos dirigidos a GCCR. Los compuestos oligoméricos de la invención incluyen los compuestos oligoméricos que hibridan con una o más moléculas blanco de ácido nucléicos mostradas en el cuadro 1, así como los compuestos oligoméricos que hibridan con otras moléculas de ácido nucléico que codifican GCCR.

Los compuestos oligoméricos se pueden dirigir a cualquier región, segmento, o sitio de las moléculas de ácido nucléico que codifican GCCR. Las regiones blanco adecuadas, segmentos, y sitios incluyen, pero no se limitan a, la 5'UTR, el codón de inicio, el codón de paro, la región codificante, la 3'UTR, la región 5'cap (extremo modificado hacia 5'), intrones, exones, uniones intrón-exón, uniones exón-intrón, y uniones exón-exón.

CUADRO 1

Genes blancos

Especies	Número de acceso GENBANK® o descripción	SEQ ID NO
Humano	NM_000176.1	1
Ratón	NM_012576.1	2
Rata	NM_008173.1	3

5

Las ubicaciones en el ácido nucléico blanco al cual se hibridan los compuestos oligoméricos activos se refieren a continuación en la presente invención como "segmentos blanco validados". Como se utiliza en la presenta
10 invención el término "segmento blanco validado" se define como al menos una porción de 8 nucleobases de una región blanco a la cual se dirige un compuesto oligomérico activo. Aunque no se desea atenerse a la teoría, actualmente se cree que estos segmentos blanco representan porciones del ácido nucléico blanco las cuales son accesibles para hibridación.

15 La presente invención incluye los compuestos oligoméricos que son compuestos quiméricos. Un ejemplo de un compuesto quimérico es un gapmer que tiene una región 2'-deoxinucleótido o una región "abertura" flanqueada por regiones no deoxinucleótido o "alas". Aunque no se desea atenerse a la teoría, la abertura del gapmer presenta un sustrato reconocible
20 por RNasa H cuando se une al ARN blanco mientras que las alas no son un sustrato óptimo pero puede conferir otras propiedades tales como la contribución a la estabilidad del duplex o efectos farmacocinéticos ventajosos. Cada ala puede ser uno o más monómeros no deoxi oligonucleótidos. En una

modalidad, el gapmer está comprendido de una región de dieciséis 2'-deoxinucleótidos flanqueada en cada uno de los extremos 5' y 3' por alas de dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. Este se refiere como un 2-16-2 gapmer. Por lo tanto, el "motivo de este compuesto oligomérico quimérico o gapmer es

5 2-16-2. En otra modalidad, todos los enlaces internucleosídicos son enlaces fosforotioato. En otra modalidad las citosinas del gapmer son 5-metilcitosinas.

Las modalidades de la presente invención incluyen los compuestos oligoméricos que comprenden las secuencias de 13 a 26 nucleótidos de longitud que comprenden una región deoxi nucleótida mayor

10 de 10 nucleobases de longitud flanqueada en cada uno de sus extremos 5' y 3' con al menos un 2'-O-(2-metoxietil) nucleótido. Los oligonucleótidos de "abertura-dilatada" preferidos comprenden 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, o 18 deoxinucleótidos en la porción abertura del oligonucleótido. Las regiones

flanqueantes preferidas hacia 5' y 3' comprenden 1, 2, 3, o 4 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. Los gapmers de abertura-dilatada preferidos tienen

15 motivos que incluyen 1-18-1, 1-17-2, 2-17-1, 2-16-2, 3-14-3, y 4-12-4.

En modalidades preferidas los compuestos oligoméricos se dirigen o hibridan con ARN de GCCR. En otra modalidad, los compuestos oligoméricos reducen la expresión del ARN de GCCR. En otras modalidades,

20 los compuestos oligoméricos reducen la expresión del GCCR en donde la expresión del GCCR se reduce en al menos 10%, en al menos 20%, en al menos 30%, en al menos 35%, en al menos 40%, en al menos 45%, en al menos 50%, en al menos 55%, en al menos 60%, en al menos 65%, en al

menos 70%, en al menos 75%, en al menos 80%, en al menos 85%, en al menos 90%, en al menos 95%, o en 100%.

Los oligonucleótidos de la presente invención incluyen aquellos en donde las concentraciones renales de dicho oligonucleótido están

5 disminuidas con respecto a un oligonucleótido que tiene la misma secuencia que comprende una región de diez deoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos 5' y 3' con cinco 2'-O-(2- metoxietil) nucleótidos. Los oligonucleótidos de la presente invención incluyen aquellos en donde las concentraciones renales de dicho oligonucleótido son comparables con o están disminuidas

10 con respecto a aquellas de un oligonucleótido que tienen la misma secuencia que comprende una región de diez deoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos 5' y 3' con cinco 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. Los oligonucleótidos de la presente invención incluyen aquellos en donde la potencia con respecto a la reducción blanco o un efecto terapéutico es comparable a o mejor que

15 aquella de un oligonucleótido que tiene la misma secuencia que comprende una región de diez deoxinucleótidos flanqueada en ambos extremos 5' y 3' con cinco 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos sin la acumulación mejorada de oligonucleótido en tejidos blanco. Los tejidos blanco preferidos incluyen hígado, y tejido adiposo.

20 La presente invención provee oligonucleótidos antisentido de 13 a 26 nucleobases de longitud dirigidos hacia una molécula de ácido nucléico que codifica GCCR en donde el oligonucleótido comprende una primera región, una segunda región, y una tercera región, en donde dicha primera

región comprende al menos 11 deoxinucleótidos y en donde dicha segunda y tercera regiones comprenden 1 a 4 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, dicha segunda y tercera regiones flanquean la primera región de los extremos 5' y 3' de dicha primera región.

5 En algunas modalidades, los oligonucleótidos de la invención se hibridan específicamente con GCCR y reducen la expresión de GCCR. En algunas modalidades, la región de "apertura" comprende 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, o 18 nucleobases. En algunas modalidades, los oligonucleótidos antisentido son de 20 nucleobases en longitud.

10 Los compuestos oligoméricos pueden comprender de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleobases (es decir de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleósidos asociados), preferiblemente entre aproximadamente 13 a aproximadamente 26 nucleobases. Un experto en la técnica apreciará que los compuestos
15 oligoméricos preferidos contemplados incluyen los compuestos que son de 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o 26 nucleobases en longitud.

 Los compuestos de la invención incluyen secuencias oligonucleótidas que comprenden al menos las 8 nucleobases consecutivas a partir del extremo 5' de uno de los compuestos antisentido ilustrativos (las
20 nucleobases remanentes siendo una extensión consecutiva del mismo oligonucleótido empezando inmediatamente cascada arriba del extremo hacia 5' del compuesto antisentido el cual se hibrida específicamente con el ácido nucleico blanco y continuando hasta que el oligonucleótido comprende

aproximadamente 13 a aproximadamente 26 nucleobases). Otros compuestos se representan por las secuencias oligonucleótidas que comprenden al menos las 8 nucleobases consecutivas a partir del extremo 3' de uno de los compuestos antisentido ilustrativos (las nucleobases remanentes siendo una
5 extensión consecutiva del mismo oligonucleótido empezando inmediatamente cascada abajo del extremo hacia 3' del compuesto antisentido el cual se hibrida específicamente con el ácido nucléico blanco y continuando hasta que el oligonucleótido comprende aproximadamente 13 a aproximadamente 26 nucleobases). También se entiende que los compuestos pueden estar
10 representados por las secuencias oligonucleótidas que comprenden al menos 8 nucleobases consecutivas a partir de una porción interna de la secuencia de un compuesto ilustrativo, y se pueden extender hacia cualquier o ambas direcciones hasta que el oligonucleótido contiene aproximadamente 13 a aproximadamente 26 nucleobases.

15 Los oligonucleótidos de la invención incluyen oligonucleótidos antisentido de 20 nucleobases de longitud dirigidos hacia una molécula de ácido nucléico que codifica GCCR y que comprenden al menos una porción de 8 nucleobases de SEQ ID NO: 34, 33, 35, 36, 37, 42, 45, 56, 61, 63, o 96. En una modalidad, los oligonucleótidos de la invención son oligonucleótidos
20 antisentido de 20 nucleobases de longitud dirigidos hacia una molécula de ácido nucléico que codifica GCCR y que tienen la secuencia de SEQ ID NO: 34, 33, 35, 36, 37, 42, 45, 56, 61, 63, o 96. En una modalidad, los

oligonucleótidos de la invención tienen la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 37.

La presente invención provee oligonucleótidos antisentido que comprenden la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 37. En una
5 modalidad, los oligonucleótidos de la invención comprenden al menos una porción de 8 nucleobases de la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 37.

En una modalidad, la presente invención provee oligonucleótidos antisentido de 20 nucleobases de longitud dirigidos hacia una molécula de ácido nucleico que codifica GCCR y que comprenden al menos una porción
10 de 8 nucleobases de SEQ ID NO: 34, 33, 35, 36, 37, 42, 45, 56, 61, 63, o 96 en donde el oligonucleótido comprende una región deoxinucleótido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, o 18 nucleobases de longitud la cual ésta flanqueada en sus extremos 5' y 3' con 1 a 42'-O-(2-metoxietil) nucleótidos y en donde el oligonucleótido específicamente se hibrida con y reduce la expresión del ARN
15 de GCCR.

En una modalidad, las regiones flanqueantes son simétricas (que tienen el mismo número de nucleótidos en la región flanqueante hacia 5' que en la región flanqueante hacia 3'). En otra modalidad, las regiones
flanqueantes no son simétricas (que tienen un número diferente de
20 nucleótidos en la región flanqueante hacia 5' en comparación con la región flanqueante hacia 3').

Los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden contener al menos un enlace internucleósido modificado. Los enlaces internucleósidos

modificados incluyen enlaces fosforotioato. Los oligonucleótidos antisentido de la invención también pueden contener al menos un nucleobase modificada. En modalidades preferidas, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

En otras modalidades, la presente invención incluye

5 oligonucleótidos antisentido que tienen la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 37, en donde el oligonucleótido antisentido se caracteriza por una región de 12 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con cuatro 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, una región de 14 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con tres 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, una región de

10 16 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, una región de 17 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con uno o dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, o una región de 18 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con un 2'-O-(2-metoxietil) nucleótido.

15 En una modalidad particular, los oligonucleótidos antisentido tienen la secuencia de nucleobases de SEQ ID: 37, en donde el oligonucleótido antisentido tiene una región de 12 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con cuatro 2'-O(2-metoxietil) nucleótidos. En una modalidad adicional, el oligonucleótido antisentido hibrida

20 específicamente con y reduce la expresión de GCCR. En una modalidad adicional, al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En una modalidad adicional, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

En una modalidad particular, el oligonucleótido antisentido tiene la secuencia de nucleobases de SEQ ID: 37, en donde el oligonucleótido antisentido tiene una región de 14 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con tres 2'-O(2-metoxietil) nucleótidos. En una modalidad
5 adicional, el oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con y reduce la expresión de GCCR. En una modalidad adicional, al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En una modalidad adicional, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

En una modalidad particular, el oligonucleótido antisentido tiene
10 la secuencia de nucleobases de SEQ ID: 37, en donde el oligonucleótido antisentido tiene una región de 16 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con dos 2'-O(2-metoxietil) nucleótidos. En una modalidad adicional, el oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con y reduce la expresión de GCCR. En una modalidad adicional, al menos un enlace
15 internucleósido es un enlace fosforotioato. En una modalidad adicional, al menos una citosina es una 5 -metilcitosina.

En una modalidad particular, el oligonucleótido antisentido tiene la secuencia de nucleobases de SEQ ID: 37, en donde el oligonucleótido antisentido tiene una región de 17 deoxinucleótidos flanqueada en sus
20 extremos 5' y 3' con uno o dos 2'-O(2-metoxietil) nucleótidos. En una modalidad adicional, el oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con y reduce la expresión de GCCR. En una modalidad adicional, al menos un

enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En una modalidad adicional, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

En una modalidad particular, el oligonucleótido antisentido tiene la secuencia de nucleobases de SEQ ID: 37, en donde el oligonucleótido antisentido tiene una región de 18 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con un 2'-O(2-metoxietil) nucleótido. En una modalidad adicional, el oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con y reduce la expresión de GCCR. En una modalidad adicional, al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En una modalidad adicional, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

En otra modalidad los oligonucleótidos antisentido comprenden la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 33. En una modalidad, los oligonucleótidos de la invención, comprenden al menos una porción de 8 nucleobases de la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 33.

En otras modalidades, la presente invención incluye los oligonucleótidos antisentido que tienen la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 33, en donde el oligonucleótido antisentido se caracteriza por una región de 12 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con cuatro 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, una región de 14 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con tres 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, una región de 16 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, una región de 17 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con uno o dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, o una región de

18 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con un 2'-O-(2-metoxietil) nucleótido.

En una modalidad particular, los oligonucleótidos antisentido tienen la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 33, en donde los
5 oligonucleótidos antisentido tienen una región de 12 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con cuatro 2'-O(2-metoxietil) nucleótidos. En una modalidad adicional, el oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con y reduce la expresión de GCCR. En una modalidad adicional, al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En
10 una modalidad adicional, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

En una modalidad particular, el oligonucleótido antisentido tiene la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 33, en donde el oligonucleótido antisentido tiene una región de 14 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con tres 2'-O(2-metoxietil) nucleótidos. En una modalidad
15 adicional, el oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con y reduce la expresión de GCCR. En una modalidad adicional, al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En una modalidad adicional, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

En una modalidad particular, el oligonucleótido antisentido tiene
20 la secuencia de nucleobases de SEQ ID: 33, en donde el oligonucleótido antisentido tiene una región de 16 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con dos 2'-O(2-metoxietil) nucleótidos. En una modalidad adicional, el oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con y reduce

la expresión de GCCR. En una modalidad adicional, al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En una modalidad adicional, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

En una modalidad particular, el oligonucleótido antisentido tiene
 5 la secuencia de nucleobases de SEQ ID: 33, en donde el oligonucleótido antisentido tiene una región de 17 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con uno o dos 2'-O(2-metoxietil) nucleótidos. En una modalidad adicional, el oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con y reduce la expresión de GCCR. En una modalidad adicional, al menos un
 10 enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En una modalidad adicional, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

En una modalidad particular, el oligonucleótido antisentido tiene la secuencia de nucleobases de SEQ ID: 33, en donde el oligonucleótido antisentido tiene una región de 18 deoxinucleótidos flanqueada en sus
 15 extremos 5' y 3' con un 2'-O(2-metoxietil) nucleótido. En una modalidad adicional, el oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con y reduce la expresión de GCCR. En una modalidad adicional, al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En una modalidad adicional, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

20 La presente invención provee oligonucleótidos antisentido que comprenden la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 45. En una modalidad, los oligonucleótidos de la invención comprenden al menos una porción de 8 nucleobases de la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 45.

En otras modalidades, la presente invención incluye oligonucleótidos antisentido que tienen la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 45, en donde el oligonucleótido antisentido se caracteriza por una región de 12 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con cuatro

5 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, una región de 14 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con tres 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, una región de 16 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, una región de 17 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con uno o dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, o una región de

10 18 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con un 2'-O-(2-metoxietil) nucleótido.

En una modalidad particular, los oligonucleótidos antisentido tienen la secuencia de nucleobases de SEQ ID: 45, en donde los oligonucleótidos antisentido tienen una región de 12 deoxinucleótidos

15 flanqueada en sus extremos 5' y 3' con cuatro 2'-O(2-metoxietil) nucleótidos. En una modalidad adicional, el oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con y reduce la expresión de GCCR. En una modalidad adicional, al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En una modalidad adicional, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

20 En una modalidad particular, el oligonucleótido antisentido tiene la secuencia de nucleobases de SEQ ID: 45, en donde el oligonucleótido antisentido tiene una región de 14 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con tres 2'-O(2-metoxietil) nucleótidos. En una modalidad

adicional, el oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con y reduce la expresión de GCCR. En una modalidad adicional, al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En una modalidad adicional, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

5 En una modalidad particular, el oligonucleótido antisentido tiene la secuencia de nucleobases de SEQ ID: 45, en donde el oligonucleótido antisentido tiene una región de 16 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con dos 2'-O(2-nietoxietil) nucleótidos. En una modalidad adicional, el oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con y reduce
10 la expresión de GCCR. En una modalidad adicional, al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En una modalidad adicional, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

 En una modalidad particular, el oligonucleótido antisentido tiene la secuencia de nucleobases de SEQ ID: 45, en donde el oligonucleótido
15 antisentido tiene una región de 17 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con uno o dos 2'-O(2-metoxietil) nucleótidos. En una modalidad adicional, el oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con y reduce la expresión de GCCR. En una modalidad adicional, al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En una modalidad adicional,
20 al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

 En una modalidad particular, el oligonucleótido antisentido tiene la secuencia de nucleobases de SEQ ID: 45, en donde el oligonucleótido antisentido tiene una región de 18 deoxinucleótidos flanqueada en sus

extremos 5' y 3' con un 2'-O(2-metoxietil) nucleótido. En una modalidad adicional, el oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con y reduce la expresión de GCCR. En una modalidad adicional, al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato. En una modalidad adicional, al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

También se contempla en la presente invención una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido de la invención y opcionalmente un vehículo, diluyente, potenciador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los compuestos de la invención también se pueden utilizar en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con la actividad glucocorticoide mediada por GCCR.

Las modalidades de la presente invención incluyen métodos para reducir la expresión del GCCR en tejidos o células que comprenden poner en contacto a dichas células o tejidos con una composición farmacéutica o un oligonucleótido antisentido de la invención, métodos para disminuir los niveles de glucosa en sangre, niveles de triglicéridos en sangre, o niveles de colesterol en sangre en un animal que comprende administrar a dicho animal una composición farmacéutica de la invención. Los niveles en sangre pueden ser niveles en plasma o en suero. También se contemplan los métodos para incrementar la sensibilidad a la insulina, métodos para disminuir los niveles de triglicéridos en hígado, y métodos para inhibir la salida de glucosa hepática en un animal que comprende administrar a dicho animal una

composición farmacéutica de la invención. La sensibilidad incrementada a la insulina se puede indicar por una disminución en los niveles de insulina en circulación. Otro aspecto de la presente invención es un método para reducir la masa grasa corporal en un animal.

5 Otras modalidades de la presente invención incluyen métodos para el tratamiento de un animal que tiene una enfermedad o condición asociada con la expresión del receptor glucocorticoide que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un oligonucleótido antisentido de la invención. La enfermedad o
10 condición puede ser una enfermedad o condición metabólica. En algunas modalidades, la enfermedad o condición metabólica es diabetes, obesidad, síndrome metabólico X, hiperglucemia, hiperlipidemia, o resistencia a la insulina. En algunas modalidades, la enfermedad es diabetes Tipo 2. En algunas modalidades, la obesidad es inducida por dieta. En algunas
15 modalidades la hiperlipidemia se asocia con niveles elevados de lípidos en sangre. Los lípidos incluyen colesterol y triglicéridos. En una modalidad, la condición es esteatosis hepática. En algunas modalidades, la esteatosis es esteatohepatitis o esteatohepatitis no alcohólica.

 También se proveen los métodos para prevenir o retrasar el
20 inicio de los niveles elevados de glucosa en sangre o los niveles de lípidos en sangre en un animal.

 Los compuestos de la invención se pueden utilizar para modular la expresión del GCCR en un animal que necesita de la misma, tal como un

humano. En una modalidad no limitante, los métodos comprenden el paso de administrar a dicho animal una cantidad efectiva de un compuesto antisentido que reduce la expresión de GCCR. En una modalidad, los compuestos antisentido de la presente invención reducen efectivamente los niveles o la función del ARN de GCCR. Debido a que la reducción en los niveles de ARNm de GCCR también puede llevar a la alteración en los productos protéicos de expresión de GCCR, también se pueden medir dichas alteraciones resultantes. Los compuestos antisentido de la presente invención que reducen efectivamente los niveles o la función de un ARN de GCCR o los productos protéicos de expresión se consideran un compuesto antisentido activo. En una modalidad, los compuestos antisentido de la invención reducen la expresión del GCCR ocasionando una reducción del ARN en al menos 10%, en al menos 20%, en al menos 25%, en al menos 30%, en al menos 40%, en al menos 50%, en al menos 60%, en al menos 70%, en al menos 75%, en al menos 80%, en al menos 85%, en al menos 90%, en al menos 95%, en al menos 98%, en al menos 99%, o en 100% como se mide por un ensayo ejemplificado en la presente invención.

Mecanismos antisentido

Los "mecanismos antisentido" son todos aquellos que incluyen la hibridación de un compuesto con un ácido nucléico blanco, en donde el resultado o efecto de la hibridación es ya sea la degradación del blanco o la

ocupación del blanco con pérdida de velocidad concomitante de la maquinaria celular incluyendo, por ejemplo, transcripción o procesamiento alternativo.

Blancos

5 Como se utiliza en la presente invención, los términos "ácido nucleico blanco" y "molécula de ácido nucleico que codifica GCCR" se han utilizados por conveniencia para incluir el ADN que codifica GCCR, ARN (incluyendo pre-ARNm y ARNm o porciones de los mismos) transcrito a partir de dicho ADN, y también ADNc derivado a partir de dicho ARN.

10

Regiones, Segmentos, y Sitios

El proceso de direccionamiento usualmente también incluye la determinación de al menos una región blanco, segmento, o sitio dentro del ácido nucleico blanco para que se realice la interacción antisentido de tal manera que se produzca el efecto deseado, por ejemplo, modulación de la expresión. "Región" se define como una porción del ácido nucleico blanco que tiene al menos una estructura identificable, función, o característica. Dentro de las regiones de ácidos nucleicos blanco se encuentran segmentos. Los "segmentos" se definen como porciones más pequeñas o sub-porciones de regiones dentro de un ácido nucleico blanco. "Sitios", como se utiliza en la presente invención, se definen como posiciones únicas de la nucleobase dentro de un ácido nucleico blanco.

15

20

Una vez que una o más regiones blanco, segmentos o sitios han sido identificados, se diseñan los compuestos oligoméricos los cuales son lo suficientemente complementarios con respecto al blanco, es decir, hibridan suficientemente bien y con especificidad adecuada, para producir el efecto deseado.

Variantes

También se sabe en la técnica que los transcritos alternos de ARN se pueden producir a partir de la misma región genómica del ADN. Estos transcritos alternativos generalmente se conocen como "variantes." Más específicamente, las "variantes pre-ARNm" son transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico que difieren con respecto a otros transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico ya sea en su posición inicial o de paro y contienen tantas secuencias intrónicas como exónicas.

Después de la escisión de una o más regiones de exón o intrón, o de porciones de los mismos durante el procesamiento, las variantes de pre-ARNm producen "variantes de ARNm" más pequeñas. Consecuentemente, las variantes de ARNm son variantes procesadas de pre-ARNm y cada variante única de pre-ARNm siempre produce una variante única de ARNm como un resultado del procesamiento. Estas variantes de ARNm también se conocen como "variantes de procesamiento alternativo." Si no se produce el procesamiento de la variante de pre-ARNm entonces la variante de pre-ARNm es idéntica a la variante de ARNm.

También se sabe en la técnica que las variantes pueden ser producidas a través del uso de señales alternativas para iniciar o detener la transcripción o paro y que los pre-ARNm y ARNm pueden poseer más de un codón de inicio o de un cordón de paro. Las variantes que se originan a partir de un pre-ARNm o ARNm que utilizan codones de inicio alternativos se conocen como "variantes de inicio alternativo" de ese pre-ARNm o ARNm. Aquellos transcritos que utilizan un codón de paro alternativo se conocen como "variantes de paro alternativo" de ese pre-ARNm o ARNm. Un tipo específico de variante de paro alternativo es la "variante polyA" en la cual los múltiples transcritos producen resultados a partir de la selección alternativa de una de las "señales de paro polyA" mediante la maquinaria de transcripción, produciendo así transcritos que terminan en sitios únicos polyA. Consecuentemente, los tipos de variantes descritas en la presente invención también son ácidos nucleicos blanco adecuados.

15

Modulación de la expresión del blanco

La "modulación" significa una perturbación de la función, por ejemplo, ya sea un incremento (estimulación o inducción) o una disminución (inhibición o reducción) en la expresión. Como otro ejemplo, la modulación de la expresión puede incluir perturbación de la selección del sitio de procesamiento del pre-ARNm. La "expresión" incluye todas las funciones por medio de las cuales una información codificada por un gen se convierte hacia estructuras presentes y en operación en una célula. Estas estructuras incluyen

los productos de transcripción y traducción. "Modulación de la expresión" significa la perturbación de dichas funciones. "Moduladores" son aquellos compuestos que modulan la expresión del GCCR y los cuales comprenden al menos una porción de 8 nucleobases la cual es complementaria con un
 5 segmento blanco validado.

La modulación de la expresión de un ácido nucleico blanco se puede lograr a través de la alteración de cualquier número de funciones del ácido nucleico (ADN o ARN). Las funciones del ADN a ser moduladas pueden incluir replicación y transcripción. La replicación y transcripción, por ejemplo,
 10 puede ser a partir de un molde celular endógeno, un vector, una construcción plasmídica o de otro tipo. Las funciones del ARN a ser moduladas pueden incluir las funciones de translocación, las cuales incluyen, pero no se limitan a, translocación del ARN hacia un sitio de translocación de la proteína, translocación del ARN hacia sitios dentro de la célula los cuales están
 15 distantes de sitio de la síntesis del ARN, y la traducción de la proteína a partir del ARN. Las funciones del procesamiento del ARN que pueden ser moduladas incluyen, pero no se limitan a, procesamiento del ARN para producir una o más especies de ARN, modificación del ARN, 3' maduración del ARN y actividad catalítica o formación del complejo que incluye el ARN en
 20 el cual puede participar el ARN o puede ser facilitado por el ARN. La modulación de la expresión puede resultar en el nivel incrementado de una o más especies de ácido nucleico o el nivel disminuido de una o más especies de ácido nucleico, ya sea temporalmente o por un nivel de estado estacionario

neto. Un resultado de dicha interferencia con la función del ácido nucléico blanco es la modulación de la expresión del GCCR. Por lo tanto, en una modalidad la modulación de la expresión puede significar el incremento o disminución en los niveles de ARN blanco o proteína. En otra modalidad la modulación de la expresión puede significar un incremento o disminución de uno o más productos del procesamiento del ARN, o un cambio en la relación de dos o más productos de procesamiento.

Hibridación y complementariedad

"Hibridación" significa que el acoplamiento de cadenas complementarias de compuestos oligoméricos. Aunque no se limita a un mecanismo particular, el mecanismo más común de acoplamiento incluye la formación de enlaces de hidrógeno, los cuales pueden ser de tipo Watson-Crick, Hoogsteen o formación de enlaces de hidrógeno tipo Hoogsteen reversa, entre las bases nucleosídicas o nucleotídicas complementarias (nucleobases) de las cadenas de los compuestos oligoméricos. Por ejemplo, adenina y timina son nucleobases complementarias las cuales se acoplan a través de la formación de enlaces de hidrógeno. La hibridación se puede presentar bajo circunstancias variables. Un compuesto oligomérico es específicamente hibridizable cuando existe un grado adecuado de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto oligomérico a secuencias de ácido nucléico no blanco bajo condiciones en las cuales se desea la unión específica, es decir, bajo condiciones fisiológicas en

el caso de los ensayos in vivo o tratamiento terapéutico, y bajo condiciones en las cuales los ensayos se llevarán a cabo en el caso de los ensayos in vitro.

"Condiciones severas de hibridación" o "condiciones severas" se refieren a condiciones bajo las cuales un compuesto oligomérico hibridará con su secuencia blanco, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones severas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias, y las "condiciones severas" bajo las cuales los compuestos oligoméricos hibridan con una secuencia blanco se determinan por la naturaleza y composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos en los cuales son investigados.

"Complementariedad", como se utiliza en la presente invención, se refiere a la capacidad de acoplamiento preciso entre dos nucleobases en una o dos cadenas del compuesto oligomérico. Por ejemplo, si una nucleobase en una cierta posición de un compuesto antisentido es capaz de acoplarse mediante la formación de enlaces de hidrógeno con una nucleobase en una cierta posición de un ácido nucléico blanco, entonces la posición del enlace de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucléico blanco se considera una posición complementaria. El compuesto oligomérico y el ADN o ARN son complementarios entre sí cuando un número adecuado de posiciones complementarias en cada molécula están ocupadas por nucleobases que pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí. Por lo tanto, "específicamente hibridizable" y "complementariedad" son términos los cuales se utilizan para indicar un grado adecuado de acoplamiento preciso o

complementariedad en un número adecuado de nucleobases de tal manera que la unión estable y específica se presenta entre el compuesto oligomérico y un ácido nucléico blanco.

Se entiende en la técnica que la secuencia de un compuesto oligomérico no necesita ser 100% complementaria con respecto a la de su ácido nucléico blanco para ser específicamente hibridizable. Además, un oligonucleótido se puede hibridar en uno o más segmentos de tal manera que los segmentos intermedios o adyacentes no participan en el evento de hibridación (por ejemplo, una estructura en asa, inconsistencia o estructura en horquilla). Los compuestos oligoméricos de la presente invención comprenden al menos 70%, o al menos 75%, o al menos 80%, o al menos 85%, o al menos 90%, o al menos 92%, o al menos 95%, o al menos 97%, o al menos 98%, o al menos 99% de complementariedad de secuencia con respecto a una secuencia blanco dentro de la secuencia de ácido nucléico blanco a la cual están dirigidos. Por ejemplo, un compuesto oligomérico en el cual 18 de 20 nucleobases del compuesto antisentido son complementarias a una región blanco, y por lo tanto se podrían hibridar específicamente, podría presentar 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, las nucleobases remanentes no complementarias se pueden agrupar o espaciar con nucleobases complementarias y no necesitan estar contiguas entre sí o con respecto a las nucleobases complementarias. Como tal, un compuesto oligomérico el cual es de 18 nucleobases de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleobases no complementarias las cuales están flanqueadas por dos

regiones de complementariedad completa con el ácido nucléico blanco podría tener 77.8% de complementariedad general con el ácido nucléico blanco y por lo tanto podría caer dentro del alcance de la presente invención. La complementariedad porcentual de un compuesto oligomérico con una región de un ácido nucléico blanco se puede determinar rutinariamente utilizando los programas BLAST (basic local alignment search tools - herramientas de búsqueda del 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). Homología porcentual, identidad de secuencia o complementariedad, se pueden determinar mediante, por ejemplo, el programa Abertura (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison WI), utilizando los ajustes por omisión, que utilizan el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489).

15

Compuestos oligoméricos

El término "compuesto oligomérico" se refiere a una estructura polimérica capaz de hibridar con una región de una molécula de ácido nucléico. Este término incluye oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótido, miméticos de oligonucleótido y combinaciones químicas de éstos. Los compuestos oligoméricos se preparan rutinariamente de manera lineal pero se pueden unir o preparar de otra manera para que sean circulares. Además, las estructuras ramificadas se conocen en la técnica. Un

20

"compuesto antisentido" o "compuesto oligomérico antisentido" se refiere a un compuesto oligomérico que es al menos parcialmente complementario con la región de una molécula de ácido nucleico con la cual hibrida y la cual modula (incrementa o disminuye) su expresión. Consecuentemente, aunque se puede
5 decir que todos los compuestos antisentido son compuestos oligoméricos, no todos los compuestos oligoméricos son compuestos antisentido. Un "oligonucleótido antisentido" es un compuesto antisentido que es un oligómero basado en ácido nucleico. Un oligonucleótido antisentido se puede modificar químicamente. Los ejemplos no limitantes de los compuestos oligoméricos
10 incluyen iniciadores, sondas, compuestos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS), procesadores alternos, y ARNsi. Como tal, estos compuestos se pueden introducir la forma de cadenas sencillas, cadenas dobles, elementos circulares, cadenas ramificadas u horquillas y pueden contener elementos estructurales tales
15 como protuberancias o asas internas o terminales. Los compuestos oligoméricos de cadena doble pueden ser dos cadenas hibridadas para formar compuestos de cadena doble o una cadena sencilla con suficiente auto complementariedad para permitir la hibridación y formación de un compuesto completamente de cadena doble o parcialmente de cadena doble.

20 Los compuestos oligoméricos "quiméricos" o "quimeras," en el contexto de esta invención, son compuestos oligoméricos de cadena sencilla o doble, tales como oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una comprendiendo al menos una unidad

monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleótido.

Un "gapmer" se define como un compuesto oligomérico, generalmente un oligonucleótido, que tiene una región 2'-deoxioligonucleótido
 5 flanqueada por segmentos no-deoxioligonucleótido. La región central se refiere como la "abertura." Los segmentos flanqueantes se refieren como las "alas." Si una de las alas tiene cero monómeros no-deoxioligonucleótido, se describe un "hemimer".

10 NAFLD

El término "enfermedad hepática grasa no alcohólica" (NAFLD) abarca un espectro de enfermedades que tiene un intervalo desde la simple acumulación de triglicéridos en los hepatocitos (esteatosis hepática) hasta la esteatosis hepática con inflamación (esteatohepatitis), fibrosis, y cirrosis. La
 15 esteatohepatitis no alcohólica (NASH) se presenta a partir de la progresión de la NAFLD más allá de la depositación de triglicéridos. Se requiere un segundo efecto capaz de inducir necrosis, inflamación, y fibrosis para el desarrollo de NASH. Los candidatos para el segundo efecto se pueden agrupar en categorías amplias: factores que ocasionan un incremento en el estrés
 20 oxidativo y factores que promueven la expresión de citocinas proinflamatorias. Se ha sugerido que los triglicéridos incrementados en el hígado llevan a una estrés oxidativo incrementado en los hepatocitos de animales y humanos, indicando una relación causa-y -fecto potencial entre la acumulación hepática

de triglicéridos, el estrés oxidativo, y el progreso de la esteatosis hepática hacia NASH (Browning y Horton, J. Clin. Invest, 2004, 114, 147-152). La hipertrigliceridemia e hiperacidemia grasa pueden ocasionar acumulación de triglicéridos en tejidos periféricos (Shimamura et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, 322, 1080-1085). Una modalidad de la presente invención es un método para reducir los lípidos en el hígado de un animal mediante la administración de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de un compuesto oligomérico de la invención. Otra modalidad de la presente invención es un método para el tratamiento de la esteatosis hepática en un animal mediante la administración de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de un compuesto oligomérico de la invención. En algunas modalidades, la esteatosis es esteatohepatitis. En algunas modalidades, la esteatosis es NASH.

15 Modificaciones químicas

Nucleobases modificadas y alternas

Los compuestos oligoméricos de la invención también incluyen variantes en las cuales está presente una base diferente en una o más de las posiciones nucleotídicas en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenosina, se pueden producir variantes que contienen timidina, guanosina o citidina en esta posición. Esto se puede realizar en cualesquiera de las posiciones del compuesto oligomérico. Estos compuestos son

evaluados entonces, utilizando los métodos descritos en la presente invención para determinar su capacidad para reducir la expresión del ARNm de GCCR.

Los compuestos oligoméricos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de las nucleobases (frecuentemente referidas en la técnica como bases heterocíclicas o simplemente como "bases"). Como se utiliza en la presente invención, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases purina adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Una "sustitución" es el reemplazo de una base no modificada o natural con otra base no modificada o natural. Las nucleobases "modificadas" significa otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil ($\text{-C}\equiv\text{C-CH}_3$) uracilo y citosina y otros derivados alquinilo de bases 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-sustituidas, 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 nucleobases adicionales modificadas incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina citidina(1H-pirimido(5,4-b)(1,4)benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirimido(5,4-

b)(1,4)benzotiazin-2(3H)-ona), Uniones-G tal como una citidina fenoxazina sustituida (por ejemplo 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido(5,4-b)(1,4)benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimido(4,5-b)indol-2-ona), piridoindol citidina (H-pirido(3',2':4,5)pirrolo(2,3-d)pirimidin-2-ona). Las nucleobases

5 modificadas también pueden incluir aquellas en las cuales la base purina o pirimidina se reemplaza con otros heterociclos, por ejemplo 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Las nucleobases adicionales incluyen aquellas descritas en la Patente de Estados Unidos No. 3,687,808, aquellas descritas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and

10 Engineering, páginas 858-859, Roschitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellas descritas por Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, y aquellas descritas por Sanghvi, Y.S., capítulo 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B. , ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas nucleobases se conocen

15 por aquellos expertos en la técnica como adecuadas para incrementar la afinidad de unión de los compuestos de la invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha

20 mostrado que las sustituciones 5-metilcitosina incrementan la estabilidad del duplex de ácido nucléico por 0.6-1.2°C y son sustituciones de bases adecuadas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietil azúcar. Se entiende en la técnica que la

modificación de la base no incluye dichas modificaciones químicas que producen sustituciones en una secuencia de ácidos nucleicos.

Las Patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de algunas de las nucleobases modificadas anteriormente mencionadas así como otras nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a, la Patente de E.U.A. anteriormente mencionada 3,687,808, así como la Patente de E.U.A.: 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,830,653; 5,763,588; 6,005,096; 5,681,941; y 5,750,692.

Los compuestos oligoméricos de la presente invención también pueden incluir compuestos heterocíclicos policíclicos en lugar de una o más de las porciones de las bases heterocíclicas que se presentan de manera natural. Numerosos compuestos heterocíclicos tricíclicos han sido previamente reportados. Estos compuestos se utilizan rutinariamente en aplicaciones antisentido para incrementar las propiedades de unión de la cadena modificada hacia una cadena blanco. Las modificaciones más estudiadas son dirigidas a guanosinas por lo tanto éstas han sido denominadas Uniones-G o análogos de citidina. Los análogos de citosina representativos que hacen 3 enlaces de hidrógeno con una guanosina en una segunda cadena incluyen 1,3-diazafenoxazina-2-ona (Kurchavov, et al, Nucleosides and Nucleótides, 1997, 16, 1837- 1846), 1,3-diazafenotiazina-2-ona, (Lin, K.-Y.; Jones, R. J.; Matteucci, M. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117,

3873-3874) y 6,7,8,9-tetrafluoro-1,3-diazafenoxazina-2-ona (Wang, J.; Lin, K.-Y., Matteucci, M. Tetrahedron Lett. 1998, 39, 8385-8388). Ya incorporadas dentro de los oligonucleótidos se mostró que estas modificaciones de bases se hibridan con guanina complementaria y también se mostró que la última
5 hibrida con adenina y mejora la estabilidad térmica al extender las interacciones que se apilan (también véase las publicaciones de E.U.A. Pre-Apoyo económico 20030207804 y 20030175906).

Se han observado propiedades estabilizantes de la hélice adicionalmente cuando un análogo/sustituto de citosina tiene una porción
10 aminoetoxi unida a la estructura rígida de la 1,3-diazafenoxazina-2-ona (Lin, K.-Y.; Matteucci, M. J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 8531-8532). Los estudios de unión demostraron que una incorporación única podría mejorar la afinidad de unión a un oligonucleótido modelo con respecto a su ADN blanco complementario o ARN con una ΔT_m de hasta 18°C en relación con la 5-metil
15 citosina (dC5^{me}), que es un potenciador de alta afinidad para una modificación particular. Por otra parte, la ganancia en la estabilidad por la hélice no compromete la especificidad de los oligonucleótidos.

Los compuestos heterocíclicos tricíclicos adicionales y métodos para el uso de los mismos que son adecuados para uso en la presente
20 invención se describen en las Patentes de Estados Unidos 6,028,183, y 6,007,992.

La afinidad de unión mejorada de los derivados de fenoxazina junto con su especificidad de secuencia no comprometida los hace análogos

valiosos de las nucleobases para el desarrollo de fármacos más potentes basados en antisentido. De hecho, se han derivados datos prometedores a partir de experimentos in vitro demostrando que los heptanucleótidos que contienen sustituciones en la fenoxazina son capaces de activar la RNasa H, mejorar la toma celular y exhibir una actividad antisentido incrementada (Lin, K.-Y.; Matteucci, M. J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 8531-8532). La actividad mejorada fue incluso más pronunciada en el caso de unión-G, puesto que una sustitución única mostró mejorar significativamente la potencia in vitro de un 2'-deoxifosforotioato oligonucleótidos de 20 elementos (Flanagan, W. M.; Wolf, JJ.; Olson, P.; Grant, D.; Lin, K.-Y.; Wagner, R. W.; Matteucci, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96, 3513-3518).

Los compuestos heterocíclicos policíclicos modificados adicionales útiles como bases heterocíclicas se describen en pero no se limitan a, la Patente de E.U.A. anteriormente mencionada 3,687,808, así como a las Patentes de E.U.A.: 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,434,257; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,646,269; 5,750,692; 5,830,653; 5,763,588; 6,005,096; y 5,681,941, y Publicación de E.U.A. Pre-Apoyo económico 20030158403.

20

Combinaciones

Las composiciones de la invención pueden contener dos o más compuestos oligoméricos. En otra modalidad relacionada, las composiciones

de la presente invención pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos hacia un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico blanco. Alternativamente, las composiciones de la presente invención

5 pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico blanco. Dos o más compuestos combinados se pueden utilizar juntos o secuencialmente.

Terapia de combinación

10 Los compuestos de la invención se pueden utilizar en terapia de combinación, en donde se logra un efecto aditivo mediante la administración de uno o más compuestos de la invención y uno o más de otros compuestos terapéuticos/profilácticos adecuados para tratar una condición. Los compuestos terapéuticos/profilácticos adecuados incluyen, pero no se limitan

15 a, agentes que disminuyen la glucosa, agentes anti-obesidad, y agentes que disminuyen los lípidos. Los agentes que disminuyen la glucosa incluyen, pero no se limitan a hormonas, miméticos de hormona, o miméticos de incretina (por ejemplo, insulina, incluyendo insulina inhalada, GLP-1 o análogos de GLP-1 tales como liraglutida, o exenatida), inhibidores de DPP(IV), una

20 sulfonilurea (por ejemplo, acetohexamida, clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, glimepirida, una glipizida, gliburida o una gliclazida), una biguanida (metformina), una meglitinida (por ejemplo, nateglinida o repaglinida), una tiazolidinediona u otros agonistas PPAR-gamma (por

ejemplo, pioglitazona o rosiglitazona), un inhibidor de la alfa-glucosidasa (por
 ejemplo, acarbosa o miglitol), o un compuesto antisentido no dirigidos hacia
 GCGR. También se incluyen los agonistas de PPAR dual (por ejemplo,
 muraglitazar, que se ha desarrollado por Bristol-Myers Squibb, o tesaglitazar,
 5 que se ha desarrollado por Astra-Zeneca). También se incluyen los otros
 tratamientos para la diabetes en el desarrollo (por ejemplo LAF237, que se ha
 desarrollado por Novartis; MK.-0431, que se ha desarrollado por Merck; o
 rimonabant, que se ha desarrollado por Sanofi-Aventis). Los agentes anti-
 obesidad incluyen, pero no se limitan a, supresores del apetito (por ejemplo
 10 fentermina o Meridia™), inhibidores de la absorción de grasa tal como orlistat
 (por ejemplo Xenical™), y formas modificadas del factor neurotrófico ciliar el
 cual inhibe las señales de hambre que estimulan el apetito. Los agentes que
 disminuyen los lípidos incluyen, pero no se limitan a, resinas que secuestran
 las sales biliares (por ejemplo, colestiramina, colestipol, y clorhidrato de
 15 colesevelam), inhibidores de la HMGCoA-reductasa (por ejemplo, lovastatina,
 pravastatina, atorvastatina, simvastatina, y fluvastatina), ácido nicotínico,
 derivados del ácido fibríco (por ejemplo, clofibrato, gemfibrozil, fenofibrato,
 bezafibrato, y ciprofibrato), probucol, neomicina, dextrotiroxina, ésteres de
 estanol vegetal, inhibidores de la absorción del colesterol (por ejemplo,
 20 ezetimiba), inhibidores de CETP (por ejemplo torcetrapib, y JTT-705),
 inhibidores de MTP (por ejemplo, implitapida), inhibidores de los
 transportadores ácidos biliares (transportadores apicales del ácido biliar
 dependientes de sodio), reguladores del CYP7a hepático, inhibidores de

ACAT (por ejemplo Avasimiba), terapéuticos para reemplazo de estrógeno (por ejemplo, tamoxigen), HDL sintético (por ejemplo ETC-216), antiinflamatorios (por ejemplo, glucocorticoides), o un compuesto antisentido no dirigido hacia GCGR. Uno o más de estos fármacos se pueden combinar
5 con uno o más de los inhibidores antisentido de GCGR para lograr un efecto terapéutico aditivo.

Síntesis del oligómero

La oligomerización de los nucleósidos modificados y no
10 modificados se puede llevar a cabo de manera rutinaria de conformidad con los procedimientos en la literatura para el ADN (Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Ed. Agrawal (1993), Humana Press) y/o ARN (Scaringe, Methods (2001), 23, 206-217. Gait et al., Applications of Chemically synthesized RNA in RNA: Protein Interactions, Ed. Smith (1998), 1-36. Gallo et
15 al., Tetrahedron (2001), 57, 5707-5713) y Publicación de E.U.A. No. US2005-0164271, la cual se incorpora en la presente invención como referencia.

Los compuestos oligoméricos de la presente invención se pueden elaborar convenientemente y de manera rutinaria a través de técnicas bien conocidas de síntesis de fase sólida. El equipo para dicha síntesis se
20 vende por varios vendedores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Cualesquiera otros métodos para dicha síntesis conocidos en la técnica se pueden emplear adicionalmente o de manera alternativa. Se

conoce bien el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados.

Purificación del oligómero y análisis

5 Los métodos para la purificación y el análisis del oligonucleótido se conocen por aquellos expertos en la técnica. Los métodos de análisis incluyen electroforesis capilar (CE) y espectroscopía de masas por electroaspersión. Dichos métodos de síntesis y de análisis se pueden llevar a cabo en placas de múltiples pozos.

10

Descripción no limitante e incorporación como referencia

Aunque ciertos compuestos, composiciones y métodos de la presente invención se han descrito con especificidad de conformidad con ciertas modalidades, los ejemplos en la presente invención sirven solamente para ilustrar los compuestos de la invención y no se pretende que limiten los mismos. Cada una de las referencias, número de acceso GENBANK®, y los similares mencionados en la presente solicitud se incorporan en la presente invención como referencia en su totalidad.

20

EJEMPLO 1**Ensayo para la modulación de la expresión**

La modulación de la expresión de GCCR se puede ensayar en una variedad de formas conocidas en la técnica. Los niveles de ARNm de GCCR se pueden cuantificar mediante, por ejemplo, análisis de Northern blot, reacción competitiva en cadena de la polimerasa (PCR), o PCR en tiempo real. El análisis de ARN se puede llevar a cabo en ARN total celular o ARNm poly(A)+ mediante los métodos conocidos en la técnica. Los métodos para el aislamiento del ARN se enseñan en, por ejemplo, Ausubel, F.M. et al, Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 1, pp. 4.1.1-4.2.9 y 4.5.1-4.5.3, John Wiley & Sons, Inc., 1993.

El análisis de Northern blot se realiza de rutina en la técnica y se enseña en, por ejemplo, Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 1, pp. 4.2.1-4.2.9, John Wiley & Sons, Inc., 1996. La PCR cuantitativa en tiempo real (PCR) se puede lograr convenientemente utilizando el sistema de detección de secuencia comercialmente disponible ABI PRISM™ 7700, disponible a partir de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y se utilizó de conformidad con las instrucciones del fabricante.

Los niveles de proteínas codificadas por GCCR se pueden cuantificar de numerosas formas bien conocidas en la técnica, tales como inmunoprecipitación, análisis de Western blot (immunoblot), ELISA o selección celular activada por fluorescencia (FACS). Los anticuerpos dirigidos a una

proteína codificada por GCCR se pueden identificar y obtener a partir de una variedad de fuentes, tal como el catálogo de anticuerpos MSRS (Aerie Corporation, Birmingham, MI), o se pueden preparar mediante métodos convencionales para generación de anticuerpos. Los métodos para la
 5 preparación de antisueros policlonales se enseñan en, por ejemplo, Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, pp. 11.12.1-11.12.9, John Wiley & Sons, Inc., 1997. La preparación de anticuerpos monoclonales se enseña en, por ejemplo, Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, pp. 11.4.1-11.11.5, John Wiley &
 10 Sons, Inc., 1997.

Los métodos para inmunoprecipitación son estándares en la técnica y se pueden encontrar en, por ejemplo, Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, pp. 10.16.1-10.16.11, John Wiley & Sons, Inc., 1998. El análisis por Western blot (immunoblot) es estándar en la
 15 técnica y se pueden encontrar en, por ejemplo, Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, pp. 10.8.1-10.8.21, John Wiley & Sons, Inc., 1997. Los ensayos inmunoabsorbentes asociados a enzima (ELISA) son estándares en la técnica y se pueden encontrar en, por ejemplo, Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, pp. 11.2.1-
 20 11.2.22, John Wiley & Sons, Inc., 1991.

El efecto de los compuestos oligoméricos de la presente invención sobre la expresión del ácido nucleico blanco se pueden evaluar en cualesquiera de una variedad de tipos celulares con la condición de que el

ácido nucléico blanco esté presente a niveles que se puedan medir. El efecto de los compuestos oligoméricos de la presente invención sobre la expresión del ácido nucléico blanco se puede determinar de manera rutinaria utilizando, por ejemplo, PCR o análisis de Northern blot. Las líneas celulares se derivan tanto a partir de tejidos normales como a partir de tipos celulares y a partir de células asociadas con diversos trastornos (por ejemplo trastornos hiperproliferativos). Las líneas celulares derivadas a partir de múltiples tejidos y especies se pueden obtener a partir de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA), the Japanese Cancer Research Resources Bank (Tokio, Japón), o the Centre for Applied Microbiology and Research (Wiltshire, Reino Unido).

Las células primarias, o aquellas células que se aíslan a partir de un animal y que no se someten a cultivo continuo, se pueden preparar de conformidad con los métodos conocidos en la técnica o se pueden obtener a partir de diversos abastecedores comerciales. Adicionalmente, las células primarias incluyen aquellas obtenidas a partir de sujetos humanos donantes en una instalación clínica (es decir donantes de sangre, pacientes quirúrgicos).

20 Tipos celulares

Los efectos de los compuestos oligoméricos sobre la expresión del ácido nucléico blanco se evaluaron en las células HepG2 y en los hepatocitos primarios de rata.

Células HepG2

La línea celular de hepatoblastoma de humano HepG2 se obtuvo a partir de the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células HepG2 se cultivaron de manera rutinaria en MEM de Eagle suplementado con 10% suero de bovino fetal, 1 mM de aminoácidos no esenciales, y 1 mM de piruvato de sodio (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Las células se sometieron a pasajes rutinariamente mediante tripsinización y dilución cuando alcanzaron aproximadamente 90% de confluencia. Se prepararon placas para cultivo con múltiples pozos para cultivo celular mediante el revestimiento con una dilución 1:100 de la colágena tipo 1 de cola de rata (BD Biosciences, Bedford, MA) en solución salina con pH regulado con fosfato. Las placas que contienen colágena se incubaron a 37°C por aproximadamente 1 hora, después de lo cual la colágena se removió y los pozos se lavaron dos veces con solución salina con pH regulado con fosfato. Las células se sembraron en placas de 96 pozos (Falcon-Primaria #353872, BD Biosciences, Bedford, MA) a una densidad de aproximadamente 8,000 células/pozo para uso en los experimentos de transfección con el compuesto oligomérico.

Hepatocitos primarios de rata:

Los hepatocitos primarios de rata se prepararon a partir de ratas Sprague-Dawley de Charles River Labs (Wilmington, MA) y se cultivaron rutinariamente en DMEM, con alto contenido de glucosa (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) suplementado con 10% de suero de bovino fetal

(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), 100 unidades por mL de penicilina, y 100 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Las células se sembraron en placas de 96 pozos (Falcon-Primaria #353872, BD Biosciences, Bedford, MA) a una densidad de
5 aproximadamente 4,000-6,000 células/pozo con tratamiento con los compuestos oligoméricos de la invención.

Tratamiento con los compuestos oligoméricos

Cuando las células alcanzaron una confluencia apropiada, éstas
10 se trataron con el oligonucleótido utilizando un método de transfección como se describe. Otros reactivos adecuados para transfección conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, LIPOFECTAMINE™, OLIGOFECTAMINE™, y FUGENE™. Otros métodos adecuados para transfección conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a,
15 electroporación.

LIPOFECTIN™

Cuando las células alcanzan un 65-75% de confluencia, éstas se tratan con oligonucleótido. El oligonucleótido se mezcla con LIPOFECTIN™
20 Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) en medio Opti-MEM™-1 con suero reducido (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) para lograr la concentración deseada del oligonucleótido y una concentración de LIPOFECTIN™ de 2.5 ó 3 µg/mL por 100 nM del oligonucleótido. Esta mezcla

de transfección se incubaba a temperatura ambiente por aproximadamente 0.5 horas. Para las células crecidas en placas de 96 pozos, los pozos se lavaron una vez con 100 μ L de OPTI-MEM™-1 y luego se trataron con 130 μ L de la mezcla para transfección. Las células crecidas en placas de 24 pozos u otras
5 placas estándares para cultivo de tejidos se trataron de manera similar, utilizando volúmenes apropiados de medio y oligonucleótido. Las células se trataron y se obtuvieron datos por duplicado o por triplicado. Después de aproximadamente 4-7 horas de tratamiento a 37°C, el medio que contenía la mezcla para transfección se reemplazó con medio de cultivo fresco. Las
10 células se cosecharon 16-24 horas después del tratamiento con el oligonucleótido.

CYTOFECTIN™

Cuando las células alcanzaron 65-75% de confluencia, se
15 trataron con el oligonucleótido. El oligonucleótido se mezcló con CYTOFECTIN™ (Gene Therapy Systems, San Diego, CA) en medio OPTI-MEM™-1 con suero reducido (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) para lograr la concentración deseada del oligonucleótido y una concentración de CYTOFECTIN™ de 2 ó 4 μ g/mL por 100 nM del oligonucleótido. Esta
20 mezcla de transfección se incubaba a temperatura ambiente por aproximadamente 0.5 horas. Para las células crecidas en placas de 96 pozos, los pozos se lavaron una vez con 100 μ L de OPTI-MEM™-1 y luego se trataron con 130 μ L de la mezcla para transfección. Las células crecidas en

placas de 24 pozos u otras placas estándares para cultivo de tejidos se trataron de manera similar, utilizando volúmenes apropiados de medio y oligonucleótido. Las células se trataron y se obtuvieron datos por duplicado o por triplicado. Después de aproximadamente 4-7 horas de tratamiento a 37°C, el medio que contenía la mezcla para transfección se reemplazó con medio de cultivo fresco. Las células se cosecharon 16-24 horas después del tratamiento con el oligonucleótido.

Oligonucleótidos control

Los oligonucleótidos control se utilizan para determinar la concentración óptima del compuesto oligomérico para una línea celular particular. Además, cuando los compuestos oligoméricos de la invención se evalúan en experimentos de selección de compuesto oligomérico o ensayos fenotípicos, los oligonucleótidos control se evalúan en paralelo con los compuestos de la invención. En ciertas modalidades, los oligonucleótidos control se utilizan como oligonucleótidos control negativos, es decir, como un método para medir la ausencia de un efecto sobre la expresión del gen o fenotipo. En modalidades alternativas, los oligonucleótidos control se utilizan como oligonucleótidos control positivos, es decir, como oligonucleótidos que se sabe que afectan la expresión del gen o fenotipo. Los oligonucleótidos control se muestran en el cuadro 2. "Nombre del blanco" indica el gen al cual se dirige el oligonucleótido. "Especies de blanco" indica las especies en las cuales el oligonucleótido es perfectamente complementario para el ARNm

blanco. "Motivo" es indicativo de las regiones químicamente distintas que comprenden el oligonucleótido. Ciertos compuestos en el cuadro 2 son oligonucleótidos quiméricos, compuestos de una región "abertura" central que consiste de 2'-deoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (5' y 3') por "alas". Las alas están compuestas de 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, también conocidos como 2'-MOE nucleótidos. El "motivo" de cada gapmer oligonucleótido se ilustra en el cuadro 2 e indica el número de nucleótidos en cada región abertura y ala, por ejemplo, "5-10-5" indica un gapmer que tiene una región abertura de 10 nucleótidos flanqueada por alas de 5-nucleótidos.

10 ISIS 29848 es una mezcla de compuesto oligomérico al azar; su secuencia se muestra en el cuadro 2, en donde N puede ser A, T, C o G. Los enlaces internucleosídicos (estructura base) son fosforotioato a lo largo de todos los oligonucleótidos en el cuadro 2. Las citosinas no modificadas se indican por "UC" en la secuencia nucleotídica; todas las otras citosinas son 5-

15 metilcitosinas.

CUADRO 2

Oligonucleótidos control para probar la línea celular, selección del compuesto oligomérico y ensayos

fenotípicos

5

ISIS#	Nombre del blanco	Especies del blanco	Secuencia (5' hacia 3')	Motivo	SEQ ID NO
113131	CD86	Humano	CGTGTGTCTGTGCTAGTCCC	5-10-5	4
289865	Caja forkhead O1A (rabdmiosarcoma)	Humano	GGCAACGTGAACAGGTCCAA	5-10-5	5
25237	Beta integrina 3	Humano	GCCCATTTGCTGGACATGC	4-10-4	6
196103	Beta integrina 3	Humano	AGCCCATTTGCTGGACATGCA	5-10-5	7
148715	Jagged 2	Humano; ratón; rata	TTGTCCCAGTCCCAGGCCTC	5-10-5	8
18076	Jun N-Terminal Cinasa-1	Humano	CTTTC ^U CGTTGGC ^U C ^U CCCTGGG	5-9-6	9
18078	Jun N-terminal cinasa-2	humano	GTGCG ^U CG ^U CGAG ^U C ^U C ^U CGAAATC	5-9-6	10
183881	Semejante a quinesina-1	Humano	ATCCAGTGCTACTGTAGTA	5-10-5	11
29848	ninguno	ninguno	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	5-10-5	12
226844	Homólogo a Notch (Drosophila) 1	Humano; ratón	GCCCTCCATGCTGGCACAGG	5-10-5	13

10

15

105990	Receptor gamma activado del proliferador de peroxisoma	Humano	AGCAAAGATCAATCCGTTA	5-10-5	14
336806	Raf cinasa C	Humano	TACAGAAGGCTGGGCCCTTGA	5-10-5	15
15770	Raf cinasa C	Ratón; desde del sarcoma del murino; rata	ATGCATT ^U CTG ^U C ^U C ^U C ^U CAAGGA	5-10-5	16

5

10

15

La concentración del oligonucleótido utilizado varía de línea celular a línea celular. Para determinar la concentración óptima del oligonucleótido para una línea celular particular, las células son tratadas con un oligonucleótido control positivo a un intervalo de concentraciones. Los

5 controles positivos se muestran en el cuadro 2. Por ejemplo, para células de humano y de primate no humano, el oligonucleótido control positivo se puede seleccionar a partir de ISIS 336806, o ISIS 18078. Para las células de ratón o de rata el oligonucleótido control positivo puede ser, por ejemplo, ISIS 15770. La concentración del oligonucleótido control positivo que resulta en una

10 reducción del 80% del ARNm blanco, por ejemplo, Raf cinasa C de rata para ISIS 15770, se utilizó entonces como la concentración de selección para los oligonucleótidos novedosos en experimentos subsecuentes para esa línea celular. Si no se alcanza una reducción del 80%, se utiliza entonces la concentración más baja del oligonucleótido control positivo que resulta en una

15 reducción del 60% en el ARNm blanco como la concentración de selección del oligonucleótido en experimentos subsecuentes para esa línea celular. Si no se alcanza una reducción del 60%, se considera que esa línea celular particular como inadecuada para experimentos de transfección del oligonucleótido. Las concentraciones de los oligonucleótidos antisentido se utilizan en la presente

20 invención de 50 nM a 300 nM cuando el oligonucleótido antisentido se transfecta utilizando un reactivo liposoma y 1 μ M a 40 μ M cuando el oligonucleótido antisentido se transfecta mediante electroporación.

EJEMPLO 2**Análisis de PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de ARNm de
GCCR**

5 La cuantificación de los niveles de ARNm de GCCR se logró mediante la PCR cuantitativa en tiempo real utilizando el sistema de detección de secuencia ABI PRISM™ 7600, 7700, o 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) de conformidad con las instrucciones del fabricante.

10 Las cantidades del gen blanco obtenidas mediante RT, PCR en tiempo real se normalizaron utilizando ya sea el nivel de expresión de GAPDH, un gen cuya expresión es constante, o mediante la cuantificación del ARN total utilizando RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). El ARN total se cuantificó utilizando el reactivo para cuantificación de ARN RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). 170 µL de reactivo de
15 trabajo RiboGreen™ (reactivo RiboGreen™ diluido 1:350 en 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 7.5) se pipetearon dentro de una placa de 96 pozos que contenía 30 µL de ARN celular purificado. La placa se leyó en un CytoFluor 4000 (PE Applied Biosystems) con excitación a 485 nm y emisión a 530 nm.

20 La expresión de GAPDH se cuantificó mediante RT, PCR en tiempo real, ya sea simultáneamente con la cuantificación del blanco o separadamente. Para la medición simultánea con la medición de los niveles blanco, la serie de iniciadores-sondas específicas al gen blanco a ser medido

se evaluaron por su capacidad para ser "formados en complejo" con una reacción de amplificación de GAPDH antes del análisis cuantitativo de PCR. La formación en complejo se refiere a la detección de múltiples especies de ADN, en este caso el blanco y la GAPDH control endógena, en un tubo único, 5 que requiere que la serie de iniciadores-sondas para GAPDH no interfieran con la amplificación del blanco.

Las sondas e iniciadores para uso en PCR en tiempo real se diseñaron para hibridar con las secuencias específicas al blanco. Los métodos para el diseño del iniciador y de la sonda se conocen en la técnica. El diseño 10 de los iniciadores y de la sonda para uso en PCR en tiempo real se puede llevar a cabo utilizando software comercialmente disponible, por ejemplo Primer Express®, PE Applied Biosystems, Foster City, CA. Los iniciadores y sondas y las secuencias de ácido nucleico blanco a las cuales se hibridan se presentan en el cuadro 4. Las sondas de PCR específicas del blanco tienen 15 FAM covalentemente unido al extremo 5' y TAMRA o MGB covalentemente unido al extremo 3', en donde FAM es el colorante fluorescente y TAMRA o MGB es el colorante eliminador.

Después del aislamiento, el ARN se sometió a la reacción secuencial de reverso transcriptasa (RT) y de PCR en tiempo real, ambas se 20 llevaron a cabo en el mismo pozo. Los reactivos para RT y PCR se obtuvieron a partir de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA). La RT, PCR en tiempo real se llevó a cabo en el mismo pozo mediante la adición de 20 µL de cóctel de PCR (regulador de pH para PCR 2.5x menos MgCl₂, 6.6 mM de MgCl₂, 375

5 μ M de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 375 nM de cada uno del
 iniciador hacia adelante y del iniciador reverso, 125 nM de la sonda, 4
 unidades de inhibidor de RNasa, 1.25 unidades de PLATINUM® Taq, 5
 unidades de MuLV reverso transcriptasa, y colorante ROX 2.5x) a placas de
 10 96 pozos que contienen 30 μ L de una solución de ARN total (20-200 ng). La
 reacción de RT se llevó a cabo mediante incubación por 30 minutos a 48°C.
 Después de una incubación de 10 minutos a 95°C para activar la PLATINUM®
 Taq, se llevaron a cabo 40 ciclos de un protocolo de PCR en dos pasos: 95°C
 por 15 segundos (desnaturalización) seguido por 60°C por 1.5 minutos
 (hibridación/extensión).

Los compuestos de la invención se evaluaron por su efecto
 sobre los niveles de ARNm blanco de humano mediante PCR cuantitativa en
 tiempo real como se describió en otros ejemplos en la presente invención,
 utilizando un diseño de serie de iniciadores-sondas para hibridar con el GCCR
 15 de humano. Por ejemplo:

Iniciador hacia adelante: TTGACATTTTGCAGGATTTGGA
 (incorporado en la presente invención como SEQ ID NO: 17)

Iniciador reverso: CCAAGGACTCTCATTCGTCTCTTT
 (incorporado en la presente invención como SEQ ID NO: 18)

20 y la sonda de PCR:

FAM-TTTCTTCTGGGTCCCC-MGB (incorporado en la presente
 invención como SEQ ID NO: 19), en donde FAM es el colorante fluorescente y
 MGB es un colorante eliminador no fluorescente.

Los compuestos de la invención se evaluaron por su efecto sobre los niveles de ARNm blanco de rata mediante PCR cuantitativa en tiempo real como se describe en otros ejemplos en la presente invención, utilizando un diseño de serie de iniciadores-sondas para hibridar con GCCR

5 de rata. Por ejemplo:

Iniciador hacia adelante: AAACAATAGTTCCTGCAGCATTACC

(incorporado en la presente invención como SEQ ID NO: 20)

Iniciador reverso: CATACAACACCTCGGGTTCAATC

(incorporado en la presente invención como SEQ ID NO: 21)

10 y la sonda de PCR:

FAM-ACCCCTACCTTGGTGTCACTGCT-TAMRA (incorporado

en la presente invención como SEQ ID NO: 22), en donde FAM es el colorante fluorescente y TAMRA es el colorante eliminador.

Los compuestos de la invención se pueden evaluar por su efecto sobre los niveles de ARNm blanco de ratón mediante PCR cuantitativa en tiempo real como se describe en otros ejemplos en la presente invención, utilizando una serie de iniciadores-sondas diseñada para hibridar al GCCR de ratón. Por ejemplo:

Iniciador hacia adelante: GACATCTTGCAGGATTTGGAGTT

20 (incorporado en la presente invención como SEQ ID NO: 23)

Iniciador reverso: AACAGGTCTGACCTCCAAGGACT

(incorporado en la presente invención como SEQ ID NO: 24)

y la sonda de PCR:

FAM-CGGGTCCCCAGGTAAAGAGACAAACGA-TAMRA

(incorporado en la presente invención como SEQ ID NO: 25), en donde FAM es el colorante fluorescente y TAMRA es el colorante eliminador.

5

EJEMPLO 3

Inhibición antisentido de la expresión de GCCR de humano por gapmers

5-10-5

Una serie de los compuestos oligoméricos se diseñó para
 10 dirigirse a las diferentes regiones de GCCR de humano, utilizando las
 secuencias publicadas citadas en el cuadro 1. Los compuestos se muestran
 en el cuadro 3. Todos los compuestos en el cuadro 3 son oligonucleótidos
 quiméricos ("gapmers") de 20 nucleótidos en longitud, compuestos de una
 región "abertura" central que consiste de 10 2'-deoxinucleótidos, que está
 15 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
 2'-MOE nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (estructura base) son
 fosforotioato a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de
 citidina son 5-metilcitidinas. Se muestra en el cuadro 3 la secuencia del
 20 oligonucleótido, y en sitio blanco el cual se encuentra en la primera posición
 (más hacia 5') en la secuencia blanco a la cual se une el compuesto. Los
 compuestos se analizaron por su efecto sobre los niveles de ARNm del gen
 blanco mediante PCR cuantitativa en tiempo real como se describe en otros

ejemplos en la presente invención, utilizando un diseño de la serie de iniciadores-sondas para hibridar con GCCR de humano.

Los datos son promedios a partir de tres experimentos en los cuales las células HepG2 se trataron con 50 nM de los compuestos oligoméricos descritos utilizando LIPOFECTIN™. Una reducción en la expresión se expresó como la inhibición porcentual en el cuadro 3. Si está presente, "N.D." indica "no determinado". Las regiones blanco a las cuales éstos compuestos oligoméricos son inhibidores se refieren en la presente invención como "segmentos blanco validados."

10

15

20

CUADRO 3

Inhibición de los niveles de ARNm de GCCR de humano por gapmers 5-10-5

No ISIS de 5-10-5	SEQ ID NO blanco	Sitio blanco	Secuencia	% de inhibición con/5-10-5	SEQ ID NO
5	361132	394	TCTGTCTCTCCCATATACAG	65	26
	361133	398	TGTTTCTGTCCTCCCATAT	56	27
	361134	402	CTTTGTTTCTGTCTCTCCC	60	28
	361135	406	ATCACTTTTGTCTCTGTCTC	80	29
	180272	497	GTTTGCAATGCTTCTCTCCA	74	30
10	345188	501	TGAGGTTTGCAATGCTTCT	71	31
	361136	505	CTATTGAGGTTTGCAATGCT	10	32
	361137	509	CGACCTATTGACCTTTGCAA	80	33
	180274	514	CTGGTCGACCTATTGAGGTT	68	34
	180275	672	CTGTGGTATACAAATTTCA	44	35
	180276	679	CTTTGGTCTGTGGTATACAA	78	36
	345198	689	GTCAAAGGTGCTTTGGTCTG	79	37
	180279	877	GGTTTAGTGTCCGGTAAAT	60	38
	361138	954	CTTTTCTGTTTTCACCTGG	70	39
	180280	1000	TTCTCTTGCTTAATTACCCC	77	40
15	345218	1004	CAGTTTCTCTTGCTTAATTA	67	41
	180281	1007	GCCCAGTTTCTCTTGCTTAA	74	42
	361139	1058	TTTATTACCAATTATATTG	0	43
	361140	1062	ACATTTTATTACCAATTATA	35	44

361141	1	1066	GCAGACATTTTATTACCAAT	78	45
361142	1	1070	AATGGCAGACATTTTATTAC	40	46
361143	1	1074	CAGAAATGGCAGACATTTTA	63	47
361144	1	1078	TGAACAGAAATGGCAGACAT	61	48
180283	1	1081	CCATGAACAGAAATGGCAGA	69	49
361145	1	1085	CACACCATGAACAGAAATGG	30	50
361146	1	1089	TACTCACACCATGAACAGAA	60	51
361147	1	1093	GAGGTACTCACACCATGAAC	71	52
361148	1	1097	TCCAGAGGTACTCACACCAT	75	53
361149	1	1101	GTCCTCCAGAGGTACTCACA	69	54
361150	1	1105	ATCTGTCTCCAGAGGTACT	53	55
361151	1	1109	GTACATCTGTCTCCAGAGG	75	56
361152	1	1113	AGTGTACATCTGTCTCTCCA	62	57
361153	1	1117	TCATAGTGGTACATCTGTCC	52	58
361154	1	1121	CATGTCATAGTGGTACATCT	57	59
361155	1	1125	TATTCATGTCATAGTGGTAC	41	60
361156	1	1129	GCTGTATTCATGTCATAGTG	67	61
361157	1	1133	GGATGCTGTATTCATGTCAT	67	62
361158	1	1137	AAAGGGATGCTGTATTCATG	45	63
180288	1	1141	TGAGAAAGGGATGCTGTATT	62	64
180289	1	1181	TGGTGAATGACATTAAAAA	54	65
361159	1	1185	GAATTGGTGAATGACATTAA	24	66
361160	1	1324	GAGCTTACATCTGGTCTCAT	59	67
361161	1	1328	AGGAGAGCTTACATCTGGTC	65	68

5

10

15

361162	1	1332	ATGGAGGAGAGCTTACA	18	69
361163	1	1336	CTGGATGGAGGAGAGCTTAC	50	70
361164	1	1339	GAGCTGGATGGAGGAGAGCT	49	71
361165	1	1468	TGTCCTTCCACTGCTCTTT	61	72
361166	1	1472	GTGCTGTCTCTTCCACTGCTC	65	73
361167	1	1476	AATTGTGCTGTCTCTTCCACT	62	74
361168	1	1480	AGGTAATTGTCTGTCTCTTC	52	75
361169	1	1543	CGGCATGCTGGGCAGTTTTT	78	76
361170	1	1547	ATAGCGGCATGCTGGGCAGT	58	77
361171	1	1549	CGATAGCGGCATGCTGGGCA	65	78
361172	1	1570	ATTCCAGCCCTGAAGACATTT	24	79
361173	1	1574	GTTCAATCCAGCCTGAAGAC	52	80
361174	1	1597	TTCTTTGTTTTTCGAGCTTC	62	81
361175	1	1601	TTTTTCTTTGTTTTTCGAG	48	82
180297	1	1680	CAGGAACATAATGTTTTGTTA	33	83
361176	1	1682	TGCAGGAACTATTGTTTTGT	46	84
361177	1	1765	GAGCTATCATATCCTGCATA	71	85
361178	1	1769	AACAGAGCTATCATATCCTG	51	86
361179	1	1773	CTGGAACAGAGCTATCATAT	67	87
361180	1	1840	TTCACTGCTGCAATCACTTG	52	88
361181	1	1844	CCATTTCACTGCTGCAATCA	55	89
361182	1	1848	TTGCCCATTTCACTGCTGCA	70	90
361183	1	1999	ATAATCAGATCAGGAGCAAA	36	91
361184	1	2003	ATTAATAATCAGATCAGGAG	10	92

361185	1	2007	GCTCATTATAATCAGATCA	43	93
361186	1	2011	CTCTGCTCATTATAATCAG	0	94
180302	1	2015	CATTCTCTGCTCATTATAA	23	95
180304	1	2053	AGCATGTGTTTACATTGGTC	73	96
361187	1	2119	AAGGTTTTTCATACAGAGATA	38	97
361188	1	2123	CAGTAAGGTTTTTCATACAGA	22	98
361189	1	2127	GAAGCAGTAAGGTTTTTCATA	46	99
180307	1	2131	GAGAGAAGCAGTAAGGTTTT	32	100
361190	1	2212	GCITTTCCTAGCTCTTTGAT	74	101
361191	1	2215	ATGGCTTTTCCTAGCTCTTT	68	102
361192	1	2347	ATGGTCTTATCCAAAAATGT	63	103
361193	1	2351	ACTCATGGTCTTATCCAAA	66	104
361194	1	2355	CAATACTCATGGTCTTATCC	54	105
361195	1	2359	AATTCATACTCATGGTCTT	69	106
361196	1	2383	ATGATTTTCAGCTAACATCTC	1	107
180311	1	2386	GTGATGATTTTCAGCTAACAT	59	108
361197	1	2407	GAATATTTTGGTATCTGATT	59	109
361198	1	2411	ATTIGAATAATTTGGTATCT	20	110
361199	1	2415	TTCCATTTGAATAATTTGGT	65	111
361200	1	2419	ATAATTTCCATTTGAATATTT	51	112
361202	1	2425	TTTTTGATATTTCCATTTGA	20	113

Se prefieren los oligonucleótidos gapmer 5-10-5 mostrados en el cuadro 3 los cuales logran una expresión reducida de GCCR en al menos 30%. Los segmentos blanco a los cuales son complementarias estas secuencias preferidas se refieren en la presente invención como "segmentos blanco preferidos" y por lo tanto se prefieren para el direccionamiento por los compuestos de la presente invención. Otro aspecto de la presente invención es un compuesto antisentido dirigido hacia GCCR que comprende una porción de 8 nucleobases de SEQ ID NOs: 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, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, o 113 en donde dicho compuesto hibrida específicamente con y reduce la expresión de GCCR. En una modalidad el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido, 20 nucleobases de longitud caracterizado por una región de 10-deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con cinco 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. En una modalidad, todos los enlaces internucleosídicos son enlaces fosforotioato. En una modalidad, todas las citosinas son 5-metilcitosinas.

EJEMPLO 4**Inhibición antisentido de la expresión de GCCR de humano por
oligonucleótidos de abertura-dilatada**

5 De conformidad con la presente invención, también se evaluaron los oligonucleótidos de abertura-dilatada que tienen las mismas secuencias que los compuestos descritos en el cuadro 4. Todos los compuestos en el cuadro 4 son oligonucleótidos quiméricos ("gapmers") de 20 nucleótidos en longitud, compuestos de una región "abertura" central que consiste de 16 2'-
10 deoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (5' y 3') por "alas" de dos-nucleótidos. Las alas están compuestas de 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos, también conocidos como 2'-MOE nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (estructura base) son fosforotioato a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se muestra en el cuadro 4 la
15 secuencia del oligonucleótido, y el sitio blanco el cual es la primera porción (más hacia 5') en la secuencia blanco a la cual se une el compuesto. Los compuestos motivo 2-16-2 se analizaron por su efecto sobre los niveles de ARNm del gen blanco mediante PCR cuantitativa en tiempo real como se describe en la presente invención.

20 Los datos fueron promediados a partir de tres experimentos en los cuales las células HepG2 se trataron con 50 nM de los compuestos oligoméricos descritos utilizando LIPOFECTIN™. Una reducción en la expresión se expresa como la inhibición porcentual en el cuadro 4. Si está

CUADRO 4

Inhibición de los niveles de ARNm de GCCR de humano por gapmers 2-16-2

No ISIS de 2-16-2	SEQ ID NO blanco	Síto blanco	Secuencia	% inhibición con/2-16-2	SEQ ID NO
372350	1	394	TCTGTCCTCCCATATACAG	69	26
372376	1	398	TGTTTCTGTCCTCCTCCATAT	72	27
372331	1	402	CTTTTGTTTCTGTCCTCCTCC	67	28
372341	1	406	ATCACTTTTGTTTCTGTCCTC	63	29
352983	1	497	GTTTGCAATGCTTTCTCTCCA	64	30
372365	1	501	TGAGGTTTGCAATGCTTTCT	69	31
372387	1	505	CTATTGAGGTTTGCAATGCT	70	32
372316	1	509	CGACCTATTGACCTTTTGCAA	73	33
372310	1	514	CTGTCGACCTATTGAGGTT	70	34
372315	1	672	CTGTGGTATACAAATTCACA	35	35
372326	1	679	CTTTGGTCTGTGTATACAA	54	36
372339	1	689	GTCAAAGGTGCTTTTGCTG	81	37
372322	1	877	GGTTAGTGTCGGTAAAT	78	38
372361	1	954	CTTTTCTGTTTTCACCTTG	70	39
372308	1	1000	TTCTCTTGCTTAATTACCCC	84	40
372304	1	1004	CAGTTCTCTTGCTTAATTA	66	41
352984	1	1007	GCCAGTTTCTCTTGCTTAA	80	42
372372	1	1058	TTTATTACCAATTATATTG	0	43
372327	1	1062	ACATTTTATTACCAATTATA	11	44

5

10

15

372311	1	1066	GCAGACATTTTATTACCAAT	65	45
372352	1	1070	AATGGCAGACATTTTATTAC	54	46
372337	1	1074	CAGAAATGGCAGACATTTTA	36	47
372323	1	1078	TGAACAGAAATGGCAGACAT	73	48
372347	1	1081	CCATGAACAGAAATGGCAGA	86	49
372383	1	1085	CACACCATGAACAGAAATGG	73	50
372348	1	1089	TACTCACACCATGAACAGAA	82	51
372363	1	1093	GAGGTACTCACACCATGAAC	47	52
372364	1	1097	TCCAGAGGTACTCACACCAT	82	53
372359	1	1101	GTCCTCCAGAGGTACTCACA	69	54
372344	1	1105	ATCTGTCTCCAGAGGTACT	72	55
372307	1	1109	GTACATCTGTCTCCAGAGG	74	56
372370	1	1113	AGTGGTACATCTGTCTCCA	69	57
372374	1	1117	TCATAGTGGTACATCTGTCC	0	58
372355	1	1121	CATGTCATAGTGGTACATCT	65	59
372385	1	1125	TATTCATGTCATAGTGGTAC	18	60
372319	1	1129	GCTGTATTTCATGTCATAGTG	23	61
372366	1	1133	GGATGCTGTATTTCATGTCAT	37	62
372330	1	1137	AAAGGGATGCTGTATTTCATG	80	63
372333	1	1141	TGAGAAAGGGATGCTGTATT	68	64
372358	1	1181	TGGTGAATGACATTAAAAA	67	65
372381	1	1185	GAATTGGTGGAAATGACATTA	30	66
372377	1	1324	GAGCTTACATCTGGTCTCAT	45	67
372309	1	1328	AGGAGAGCTTACATCTGGTC	63	68

5

10

15

372388	1	1332	ATGGAGGAGAGCTTACAICT	55	69
372321	1	1336	CTGGATGGAGGAGAGCTTAC	51	70
372312	1	1339	GAGCTGGATGGAGGAGAGCT	60	71
372324	1	1468	TGTCCTTCCACTGCTCTTT	73	72
372332	1	1472	GTGCTGTCTCTTCCACTGCTC	81	73
372335	1	1476	AATTGTGCTGTCTCTTCCACT	42	74
372342	1	1480	AGGTAATTGTGCTGTCTCTTC	100	75
372345	1	1543	CGGCATGCTGGGCAGTTTTT	82	76
372356	1	1547	ATAGCGGCATGCTGGGCAGT	73	77
372305	1	1549	CGATAGCGGCATGCTGGGCA	80	78
372367	1	1570	ATCCAGCCCTGAAGACATTT	78	79
372353	1	1574	GTTCAATCCAGCCTGAAGAC	70	80
372364	1	1597	TTCTTTGTTTTTCGAGCTTC	47	81
372340	1	1601	TTTTTCTTTGTTTTTCGAG	100	82
372369	1	1680	CAGGAACATAATTGTTTTGTTA	56	83
372378	1	1682	TGCAGGAACTATTGTTTTGT	41	84
372317	1	1765	GAGCTATCATATCCTGCATA	84	85
372351	1	1769	AACAGAGCTATCATATCCTG	69	86
372389	1	1773	CTGGAACAGAGCTATCATAT	76	87
372362	1	1840	TTCACCTGCTGCAATCACTTG	64	88
372328	1	1844	CCATTTCACCTGCTGCAATCA	81	89
372338	1	1848	TTGCCCATTTTCACTGCTGCA	82	90
372349	1	1999	ATAATCAGATCAGGAGCAAAA	10	91
372373	1	2003	ATTAATAATCAGATCAGGAG	30	92

372360	1	2007	GCATTAATAATCAGATCA	27	93
372384	1	2011	CTCTGCTCATTAAATACAG	100	94
372380	1	2015	CATTCTCTGCTCATTAAATA	2	95
372320	1	2053	AGCATGTGTTTACATTGGTC	75	96
372371	1	2119	AAGGTTTTTCATACAGAGATA	37	97
372382	1	2123	CAGTAAGGTTTTTCATACAGA	44	98
372306	1	2127	GAAGCAGTAAGGTTTTTCATA	48	99
372343	1	2131	GAGAGAAAGCAGTAAGGTTTT	46	100
372313	1	2212	GCTTTTCCTAGCTCTTTGAT	66	101
372325	1	2215	ATGGCTTTTCCCTAGCTCTTT	69	102
372336	1	2347	ATGGTCTTATCCAAAAATGT	65	103
372318	1	2351	ACTCATGGTCTTATCCAAAA	70	104
372375	1	2355	CAATACATCATGGTCTTATCC	85	105
372346	1	2359	AATCAATACATCATGGTCTT	47	106
372386	1	2383	ATGATTTTCAGCTAACATCTC	74	107
372354	1	2386	GTGATGATTTTCAGCTAACAT	66	108
372357	1	2407	GAATATTTTGGTATCTGATT	13	109
372368	1	2411	ATTTGAATATTTTGGTATCT	0	110
372379	1	2415	TTCCATTTGAATATTTTGGT	44	111
372390	1	2419	ATATTTCCATTTGAATATTT	0	112
372329	1	2425	TTTTTGATATTTCCATTTGA	0	113

Se prefieren los oligonucleótidos 2-16-2 que se muestran en el cuadro 4 los cuales reducen la expresión de GCCR en al menos 30%. Los segmentos blanco a los cuales estas secuencias preferidas son complementarias se refieren en la presente invención como "segmentos blanco preferidos" y por lo tanto se prefieren para direccionamiento mediante los compuestos de la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención es un compuesto antisentido dirigido hacia GCCR que comprende una porción de 8-nucleobases de SEQ ID NOs: 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, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, o 113 en donde dicho compuesto hibrida específicamente con y reduce la expresión de GCCR. En una modalidad el compuesto antisentido es un antisentido oligonucleótido de 20 nucleobases de longitud caracterizado por una región de 16 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. En una modalidad, todos los enlaces internucleosídicos son enlaces fosforotioato. En una modalidad, todas las citosinas son 5-metilcitosinas.

EJEMPLO 5**Oligonucleótidos de cruce de especies dirigidos a GCCR**

Algunos oligonucleótidos descritos en el ejemplo previo son especies híbridas complementarias y por lo tanto se espera que reduzcan la expresión del receptor glucocorticoide entre las especies. Se muestra en el cuadro 5 la secuencia de dichos oligonucleótidos de cruce de especies, y los números ISIS del motivo versión 5-10-5 y el motivo versión 2-16-2 del oligonucleótido. También se indica para cada secuencia el sitio blanco el cual es la primera posición (más hacia 5') en la secuencia blanco de humano (NM_000176.1, incorporado en la presente invención como SEQ ID NO: 1) a la cual se une el compuesto. Se indica la complementariedad para ARNm de GCCR de humano, de mono cynomolgus, de rata, y de ratón ("si" significa complementariedad perfecta y "1 mm" significa una inconsistencia a partir de la complementariedad perfecta).

CUADRO 5
Oligonucleótidos de cruz a de especies dirigidos a GCCR

ISIS # del gapmer 5- 10-5	ISIS # del gapmer 2- 16-2	SEQ ID NO	Secuencia	Posición en SEQ ID NO: 1	Complemento perfecto a:		
					Humano	Mono	Rata
361137	372316	33	cgacctattgaggttgcaa	509	si	si	si
180276	372326	36	cittggtctgtgtatacaa	679	si	1 mm	1 mm
345198	372339	37	gtcaaagggtgtttgtctg	689	si	si	si
180304	372320	96	agcatgtgtttacattggc	2053	si	si	si
180275	372315	35	ctgtgtatacaatttcaca	672	si	1 mm	1 mm
361141	372311	45	gcagacattttattaccaat	1066	si	si	1 mm
180281	352984	42	gccagtttctcttgcttaa	1007	si	si	si
361151	372307	56	gtacatctgtcccccagagg	1109	si	si	si
180274	372310	34	ctggtcgacctattgaggtt	514	si	si	si
361156	372319	61	gctgtattcatgcatagtg	1129	si	si	si

5

10

15

EJEMPLO 6**Inhibición antisentido de los niveles de ARNm de GCCR de humano y de
rata - estudios dosis-respuesta con gapmers 5-10-5**

5 En una modalidad adicional de la presente invención, se
seleccionaron once oligonucleótidos para estudios adicionales de dosis-
respuesta. Los hepatocitos primarios de rata se trataron con 5, 10, 25, 50, 100
o 200 MICROM de ISIS 180274, ISIS 180275, ISIS 180276, ISIS 180281, ISIS
180304, ISIS 361137, ISIS 361141, ISIS 361151, ISIS 361156, ISIS 345198,
10 ISIS 361137 o los oligonucleótido control negativos ISIS 141923
(CCTTCCCTGAAGGTTCTCC, incorporado en la presente invención como
SEQ ID NO: 114), y se midieron los niveles de ARNm como se describe en
otros ejemplos en la presente invención. ISIS 141923 es un 5-10-5 gapmer
que comprende una abertura de diez deoxinucleótidos flanqueada por alas 2'-
15 MOE y una estructura base de fosforotioato. Todas las citosinas son 5-
metilcitosinas. Las células no tratadas sirvieron como el control con respecto
al cual se normalizaron los datos.

Los resultados de estos estudios se muestran en el cuadro 6.
Los niveles de ARNm blanco se midieron mediante PCR en tiempo real como
20 se describe en la presente invención. Los datos son los promedios de tres
experimentos y se expresan como la inhibición porcentual en relación con el
control no tratado.

CUADRO 6

Inhibición dosis-dependiente de la expresión de GCCR en hepatocitos primarios de rata

5

ISIS#	SEQ ID NO	% de inhibición					
		Dosis de oligonucleótido (nM)					
		5	10	25	50	100	200
180274	34	16	33	29	65	84	89
180275	35	0	13	56	84	84	90
180276	36	23	43	43	68	89	93
180281	42	0	20	33	75	86	87
180304	96	42	51	47	75	86	91
361137	33	40	30	48	81	83	89
361141	45	36	61	48	77	87	92
361151	56	10	28	42	77	90	94
361156	61	22	47	46	66	84	92
345198	37	0	35	53	81	77	85
361158	63	34	50	47	79	91	93
141923	114	0	10	18	43	0	12

10

En una modalidad adicional de la presente invención, se probaron los mismos oligonucleótidos en la línea celular HepG2 de humano por su capacidad para reducir la expresión del ARNm de GCCR a las dosis indicadas. Las células no tratadas sirvieron como el control con respecto al cual se normalizaron los datos.

Los resultados de estos estudios se muestran en el cuadro 7. Los niveles de ARNm blanco se midieron mediante PCR en tiempo real como se describe en la presente invención. Los datos son los promedios de tres experimentos y se expresan como la inhibición porcentual en relación con el control no tratado.

CUADRO 7

Inhibición dosis-dependiente de la expresión de GCCR en células HepG2

5

ISIS#	SEQ ID NO	% de inhibición					
		Dosis de oligonucleótido (nM)					
		1	10	25	50	100	200
180274	34	0	31	54	66	77	83
180275	35	13	54	75	86	93	94
180276	36	26	77	87	92	94	98
180281	42	3	46	68	80	90	84
180304	96	0	64	90	90	92	91
361137	33	18	71	84	91	92	86
361141	45	1	49	81	85	73	78
361151	56	22	42	71	82	89	91
361156	61	7	75	75	79	80	82
345198	37	17	71	79	86	80	82
361158	63	11	35	78	80	82	77
141923	114	15	12	20	12	14	3

10

Como se muestra en el cuadro 6 y en el cuadro 7, los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a GCCR son efectivos para reducir los niveles de ARNm blanco tanto de humano como de rata de manera dosis dependiente.

EJEMPLO 7

Inhibición antisentido de los niveles del ARNm de GCCR de rata - estudios dosis respuesta in vivo con gapmers 5-10-5

Cinco de los oligonucleótidos motivo gapmer 5-10-5 (ISIS 180281, ISIS 361137, ISIS 345198, ISIS 180304, y ISIS 361141) se evaluaron

a diversas dosis en ratas por su capacidad para reducir los niveles de ARNm de GCCR en el hígado. Las ratas Sprague Dawley de ocho semanas de edad se dividieron en grupos de tratamiento que recibieron dosis de 50, 25 o 12.5 mg/kg de uno de los oligonucleótidos indicados vía inyección. Cada grupo de tratamiento estaba comprendido de cuatro animales, y se dosificó dos veces a la semana por 3 semanas. Los animales inyectados con solución salina sola sirvieron como un grupo control. Los animales se evaluaron semanalmente para parámetros estándares en sangre (ALT/AST, colesterol, triglicéridos, y glucosa). Los animales se sacrificaron al término del estudio y el tejido hepático se recolectó y se analizó para reducción del blanco utilizando los métodos de análisis de PCR en tiempo real descritos en la presente invención. Los resultados se muestran en los cuadros 8a y 8b (experimentos separados) como el porcentaje de reducción en el ARNm de GCCR medido después del tratamiento con las dosis indicadas de los oligonucleótidos indicados.

15

CUADRO 8a

oligonucleótidos antisentido GCCR por selección en rata in vivo

20

Compuesto	% de reducción en ARNm de GCCR en hígado de rata (en comparación con controles tratados con solución salina)		
	50 mg/kg	25 mg/kg	12.5 mg/kg
ISIS 180281	68	65	48
ISIS 1803304	52	34	0
ISIS 345198	63	58	52

CUADRO 8b

oligonucleótidos antisentido GCCR por selección en rata in vivo

5

Compuesto	% de reducción en ARNm de GCCR en hígado de rata (en comparación con controles tratados con solución salina)		
	50 mg/kg	25 mg/kg	12.5 mg/kg
ISIS 180281	62	62	59
ISIS 361137	59	47	32
ISIS 361141	61	49	22

Los datos en los cuadros 8a y 8b muestran que los
10 oligonucleótidos antisentido dirigidos a GCCR son efectivos para reducir la
expresión in vivo de manera dosis dependiente. ISIS 345198
(GTCAAAGGTGCTTTGGTCTG; SEQ ED NO: 37) se eligió para evaluación
adicional en experimentos de estructura-actividad enfocándose en la
optimización de la abertura. Este compuesto es perfectamente
15 complementario con el ARN del receptor glucocorticoide de ratón, rata,
humano, mono, conejo y conejillo de Indias.

EJEMPLO 8

Inhibición antisentido de los niveles de ARNm de GCCR in vivo – estudio
20 **de optimización de abertura**

Se diseñó una serie de compuestos oligoméricos para dirigirse a
GCCR con tamaños variables del deoxinucleótido de las abertura y alas 2'-

MOE. Cada uno de los oligonucleótidos evaluados tiene la misma secuencia de nucleobases (GTCAAAGGTGCTTTGGTCTG, incorporado en la presente invención como SEQ ID NO: 37) y por lo tanto se dirige al mismo segmento de SEQ ID NO: 1 (nucleobases 689 a 709). Como se muestra en el ejemplo 5, este oligonucleótido también es perfectamente complementario a GCCR de rata.

Los compuestos se muestran en el cuadro 9. El texto sencillo indica un deoxinucleótido, y nucleobases diseñadas en negritas, el texto subrayado son 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos son fosforotioato a lo largo de todo el texto, y todas las citosinas son 5-metilcitosinas. Se indica en el cuadro 9 el "motivo" de cada compuesto indicativo de las regiones químicamente distintas que comprenden el oligonucleótido.

15

CUADRO 9

Compuestos antisentido que se dirigen a GCCR de rata

20

Numero ISIS	Química	SEQ ID NO:	Motivo
345198	GTCAAAGGTGCTTTGGTCTG	37	gapmer 5-10-5
372339	GTCAAAGGTGCTTTGGTCTG	37	gapmer 2-16-2
377130	GTCAAAGGTGCTTTGGTCTG	37	gapmer 3-14-3
377131	GTCAAAGGTGCTTTGGTCTG	37	gapmer 4-12-4

Las ratas macho Sprague-Dawley de nueve semanas de edad se trataron dos veces a la semana por tres semanas con dosis de 50, 25, 12.5, y 6.25 mg/kg de los oligonucleótidos presentes en el cuadro 9. Los animales inyectados con solución salina sola sirvieron como controles. Cada grupo de tratamiento estaba comprendido de cuatro animales y los animales se monitorearon semanalmente para las transaminasas en plasma, lípidos, niveles de glucosa y ganancia de peso corporal. Como se esperaba para los animales normales, no se observaron alteraciones sustanciales en la glucosa. Los niveles de línea basal (antes del inicio del tratamiento) de los niveles del colesterol en plasma (CHOL) y de triglicéridos (TRIG) y los niveles medidos en la semana 3 se muestran en el cuadro 10 en mg/dL como el promedio para cada grupo de tratamiento.

15

20

CUADRO 10

Efecto de los oligonucleótidos dirigidos a GCCR sobre los niveles de lípidos en plasma en ratas normales

Tratamiento	Línea basal TRIG (mg/dL)	Semana 3 TRIG (mg/dL)	Línea basal COL (mg/dL)	Semana 3 COL (mg/dL)
Solución salina	78	70	77	62
345198, 50 mg/kg	50	23	66	35
345198, 25 mg/kg	99	34	69	39
345198, 12.5 mg/kg	71	52	64	42
345198, 6.25 mg/kg	139	99	78	58
372339, 50 mg/kg	93	29	75	54
372339, 25 mg/kg	86	33	70	40
372339, 12.5 mg/kg	104	71	69	49
372339, 6.25 mg/kg	103	102	71	56
377130, 50 mg/kg	91	21	65	41
377130, 25 mg/kg	82	32	75	41
377130, 12.5 mg/kg	84	68	72	47
377130, 6.25 mg/kg	76	67	70	52
377131, 50 mg/kg	96	28	85	48
377131, 25 mg/kg	83	25	75	42
377131, 12.5 mg/kg	64	49	79	44
377131, 6.25 mg/kg	119	110	75	60

Como se muestra en el cuadro 10, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos a GCCR ocasiona disminuciones dependientes de la dosis en los niveles de colesterol y de triglicéridos. Por lo tanto, una modalidad de la presente invención es un método para disminuir los niveles de lípidos en sangre en un animal que comprende administrar a dicho animal un oligonucleótido de abertura-dilatada. En una modalidad preferida, el oligonucleótido de abertura-dilatada tiene la secuencia de SEQ ID NO: 37. En

otras modalidades preferidas, el oligonucleótido de abertura-dilatada es ISIS 372339, ISIS 377130, o ISIS 377131.

Al término del estudio, los animales se sacrificaron, se midieron los pesos del órgano, y los tejidos se recolectaron para la determinación de la
5 reducción del blanco y de la concentración del oligonucleótido.

El tejido adiposo blanco se analizó para reducción del blanco utilizando el método de análisis de PCR en tiempo real descrito en la presente invención. Los resultados se muestran en los cuadros 11a, 11b, y 11c (experimentos separados) como la reducción porcentual en el ARNm de
10 GCCR medida después del tratamiento con las dosis indicadas de los oligonucleótidos indicados. Los tejidos a partir de animales tratados con cada oligonucleótido de abertura-dilatada se ensayaron para la reducción del blanco a lo largo de los tejidos a partir de animales tratados con el oligonucleótido motivo 5-10-5 para comparación.

15

20

CUADRO 12a

**Reducción in vivo de los niveles de GCCR en tejido adiposo blanco con
oligonucleótidos 2-16-2**

5

Grupo de tratamiento	% de inhibición			
	Dosis de oligonucleótido (mg/kg)			
	50	25	12.5	6.25
ISIS 345198	56	26	17	7
ISIS 372339	34	0	8	8

CUADRO 11b

10 **Reducción in vivo de los niveles de GCCR en tejido adiposo blanco con
oligonucleótidos 3-14-3**

15

Grupo de tratamiento	% de inhibición			
	Dosis de oligonucleótido (mg/kg)			
	50	25	12.5	6.25
ISIS 345198	59	49	27	22
ISIS 377130	34	37	21	18

CUADRO 11c

**Reducción in vivo de los niveles de GCCR en tejido adiposo blanco con
oligonucleótidos 4-12-4**

20

Grupo de tratamiento	% de inhibición			
	Dosis de oligonucleótido (mg/kg)			
	50	25	12.5	6.25
ISIS 345198	56	23	21	7
ISIS 377131	55	23	15	0

El tejido hepático también se analizó para reducción del blanco utilizando los métodos de análisis de PCR en tiempo real descritos en la presente invención. Los resultados se muestran en los cuadros 12a, 12b, y 12c (experimentos separados) como la reducción porcentual en el ARNm de GCCR medida después del tratamiento con las dosis indicadas de los oligonucleótidos indicados. Los tejidos a partir de animales tratados con cada oligonucleótido de abertura-dilatada se ensayaron para reducción del blanco a lo largo de los tejidos a partir de los animales tratados con el motivo oligonucleótido 5-10-5 para comparación.

10

CUADRO 12a
Reducción in vivo de los niveles de GCCR en hígado con
oligonucleótidos 2-16-2

15

Grupo de tratamiento	% de inhibición			
	Dosis de oligonucleótido (mg/kg)			
	50	25	12.5	6.25
ISIS 345198	78	77	65	51
ISIS 372339	83	77	56	44

20

CUADRO 12b

**Reducción in vivo de los niveles de GCCR en hígado con
oligonucleótidos 3-14-3**

5

Grupo de tratamiento	% de inhibición			
	Dosis de oligonucleótido (mg/kg)			
	50	25	12.5	6.25
ISIS 345198	78	80	67	54
ISIS 377130	87	78	68	43

10

CUADRO 12c

**Reducción in vivo de los niveles de GCCR en hígado con
oligonucleótidos 4-12-4**

15

Grupo de tratamiento	% de inhibición			
	Dosis de oligonucleótido (mg/kg)			
	50	25	12.5	6.25
ISIS 345198	76	75	58	49
ISIS 377131	82	64	60	61

20

Como se muestran los cuadros 11a, 11b, y 11c, todos los oligonucleótidos de abertura-dilatada evaluados fueron efectivos para reducir los niveles de GCCR de manera dosis dependiente in vivo. Además, los oligonucleótidos abertura-dilatada muestran una tendencia hacia una mayor potencia que el gapmer 5-10-5 en el hígado.

Además, para determinar los efectos de alterar el tamaño de la abertura sobre las farmacocinéticas, se determinó la concentración del oligonucleótido en el riñón e hígado. Los métodos para determinar la concentración del oligonucleótido en los tejidos se conocen en la técnica (Geary et al., Anal Biochem, 1999, 274, 241 -248). El oligonucleótido total es la suma de todos los metabolitos del oligonucleótidos detectados en el tejido. Se muestra en el cuadro12 la concentración total y la concentración del oligonucleótido de longitud total (en µg/g) en el hígado de animales tratados con el oligonucleótido indicado a la concentración indicada.

10

CUADRO 12

Concentración del oligonucleótido GCCR en hígado de rata

15

Tratamiento	Motivo	Dosis	Oligo hepatico total	Hepatico de longitud total
ISIS 345198	5-10-5	25 mg/kg	507	408
		12.5 mg/kg	318	224
ISIS 372339	2-16-2	25 mg/kg	450	306
		12.5 mg/kg	311	183
ISIS 377130		25 mg/kg	575	315
		12.5 mg/kg	350	212
ISIS 377131	4-12-4	25 mg/kg	584	424
		12.5 mg/kg	354	265

20

Como se muestra en el cuadro 12, los niveles de oligonucleótido de longitud total en el hígado son comparables o reducidos para ISIS 372339 y ISIS 377130 en comparación con los ISIS 345198. Acoplados con la reducción blanco como se muestra en el cuadro 11, estos datos muestran que

la potencia mejorada de los compuestos de abertura-dilatada no se debe a la acumulación mejorada del compuesto en el hígado. Por lo tanto, los oligonucleótidos preferidos de la presente invención incluyen oligonucleótidos de abertura-dilatada que muestran una potencia mejorada o potencia comparable con respecto a la reducción blanco al gapmer 5-10-5 correspondiente sin la acumulación mejorada del compuesto en un tejido blanco. En algunas modalidades, el tejido blanco es adiposo y en algunas modalidades, el tejido blanco es hígado.

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

5 1.- Un oligonucleótido antisentido de 20 nucleobases de longitud
dirigido hacia una molécula de ácido nucléico que codifica GCCR y que
comprende al menos una porción de 8 nucleobases de SEQ ID NO: 34, 33,
35, 36, 37, 42, 45, 56, 61, 63, o 96, en donde el oligonucleótido comprende
una región deoxinucleótido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, o 18 nucleobases de
10 longitud la cual ésta flanqueada en sus extremos 5' y 3' con 1 a 42'-O-(2-
metoxietil) nucleótidos y en donde el oligonucleótido específicamente se
hibrida con y reduce la expresión de GCCR.

2.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la
reivindicación 1, caracterizado además porque el número de nucleótidos que
15 flanquean la región de deoxinucleótido en los extremos 5' y 3' es el mismo.

3.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la
reivindicación 1, caracterizado además porque el número de nucleótidos que
flanquean la región de deoxinucleótido en los extremos 5' y 3' no es el mismo.

4.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la
20 reivindicación 1, caracterizado además porque al menos un enlace
internucleósido es un enlace fosforotioato.

5.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

5 6.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque tiene la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 37.

7.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado además por una región de 16 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos.

10 8.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado además porque al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato.

9.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado además porque al menos una citosina es una 15 5-metilcitosina.

10.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado además por una región de 14 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con tres 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos.

11.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la 20 reivindicación 10, caracterizado además porque al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato.

12.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado además porque al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

13.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la
5 reivindicación 6, caracterizado además por una región de 12 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con cuatro 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos.

14.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado además porque al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato.

10 15.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado además porque al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

16.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado además por una región de 18 deoxinucleótidos
15 flanqueada en sus extremos 5' y 3' con un 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos.

17.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado además porque al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato.

18.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la
20 reivindicación 16, caracterizado además porque al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

19.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado además por una región de 17 deoxinucleótidos

flanqueada en sus extremos 5' y 3' con uno o dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos.

20.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado además porque al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato.

21.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado además porque al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

22.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque tiene la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 33.

23.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado además por una región de 16 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos.

24.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado además porque al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato.

25.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado además porque al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

26.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado además por una región de 14

deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con tres 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos.

27.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado además porque al menos un enlace
5 internucleósido es un enlace fosforotioato.

28.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado además porque al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

29.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la
10 reivindicación 22, caracterizado además por una región de 12 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con cuatro 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos.

30.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado además porque al menos un enlace
15 internucleósido es un enlace fosforotioato.

31.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado además porque al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

32.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la
20 reivindicación 22, caracterizado además por una región de 18 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con un 2'-O-(2-metoxietil) nucleótido.

33.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado además porque al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato.

34.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la
5 reivindicación 32, caracterizado además porque al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

35.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado además por una región de 17 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con uno o dos 2'-O-(2-
10 metoxietil) nucleótidos.

36.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado además porque al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato.

37.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la
15 reivindicación 35, caracterizado además porque al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

38.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque tiene la secuencia de nucleobases de SEQ ID NO: 45.

20 39.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado además por una región de 16 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos.

40.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 39, caracterizado además porque al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato.

41.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la
5 reivindicación 39, caracterizado además porque al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

42.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado además por una región de 14 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con tres 2'-O-(2-
10 metoxietil) nucleótidos.

43.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado además porque al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato.

44.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la
15 reivindicación 42, caracterizado además porque al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

45.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado además por una región de 12 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con cuatro 2'-O-(2-
20 metoxietil) nucleótidos.

46.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado además porque al menos un enlace internucleósido es un enlace fosforotioato.

47.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado además porque al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

48.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la
5 reivindicación 38, caracterizado además por una región de 18 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con un 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos.

49.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado además porque al menos un enlace
10 internucleósido es un enlace fosforotioato.

50.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado además porque al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

51.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la
15 reivindicación 38, caracterizado además por una región de 17 deoxinucleótidos flanqueada en sus extremos 5' y 3' con uno o dos 2'-O-(2-metoxietil) nucleótidos.

52.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado además porque al menos un enlace
20 internucleósido es un enlace fosforotioato.

53.- El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado además porque al menos una citosina es una 5-metilcitosina.

54.- Una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 1 y ocasionalmente un vehículo, diluyente, potenciador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 55.- Un método para reducir la expresión del receptor glucocorticoide en una célula o tejido que comprende poner en contacto a dicha célula o tejido con la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 54.

56.- El método de conformidad con la reivindicación 55,
10 caracterizado además porque el tejido es grasa o tejido hepático.

57.- Un método para tratar una enfermedad o condición mediada por la expresión de glucocorticoide en un animal que comprende poner en contacto a dicho animal con una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 54.

15 58.- El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado además porque la enfermedad o condición es diabetes, obesidad, síndrome metabólico X, hiperglucemia, o hiperlipidemia.

59.- El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado además porque la enfermedad es diabetes Tipo 2.

20 60.- El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado además porque la enfermedad es hiperlipidemia asociada con colesterol elevado en sangre o niveles elevados de triglicéridos en sangre.

61.- El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado además porque la condición es esteatosis hepática.

62.- El método de conformidad con la reivindicación 61, caracterizado además porque la esteatosis es esteatohepatitis.

5 63.- El método de conformidad con la reivindicación 61, caracterizado además porque la esteatosis es esteatohepatitis no alcohólica.

64.- Un método para disminuir los niveles de glucosa en sangre en un animal que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de conformidad con
10 la reivindicación 54.

65.- El método de conformidad con la reivindicación 64, caracterizado además porque el animal es un humano.

66.- El método de conformidad con la reivindicación 64, caracterizado además porque los niveles de glucosa en sangre son niveles de
15 glucosa en sangre en ayuno.

67.- Un método para disminuir los niveles de lípidos en sangre en un animal que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 54.

20 68.- El método de conformidad con la reivindicación 67, caracterizado además porque los niveles de lípidos en sangre son niveles de colesterol en sangre.

69.- El método de conformidad con la reivindicación 67, caracterizado además porque los niveles de lípidos en sangre son niveles de triglicéridos en sangre.

5 70.- Un método para disminuir los niveles de triglicéridos en el hígado en un animal que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 54.

71.- Un método para reducir la masa grasa corporal en un animal que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 54.

72.- Un método para reducir la sensibilidad mejorada a la insulina en un animal que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 54.

73.- Un método para inhibir la salida de glucosa hepática en un animal que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 54.

20 74.- Un método para retrasar o prevenir el inicio de un incremento en los niveles de lípidos en sangre o de glucosa en sangre en un animal que comprende administrar a dicho animal una cantidad

terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 54.

75.- Un método para tratar a un animal que tiene una enfermedad metabólica o condición que comprende administrar a dicho
5 animal un compuesto de conformidad con la reivindicación 1 en combinación con un agente antidiabético seleccionado a partir del grupo que comprende agonistas PPAR incluyendo agonistas PPAR-gamma, dual-PPAR o pan-PPAR, inhibidores de la dipeptidil peptidasa (IV), análogos de GLP-1, insulina y análogos de insulina, secretagogos de insulina, inhibidores de SGLT2,
10 análogos de la amilina de humano incluyendo pramlintida, activadores de la glucocinasa, biguanidas e inhibidores de la alfa-glucosidasa para lograr un efecto terapéutico aditivo.

listado de secuencia

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc.
Monia, Brett P.
McKay, Robert
Freier, Susan M.
Bhanot, Sanjay
Watts, Lynnetta

<120> modulación de la expresión del receptor de glucagon

<130> BIOL0065W0

<150> 60/718,685

<151> 2005-09-19

<160> 114

<170> FastSEQ para Windows version

<210> 1

<211> 4788

<212> ADN

<213> H. sapiens

<400> 1

```

tttttagaaa aaaaaaatat atttccctcc tgctccttct gcggtcacaa gctaagttgt 60
ttatctcggc tgccggcgga actgcgagac gtggcgggcg agcggtcctc ctgccagagt 120
tgatattcac tgatggactc canagaatca ttaactcctg gttagagaaga aaaccccagc 180
agtgtgcttg ctccaggagag gggagatgtg atggacttct ataaaaccct aagaggagga 240
gctagcttga aggtttctgc gtcttcaccc tcactggctg tctgttctca atcagactcc 300
aagcagcgaa gacttttggc tgattttcca aaaggctcag taagcaatgc gcagcagcca 360
gatctgtcca aagcagtttc actctcaatg ggactgtata tgggagagac agaaacaaaa 420
gtgatgggaa atgacctggg attccacacag caggggccaaa tcagcctttc ctccggggaa 480
acagacttaa agcttttggg agaaagcatt gcaaacctca ataggtcgac cagtgttcca 540
gagaaaccca agagtctcag atccactgct gtgtctgctg ccccaacaga gaaggagtct 600
ccaaaaactc actctgatgt atcttcagaa cagcaacatt tgaagggcca gactggcacc 660
aacggtggca atgtgnaatt gtataccaca gaccaaagca cctttgacat ttgcaggat 720
ttggagtttt ctctctgggc cccaggtaaa gagacgaatg agagtctctg gagatcagac 780
ctgttgatag atgaanaact tttgctttct cctctggcgg gagaagacga ttcatctctt 840
ttggaaggaa actcgaatga ggactgcaag cctctcattt taccggacac taaacccaaa 900
attaaggata atggagatct ggttttgtca agccccagta atgtaacact gccccaaagt 960
aanaacagaa aagaagattt catcgaactc tgcacccctg gggtaattaa gcaagagaaa 1020
ctggggcaca tttactgtca ggcaagcttt cctggagcaa atataattgg taataaaaatg 1080
tcrgccattt ctgttctatg tgcagatacc tctggaggac agatgtacca ctatgacatg 1140
aatacagcat ccttttctca acagcaggat cagaagccta tttttaatgt cattccacca 1200
attcccggtg gttccgaaaa ttggaatagg tgccaaggat ctggagatga caacttgact 1260
ctgttgaggg ctctgaactt cctgggtcga acagtttttt ctaatggcta ttcaagcccc 1320
agcatgagac cagatgtaag ctctctccca tccagctcct caacagcaac aacaggacca 1380
cctcccaaac tctgctgggt gtgtctgat gaagcttcag gatgtcatta tggagtctta 1440
acttgtgaa gctgtaaatg tttcttcaaa agagcagtg agggacagca caattaccta 1500
tgtgttgaa ggaatgattg catcatcgat aaaaattcgaa gaaaaaactg cccagcatgc 1560
cgctatcgaa aatgtcttca ggctggaatg aacctggaag ctcgaaaaac aaagaaaaaa 1620
ataaaaggaa ttcagcaggc cactacagga gtctcacaag aaacctctga aaatcctggt 1680
aacaanaaaa tagttcttgc aacgttacca caactcacc ctacctgggt gtcactgttg 1740
gaggtttatt aacctgaagt gttatatgca ggatatgata gctctgttcc agactcaact 1800
tggaggatca tgactacgct caacatgtta ggaggggcg aagtgtatgc agcagtgaag 1860
tgggcaaaag caataccagg ttccaggaac ttacacctgg atgaccaa atgacctactg 1920
cagtaactct ggatgtttct tatggcattt gctctggggt ggagatcata tagacaatca 1980
agtgcanaac tgctgtgttt tgctcctgat ctgattatta atgagcagag aatgactcta 2040
cctgtcatgt acyaccaatg taaacacatg ctgtatgttt cctctgagtt acacaggctt 2100
caggtatctt atgaagagta tctctgtatg aaaaccttuc tgcttctctc ttcaagttct 2160
aaggacggtc tgaagagcca agagctatct gatgaattha gaatgacct catcaagag 2220
ctaggaaaag ccattgtcaa gagggaaagg aactccagcc agaactggca gcggttttat 2280
canctgacaa aactcttggg ttctatgcat gaagtgggtg aaaaatctct taactattgc 2340
ttccaaacat ttttgataa gacctgagt attgaattcc ccgagatgtt agctgaaatc 2400
ttcaaccaat agataccaaa atattcaaat ggaaatatca aaaaacttct gtttcatcaa 2460
aagtgtactg cttaataaga atggttgctt taaagaaagt cgaatttaata gcttttattg 2520
cataaactat cagtttgtcc tgtagaggct ttgtgttttt attttttatt gttttcatct 2580

```

BIOL0065W0

gttgttttgt ttttaatacgc cactacatgt ggtttataga gggccaagac ttggcaacag 2640
aagcagttga gtgtcatca cttttcagtg atgggagagt agatgggtga atttattagt 2700
taatacatcc cagaaattag aaaccttaac atgtggacgt aatctccaca gtcaagaag 2760
gatggccact aaaccaccag tgcccaaggt ctgtgtgtg aactttctct tcatactttt 2820
tttcacagtt ggctggatga aattttctag actttctgtt ggtgtatccc cccctgtat 2880
agttaggata gcatttttga tttatgcatt gaaacctgaa aaaaagttaa caagtgtata 2940
tcagaaagg gaagtgtgtc cttttatagc tattactgtc tggttttaac aatttccttt 3000
atatattagt aactacgctt gctcattttt tcttacataa ttttttatte aagtattgt 3060
acagctgttt aagatgggca gctagtctgt agctttccca aataaactct aaactttaat 3120
caatcatctg tgtgaaatg ggttgggtgt tctaacctga tggcacttag ctatcagaag 3180
accacaaaaa tgcactcaaa tctccagtat tcttgcataa aaaaaaaa aaaaagctca 3240
tattttgtat atactgtctt cagtggagaa ttatataggt tgtgcaaat aacagtccta 3300
actgggtatg agcacctagt ccagtgcctt gctgggtaaa ctgtggatga tggttgcaaa 3360
agactaattt aaaaaataac taccagagg cctgtctgt acctaagcc ctatttttgc 3420
aatggctata tggcaagaaa gctggtaaac tatttgcctt tcaggacctt ttgaagtagt 3480
ttgtataact tcttaaaagt tgtgattcca gataaccagc tgytaacacag ctgagagact 3540
tcttaacaga caaagtaatt cctctcacta aactttacc aaaaactaaa tctctaata 3600
ggcaaaaatg gctagacacc cattttcaca tctccatctg tacccaattg gttaatcttt 3660
cctgatggta caggaaagct cagctactga tttttgtgat ttagaactgt atgtcagaca 3720
tccatgtttg taataactaca catccctaac gtgtgccata gagtttaaca caagtcctgt 3780
gaatttcttc actgttgaaa attattttta acaaaataga agctgtagta gccctttctg 3840
tgtgcacctt accaacttct tgtaaactca aaacttaaca tatttactaa gccacaagaa 3900
atattgttct tattcaaggt ggccnaatta tttgtgtaat agaaaactga aaatctaata 3960
ttaaaaatat ggaacttcta atattttttt atattttagt atagttctag atatatatca 4020
tattgttatt cactaatctg ggaagggaag ggctactgca gctttacatg caatttatra 4080
aatgtattgt aaatagctt gtatagtgtt aaataagaat gatttttaga tgagattgtt 4140
ttatcatgac atgttatata tttttgttag gggccaaga aatgtctatg gataacctat 4200
atgatttata gtttgatcat aggtcagcat ggtctcagaa accaaacagt 4260
ttgtcttagg ggaagaggga gatggagact ggtcctgtgt gcagtgaagg ttgctgaggc 4320
tctgaccag tgagattaca gaggaagtta tctcttgcct cccattctga ccacctctt 4380
cattccaaca gtgagctgtt cagcgcaggt ttagtttact caatctcccc ttgcaactaa 4440
gtatgttaag .tatgttaaca ggagacagga aggtgtgtgt taccatctta aaggcaccat 4500
ctaataaggg gttactttca catacagccc tccccagca gttgaatgac aacagaagct 4560
tcagaagttt ggcaatagtt tgcataagag taccagcaat atgtaatag tgcagaatct 4620
cataggttgc caataatata ctaattcctt tctatctac aacaagagtt tatttccaaa 4680
taaaatgagg acatgttttt gttttctttg aatgtctttt gaatgttatt tgttattttc 4740
agtattttgtt agaaattatt taataaaaaa acaatcattt gcttttttg 4788

<210> 2
<211> 6322
<212> ADN
<213> R. norvegicus

<220>
<221> characteristic misc
<222> 24, 3663, 3680, 3684, 3685, 3791, 3805, 3806, 3813, 3854,
3861, 4162, 4177, 4205, 4206, 4240, 4246, 4247, 4262, 4283,
4284, 4293, 4295, 4311, 4354, 4358, 4359, 4360, 4398, 6010,
6011, 6013, 6014, 6065, 6069, 6145, 6161
<223> n = A,T,C or G

<400> 2
gacgctgcgg ggggtgggga cctnccggcg cagggagtc ccccccgggc tcacattaat 60
atttgcacat ggactccaaa gaactccttag ctccccctgg tagagacgaa gtccctggca 120
gtttgcttgg ccaagggagg gggagcgtaa tggactttta taaaagcctg aggggaggag 180
ctacagtcac gttttctgca tcttcgccct cagtggctgc tgcctctcag gcagattcca 240
agcagcagag gatttctctt gatcttctga aaggctccac aagcaatgtg cagcagcgac 300
agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagc gcagcagcag cagcagcuag 360
gcttatccaa agccgtttca ctgtccatgg ggctgtatat gggagagaca gaaacaaaag 420
tgatgggaaa tgacttgggc taccacacagc agggcnaact tggcctttcc tctgggaaa 480
cagactttcy gcttctggaa gaaagcattt caaacctcaa taggtcgacc agcgttccag 540
agaaacccaa gagttcaacg tctgcaactg ggtgtgctac ccgacagag aaggagtttc 600
ccaaaactca ctccgatgca tcttcagaa agcaaaatcg aaaaagccag accggcacca 660
acggaggtay tgtgaaattg tatccacagc accaaagcac ctttgacctc ttgaaggatt 720
tggagttttc cgttgggtcc ccaagtaaa acacaaacga gactccctgg agatcagatc 780
tgttgataga tgaaaaactt ctttctctct tggcgggaga agatgatcca ttccttctcg 840
aagggaaacac gaatgaggat tgaagcctc ttattttacc ggacactaaa cctaaaatta 900
aggatctcgg agatacaatc ttatcaagtc ccagcagtggt ggcaactacc caagtgaaaa 960
cagaaaaaga tgaattcatt gaactttgca ccccccgggt aattaagcaa gagaactgg 1020
gccacgttta ttgtcaggca agcttttctg ggacaaatat aattggtaat aaaatgtctg 1080

BIOL0065W0

ccattttctgt	tcattggtgtg	agtagctctg	gaggacagat	gtaccactat	gacatgaata	1140
cagcatccct	ttctcagcag	caggatcaga	agcctgtttt	taatgtcatt	ccaccaatc	1200
ctgttgggtt	tgaaactggt	aataggtggt	aagggtccgg	agaggacagc	ctgacttcct	1260
tggggggtct	gaacttccca	ggccgggtcag	tggttttctaa	tgggtactca	agccttgga	1320
tgagaccaga	tgtaagctct	cctccatcca	gctcgtcagc	agccacggga	ccacctccca	1380
agctctgctt	ggtgtgctcc	gatgaagctt	caggatgtca	ttacggggtg	ctgacatgtg	1440
gaagctgcaa	agtabtcttt	aaaagagcag	tggaaggaca	gcacaattac	ctttgtgctg	1500
gaagaaacga	ttgcacatct	gataaaattc	gaaggaaaaa	ctgccagaca	tgccgtctac	1560
ggaaatgtct	tcaggctgga	atgaaccttg	aagctcgaaa	aacaaagaaa	aaaatcaaa	1620
ggattcagca	agccactyca	ggagtctcac	aagacacttc	ggaaaatcct	aacaaaacaa	1680
tagttccctg	agcattacca	cagctcacc	ctaccttggt	gtcactgctg	gaggtgattg	1740
aaccggaggt	gttgtatgca	ggatatgata	gctctgttcc	agattcagca	tggagaatta	1800
tgaccacac	caacatgtta	gggtggcgct	aagtgtattg	agcagtga	tgggcaagg	1860
cgatactagg	cttgagaaac	ttacacctcg	atgaccaa	gacctgtcta	cagtactcat	1920
ggatgtttct	catggcattt	gccttggtt	ggagatcata	cagacaatca	agcggaaacc	1980
tgctctgctt	tgctcctgat	ctgattatta	atgagcagag	aatgtctcta	ccctgcatgt	2040
atgaccaatg	ttaaccacatg	ctgtttgtct	cctctgaatt	acaaagattg	caggtatcct	2100
atgagagata	tctctgtatg	aaaaccttac	tgcttctctc	ctcagttcct	aagggaaggc	2160
tgaagagcca	agagtatttt	gatgagattc	gaatgactta	tatcaaaag	ctaggaaag	2220
ccatgttcaa	aagggaagg	aactccagtc	agaactggca	acgggtttac	caactgacaa	2280
agcttctgga	ctccatgcat	gaggtgggtg	agaatctcct	tacctactgc	ttccagacat	2340
ttttggataa	gaccatgagt	attgaattcc	cagagatgtt	agctgaatc	atcactaatc	2400
agataccaaa	atattcaaat	ggaaatata	aaaagcttct	gtttcatcaa	aatgactgca	2460
ctttactaga	aaggttgctt	ttaagaaagt	tgaatttata	gcttttactg	tacaaactta	2520
tcaattttgt	ttgttagatg	ttttgtgtt	ttttgtttt	tgcttctgtt	tgtttttaac	2580
acgcagta	tggtgtttat	agggggccaa	gacttggcga	cagaagcagt	tgagtcaaca	2640
ctctgaagtg	atgacacagc	acacagtgaa	gtgtattgtt	ggtgtatcac	agaaactaac	2700
agttacgtgg	agggatggcc	actgtcagag	agggaccgca	cctaaaccac	cggtcccaag	2760
tccatgtggt	tcaactttct	gactcagaac	tttacagttg	gctgggtana	actttctaga	2820
ctttctgctg	gtgtattttt	cccattgata	gttgggatgg	tattttgatt	tatgcatgca	2880
auctgaaaa	aagtttacaa	gtgtatatca	gaaaagggaa	gttgtgctt	ttatagcpat	2940
tagttgtctg	tttttaaca	ttcctttata	ttcagtgaa	tatgtctgct	cgtttctctt	3000
caataatttt	tgatttccag	ttattgtaca	gctgtttaag	atgggcagct	gcttcacagc	3060
tttcttagac	gctaaccatta	atttccgtgt	gaaaatgggt	cggtgcttct	acctgttgg	3120
caccagctat	cagaagacca	cagaaattga	ctcagatctc	cagtattctt	gttaaaaagc	3180
tcttactctg	tatattatctg	cttccatgga	gaattacata	ggctgagcag	attacatagg	3240
ctgagcagat	taaccgtcct	aactgggtga	gagcacctag	tccagtga	ttctgggtaa	3300
accgtggatg	atgggtacag	aagactgggtg	ggaaaacagt	aactaccaaa	agggcccttt	3360
ccatctaagt	caccatctct	tcaatgggga	gatagcaacc	aagcccgtaa	atcagctctt	3420
tcaggacctt	ctggagtggg	ttgcataaca	ctttaaaatg	tattattcca	gatagccagc	3480
tctgataaag	ccgagagatt	gtttaatcag	accaagtaac	ttctctcatt	aaacttacc	3540
ccaactaaat	cgctaataca	gcaagaatgg	ctagacaccc	attttcacat	ctcaccgca	3600
ccgattgggt	tagctctcat	ggtgttcagg	agaatcagct	actgattttt	gttacttaga	3660
atntrcagga	ctcgcatttn	tcnnctaca	catccctaca	tggtccatag	aatttaacac	3720
aagtcctgtg	aacttcttca	catgtagaat	tatcatttta	aacaaacag	aagcagtagt	3780
agccctttct	ntgtgcacct	taccncttt	ctntgactca	aagcttaata	tgcttactaa	3840
gccacaagaa	atcngatctt	nactttaagg	cgccaaatta	ttgtgttaat	agaaaaactg	3900
aaaatctaat	attaaaaata	tgaaacttct	aatatatatt	tatatattag	tatagtttctg	3960
atatatatca	taccgtgatt	cactgatctt	gggaaaggga	aagggtact	gcagctttac	4020
atgcaattta	ttacttgact	gtaaaatagc	tgatatagta	taagaatgac	tttttagtgag	4080
attgtcttat	catgacatgt	tatatatttt	tctgtagggt	caaagaaata	ttgatggata	4140
tgatagccta	tatgatttaa	tngtatataa	aagcatncaa	acaggcctta	acoggtcttg	4200
gaaannaaaa	tacctttgtt	ctaagctagg	gaaggagc	ggagannggc	cccggtgtga	4260
tnggaggttc	cgaggctcgg	atnnaagaga	tcnanagggg	atctaattcc	ntacctccat	4320
ctaattacct	caccacccat	gatcctgtca	gtgnaggnnn	ggttattaaa	tccccggtta	4380
tactaatata	aatagganag	aagggtggcg	ctcacgtctg	ttocaggcgc	cgcagtagca	4440
gggttatttt	ccatgcagcc	tcccagaca	gttagcagag	ggaggctttg	gcaagtttgg	4500
cgtggcggtc	atagaggcac	cugcaacatg	taaacctaaa	gagcccatag	gaagccaaga	4560
atacactaat	cctccccacc	cttcaatagt	ccatttccaa	gtaagatgag	gacatgctta	4620
tggtttcttt	gaatgctttt	agaatgttgt	tattttcagt	attttgcaga	aattatttaa	4680
taaaaaagta	taatttgaat	tctctctaaa	agggatttgt	cagtttgtta	tggttcaaat	4740
tggtctcaaa	gtactttaag	ataattgtta	cccagctgga	tgtaaaattt	atgggtgcta	4800
agaaatacca	cttgaatatt	atcuagacag	tggttaagtt	taaaatgagc	ttctcaaaaa	4860
tagatttatg	tacatttatg	gaatgttata	tggttaaac	caaaaaagca	catcacacat	4920
aaatctgtgt	tcagcttggc	tttcaaaat	agagctccaa	aaacgaaaaa	ggagaagaaa	4980
aagtatatat	atgctgttgt	atlaacagaa	ggcaacagac	attcataaaa	ctactaccga	5040
agcttccctt	gaagcgtata	aagagccatg	ctcctttagt	atgtggggaa	gaagagagcc	5100
gtcatagtgt	cgagtacaga	gagaagatgc	ggtagctgtc	ccgtgtgtgt	cttcataccg	5160
ttcctaacta	tttaggttta	taataacttc	agtgagactc	ggtagacatg	ctgtatgact	5220
catyaccgat	cttgaagat	atcttttaatt	actggttagga	caaaagggac	actctggtta	5280

BIOL0065NO

ttttaggcct tggccttggga tactgtatat ccagaagaaa ggagacagga aacttgggga 5340
aggggaaggga acctaggaag cactgccttc tgtaggaaaag aacacacca taagttagag 5400
taccacaagg gacaaggcca cccagtggtg ggtotaagga tgagtcaggg tgagctctgg 5460
tgggcatgga gaagccagca actccagtg cccagtggtg tacagagcag ggcagggcag ggatgggaca 5520
agatggatgc ggatcccagt cccagtagtt tgctccctct tatttaccat gggatgaacc 5580
atggagatatt gatctgtcag cactcaagga tcatggagct tgagattccg gttgggtcacc 5640
ccaacggtaa gctgagattg aatgtgtttc ttatgtgccc gtttcagttg tagaaggcga 5700
aacagatgtt acagaagaca ctgcaaaccc gtcagatgaa agtcttctca tccccaaact 5760
atcttcagtc agcctgctct atcaggactg gtgaccagct gctaggacag ggtcggcgct 5820
tctgtctaga atatgcctga aaggatttta ttttctgata aatggctgta tgaaaaatacc 5880
ctctctcaata acctgcttaa ctacatagag atttcagttg gtcaatattc tattttgtat 5940
attaaacaaa ggctatata tctatactat actgtgtatg gcattattaa 6000
gaagctcttn nannattttt tatcacagta atttttaaat gtgtaaaaaa ttaaaaatta 6060
gtgantccng tttaaaaata aaagtgttag ttttttatcc atgctgaata acctgtagtt 6120
taaaaatccg tctttctacc tacanagtga aatgtcagac ngtaaaaatt tgtgtggaaa 6180
tgttttaact ttatttttct ttaaatgtgc tgtcttggta ttaccaaac acacattgta 6240
ctgaattggc agtaaatgtt agtcagccat ttacagcaat gccaaatag gataaacatc 6300
ataataaaat atctgctttt tc 6322

<210> 3

<211> 2575

<212> ADN

<213> M. musculus

<400> 3

sgaagttaat atttgccaat ggactccaaa gaatcccttag ctccccctgg tagagacgaa 60
gtccccagca gtttgccttg ccgggggagg ggaagcgtga tggacttgta taaaaccctg 120
aggggtggag ctacagtcac ggtttctgcg tcttcaccct cagtggtgctg tgcctctcag 180
gcagattcca agcagcagag gattctcctt gatttttcaa aaggctcagc aaggaatgca 240
cagcagcagc agcagcagca gcagccgcag ccagatttat ccaagccgt ttcactgtcc 300
atgggactgt atatgggaga gaccgaaaca aaagtgtatg ggaatgactt gggctaccca 360
cagcagggcc agcttggcct ctctctctgg gaaacagact ttcggctctc ggaagaaagc 420
attgcaaac tcaataggtc gaccagccgt ccagagaatc ccaagagtto aucacctgca 480
gctgggtgtg ctaccccgac agagaaggag tttccccaga ctactctga tccatcttca 540
gaccagcaaa atagaaaaag ccagcctggc accaacgggt gcagtgtgaa attgtatacc 600
acagaccnaa gcacctttga catcttgca gatttggagt tttctgcgg gtccccaggt 660
aaagagcaaa acgagagtc tgggaggtca gactgttga tagatgaaa ctgtcttct 720
cctttggcgg gagaagatga tccattcctt ctggaagggg acgtgaatga ggattgcaag 780
cctcttattt taccggacac taaacctaaa attcaggata ctggagatc aatcttatca 840
agccccagca gtgtggcact gcccgaagt aaaaacagaga aagatgatt catgagctt 900
tgaccctctg ggttaattaa gcAagagaaa ctgggcccgg ttatttgcca ggcaagctt 960
tctgggacaa atataattgg gaataaaatg tctgccatt ctgttcattg cgtgagtacc 1020
tctggagac agatgtacca ctatgacatg aatacagcat cctttctca gcagcaggat 1080
cagaagcctg tttttaaagt catccacca attoctgtg gttctgaaa ctggaatagg 1140
tgcaagggt ctggagagga caacctgact tcttggggg ctatgaactt cgagggccc 1200
tcagtgttt ctatgggata tcaagccct ggaatgagac cagatgtgag ttctcctccg 1260
tccagctct ccacagcaac gggaccacct cccaaactct gcctgggtg ctccgatgaa 1320
gcttcgtat gccatattg ggtgtgagc tgtggaagct gtaagtctt ctttaaaaga 1380
gcagtggaa gacagcaca ttacctttgt gctggangaa atgattgcat cattgataa 1440
attcgaagaa naaactgtcc agcatgccgc tatcgaaaat gtcttcaagc tggaaatgaa 1500
ctggaagctc gaaaaacgaa gaaaaaaat aaaggaatc agcaagccac tgcaggagtc 1560
tcacaagaca cttctgaaaa cgctaacaaa acaatagttc ctgccgcgt gccacagctt 1620
acccctaccc tgggtgact gctggagggt atcgagcctg aggtgttata tgcaggatat 1680
gacagctctg ttccagactc agcatggaga attatgacca cgctcaacat gttagggtgg 1740
cgccaagtga ttgccgagc gaaatgggca aaggcgatac caggattcag aaacttacac 1800
ctggatgacc aaatgacct tctacagtac tcatggatgt ttctcatggc atttggcctg 1860
ggttggagat catacagaca agcaagtgg aacctgtat gctttgctcc tgatctgatt 1920
attaatgagc agagaatgac tctacctgc atgtatgacc aatgtaaca catgctgtt 1980
atctccactg aattacaaag attgcaggta tccatgaag agtatctctg tatgaaaacc 2040
ttactgctc tctcctcagt tcttaaggaa ggtcrgaaga gccaaagatt attttagtag 2100
attcgaatga cttatatcaa agagctagga aaagccattg tcaaaaggga aggaaactcc 2160
agtcagaatt ggcagcgggt ttatcaactg acaaaacttt tggactccat gcattgatgt 2220
gttgaaaatc tcttagcta ctgcttcaa acatttttgg ataagtcct gagtattgaa 2280
ttcccagaga tgttagctga aatcatcact aatcagatc caaaatactc aatgggaaat 2340
atcaaaaagc tctggttcca tcagaaatga ctgcttact aagaaaggct gccttaaga 2400
aagttgaatt tatagctttt actgtacnaa cttatcaact tgtctttag atgttttctc 2460
gttctttttg tttgtcttgt ttgtrttcta tacgcactac atgtggctc tagagggcca 2520
agacttggca acugaagcag atgagccatc acttttcagt gacaggaaag cagac 2575

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

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 4
cgtgtgtctg tgctagtcctc 20

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 5
ggcaacgtga acaggtccaa 20

<210> 6
<211> 18
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 6
gcccattgct ggacatgc 18

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 7
agcccattgc tggacatgca 20

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 8
ttgtcccagt cccaggcctc 20

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 9
ctttccgttg gacccttggg 20

<210> 10
<211> 20
<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 10

gtggcgccga gcccgaaatc

20

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 11

atccaagtgc tactgtagta

20

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<220>

<221> característica misc

<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20

<223> n. = A,T,C-or-G

<400> 12

nnnnnnnnnn nnnnnnnnn

20

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 13

gccctccatg ctggcacagg

20

<210> 14

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 14

agcaaaagat caatccgtta

20

<210> 15

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 15

tacagaaggc tgggcattga

20

<210> 16

<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 16
atgcattctg cccccaagga 20

<210> 17
<211> 22
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> iniciador de PCR

<400> 17
ttgacatttt gcaggatttg ga 22

<210> 18
<211> 24
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> iniciador de PCR

<400> 18
ccaaggactc tcattcgtct cttt 24

<210> 19
<211> 16
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> sonda de PCR

<400> 19
ttttctctgg gtcccc 16

<210> 20
<211> 25
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> iniciador de PCR

<400> 20
aaacaatagt tctgcagca ttacc 25

<210> 21
<211> 23
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> iniciador de PCR

<400> 21
catacaacac ctgggttca atc 23

<210> 22
<211> 23
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> sonda de PCR

<400> 22
acccttaccr tgggtgtcact gct 23

<210> 23
<211> 23
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> iniciador de PCR

<400> 23
gacatcttgc aggtatttga gtt 23

<210> 24
<211> 23
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> iniciador de PCR

<400> 24
aacaggtctg acctccaagg act 23

<210> 25
<211> 27
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> sonda de PCR

<400> 25
cgggtcccca ggtaaagaga caaacga 27

<210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 26
tctgtctctc ccatatacag 20

<210> 27
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 27
tgattctgtc tctcccatat 20

<210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 28

cttttgtttc tgtctctccc

20

<210> 29

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 29

atcacttttg tttctgtctc

20

<210> 30

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 30

gtttgcaatg cttctctcca

20

<210> 31

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 31

tgagggttgc aatgtttct

20

<210> 32

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 32

ctattgaggt ttgcaatgct

20

<210> 33

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 33

cgacctattg aggtttgcaa

20

<210> 34

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 34

ctggtcgacc tattgaggtt

20

<210> 35

<211> 20

<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 35
ctgtggtata caatttcaca

20

<210> 36
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 36
ctttggtctg tggatatacaa

20

<210> 37
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 37
gtcaaagggtg ctttgggtctg

20

<210> 38
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 38
ggtttagtgt ccggtaaaat

20

<210> 39
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 39
ctttttctgt tttcacttgg

20

<210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 40
ttctcttget taattacccc

20

<210> 41
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 41

cagtttctct tgcttaatta

20

<210> 42

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 42

gccacagtttc tcttgcttaa

20

<210> 43

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 43

tttattacca atttatatttg

20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 44

acattttatt accaattata

20

<210> 45

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 45

gcagacattt tattaccaat

20

<210> 46

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 46

aatggcagac attttattac

20

<210> 47

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 47

cagaaatggc agacatttta

20

<210> 48
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 48
tgaacagaaa tggcagacat

20

<210> 49
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 49
ccatgaacag aaatggcaga

20

<210> 50
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 50
cacacccatga acagaaatgg

20

<210> 51
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 51
tactcacacc atgaacagaa

20

<210> 52
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 52
gagggtactca caccatgaac

20

<210> 53
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 53
cccagaggta ctcacaccat

20

<210> 54
<211> 20
<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 54

gtctctcaga ggtactcaca

20

<210> 55

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 55

atctgtctctc cagaggtact

20

<210> 56

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 56

gtacatctgt cctccagagg

20

<210> 57

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 57

agtggtagat ctgtctctca

20

<210> 58

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 58

tcatagtgt acatctgtcc

20

<210> 59

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 59

catgtcatag tggtagatct

20

<210> 60

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 60
tattcatgta atagtggtag 20

<210> 61
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 61
gctgtattca tgtcatagt 20

<210> 62
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 62
ggatgctgta ttcattgcat 20

<210> 63
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 63
aaagggaatgc tgtattcatg 20

<210> 64
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 64
tgagaaagg atgctgtatt 20

<210> 55
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 65
tggtggaatg acattaaaaa 20

<210> 66
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 66
gaattggtgg aatgacatta 20

<210> 67
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 67
gagcttacat ctggtctcat 20

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

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 68
aggagagctt acatctggtc 20

<210> 69
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 69
atggaggaga gcttacatct 20

<210> 70
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 70
ctggatggag gagagcttac 20

<210> 71
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 71
gagctggatg gaggagagct 20

<210> 72
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 72
tgtctctcca ctgctctttt 20

<210> 73
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 73

gtgctgtcct tccactgctc

20

<210> 74

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 74

aattgtgctg tccctccact

20

<210> 75

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 75

aggtaactgt gctgtccttc

20

<210> 76

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 76

cggcatgctg ggcagttttt

20

<210> 77

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 77

atagcggcat gctgggcagt

20

<210> 78

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 78

cgatagcggc atgctgggca

20

<210> 79

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 79
attccagcct gaagacattt 20

<210> 80
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 80
gttcattcca gcctgaagac 20

<210> 81
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 81
ttctttgttt ttcgagcttc 20

<210> 82
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 82
ttttttcttt gtctttcgag 20

<210> 83
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 83
caggaactat tgttttgyta 20

<210> 84
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 84
tgcaggaaact attgttttgt 20

<210> 85
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 85
gagctatcat atcctgcata 20

<210> 86

<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 86
aacagagcta tcataccctg

20

<210> 87
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 87
ctgggaacaga gctatcatat

20

<210> 88
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 88
ttcactgctg caatcacttg

20

<210> 89
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 89
ccatttcact gctgcaatca

20

<210> 90
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 90
ctgcccattt cactgctgca

20

<210> 91
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 91
ataatcagat caggagcaaa

20

<210> 92
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 92
attaataatc agatcaggag 20

<210> 93
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 93
gttcattaat aatcagatca 20

<210> 94
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 94
ctctgtctcat taataatcag 20

<210> 95
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 95
cattctctgc tcattaataa 20

<210> 96
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 96
agcatgtggt tacattgggc 20

<210> 97
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 97
aagggttttca tacagagata 20

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

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 98

cagtaagggtt ttcatacaga

20

<210> 99

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 99

gaagcagtaa ggttttcata

20

<210> 100

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 100

gagagaugca gtaagggtttt

20

<210> 101

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 101

gcttttcccta gctctttgat

20

<210> 102

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 102

atgggttttct ctagctctttt

20

<210> 103

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 103

atgggtcttat ccaaaaaatgt

20

<210> 104

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 104

actcatgggc ttatccaaaa

20

<210> 105

<211> 20

<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 105
caatactcat ggtcttatcc 20

<210> 106
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 106
aattcaatac tcatggtctt 20

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

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 107
atgatttcag ctaacatctc 20

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

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 108
gtgatgattt cagctaacat 20

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

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 109
gaatattttg gtatctgatt 20

<210> 110
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> compuesto oligomérico

<400> 110
atttgaatat ttgtgtatct 20

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

<223>

<223> compuesto oligomérico

<400> 111

ttccatttga atattttggt

20

<210> 112

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 112

atattttccat ttgaatattt

20

<210> 113

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 113

tttttgatat ttccatttga

20

<210> 114

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> compuesto oligomérico

<400> 114

ccttccctga aggttctctc

20

PCT/US 06/36527

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

PCT/US 06/36527

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) BIOL0065WO

Box No. I TITLE OF INVENTION

MODULATION OF GLUCOCORTICOID RECEPTOR EXPRESSION

Box No. II APPLICANT

☐ This person is also inventor

Name and address: (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Isis Pharmaceuticals, Inc.,
1896 Rutherford Road
Carlsbad, CA 92008
USA

Telephone No.
760 931-9200Facsimile No.
760 603-3820

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant
for the purposes of:☐ all designated
States☒ all designated States except
the United States of America☐ the United States
of America only☐ the States indicated in
the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

MONIA, Brett P.
2306 Casa Hermosa Court
Encinitas, CA 92024
USA

This person is:

☐ applicant only☒ applicant and inventor☐ inventor only (If this check-box is
marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant
for the purposes of:☐ all designated
States☐ all designated States except
the United States of America☒ the United States
of America only☐ the States indicated in
the Supplemental Box☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf
of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent☐ common
representative

Name and address: (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

ELMORE, Carolyn
Elmore Patent Law Group
209 Main Street
Chelmsford, MA 01863
USA

Telephone No.
978 251-3509Facsimile No.
978 251-3973

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office
35,567

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

MCKAY, Robert
12467 Golden Eye Lane
Poway, CA 92064
USA

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

FREIER, Susan M.
2946 Renault Street
San Diego, CA 92122
USA

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

BHANOT, Sanjay
8094 Paseo Arrayan
Carlsbad, CA 92009
USA

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

CA

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

WATTS, Lynnetta
7778 Calle Mejer
Carlsbad, CA 92009
USA

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Supplemental Box*If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.*

1. *If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:*
 - (i) *if more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;*
 - (ii) *if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;*
 - (iii) *if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;*
 - (iv) *if, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;*
 - (v) *if, in Box No. VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.*
2. *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in certain designated States, as an application for a patent of addition, certificate of addition, inventor's certificate of addition or utility certificate of addition: in such a case, write the name or two-letter code of each designated State concerned and the indication "patent of addition," "certificate of addition," "inventor's certificate of addition" or "utility certificate of addition," the number of the parent application or parent patent or other parent grant and the date of grant of the parent patent or other patent grant or the date of filing of the parent application (Rules 4.11(a)(iii) and 49bis.1(a) or (b)).*
3. *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in the United States of America, as a continuation or continuation-in-part of an earlier application: in such a case, write "United States of America" or "US" and the indication "continuation" or "continuation-in-part" and the number and the filing date of the parent application (Rules 4.11(a)(iv) and 49bis.1(d)).*

CONTINUATION OF BOX IV:

Carolyn Elmore, Reg No 35,567; Darlene Vanstone, Reg No 35,729; and Donna T. Ward, Ph.D., Reg No 48,271 of Elmore Patent Law Group, 209 Main Street, Chelmsford, Massachusetts 01863 and Herb Boswell, Reg No 27,311; Robert S. Andrews, Reg No 44,508; Jodi Connolly, Reg No 54,044; Melissa R. Leuenberger-Fisher, Ph.D., J.D., Reg No 47,747; Jason D. Ferrone, Reg No 52,887; Jeffrey E. Landes, Reg No 55,355; and Frances R. Putkey, Reg No 57,267 of Isis Pharmaceuticals, Inc., 1896 Rutherford Rd., Carlsbad, California 92008, USA.

Box No. V DESIGNATIONS

The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.

However,

- ☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection
- ☐ KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection
- ☐ RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection

(The check-boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of an earlier national application from which priority is claimed. See the Notes to Box No. V as to the consequences of such national law provisions in these and certain other States.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 19/09/2005	60/718,685	USA		
item (2)				
item (3)				

- ☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as:

- ☒ all items ☐ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ other, see Supplemental Box

* Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)).

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA / EP

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):

		Number of declarations
☐ Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor	:
☐ Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:
☐ Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:
☐ Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	:
☐ Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	:

Box No. IX CHECK LIST: LANGUAGE OF FILING

This international application contains:		This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item):		Number of items
(a) on paper, the following number of sheets:		1. ☒ fee calculation sheet		1
request (including declaration sheets)	5	2. ☐ original separate power of attorney		
description (excluding sequence listing and/or tables related thereto)	36	3. ☐ original general power of attorney		
claims	4	4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:		
abstract	1	5. ☐ statement explaining lack of signature		
drawings		6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):		
Sub-total number of sheets	46	7. ☐ translation of international application into (language):		
sequence listing	22	8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material		
tables related thereto		9. ☒ sequence listing in electronic form (indicate type and number of carriers) DISKETTE		
(for both, actual number of sheets if filed on paper, whether or not also filed in electronic form; see (c) below)		(i) ☒ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application):		1
Total number of sheets	68	(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter		
(b) ☐ only in electronic form (Section 801(a)(i))		(iii) ☒ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column		1
(i) ☐ sequence listing		10. ☐ tables in electronic form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)		
(ii) ☐ tables related thereto		(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)		
(c) ☐ also in electronic form (Section 801(a)(ii))		(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)		
(i) ☐ sequence listing		(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column		
(ii) ☐ tables related thereto		11. ☒ other (specify): Return Postcard; Certificate of Mailing		2
Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the		Figure of the drawings which should accompany the abstract:		
☐ sequence listing:		Language of filing of the international application: English		
☐ tables related thereto:				
(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)				

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).


 Melissa R. Leuenberger-Fisher, Ph.D., J.D. / 47,747

 9/19/06
 Date

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	IAP13 Rec'd PCT/PTO 19 SEP 2006	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
29 March 2007 (29.03.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/035759 A1

(51) International Patent Classification:

C12N 15/11 (2006.01) C07H 21/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

(74) Agents: ELMORE, Carolyn et al.; ELMORE PATENT
LAW GROUP, 209 Main Street, Chelmsford, MA 01863
(US).

(21) International Application Number:

PC1/US2006/036527

(22) International Filing Date:

19 September 2006 (19.09.2006)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60718,685 19 September 2005 (19.09.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): ISIS
PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 1896 Ruther-
ford Road, Carlsbad, CA 92008 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MONIA, Brett,
P. [US/US]; 2306 Casa Hermosa Court, Encinitas, CA
92024 (US). MCKAY, Robert [US/US]; 12467 Golden
Eye Lane, Poway, CA 92064 (US). FREIER, Susan,
M. [US/US]; 2946 Renault Street, San Diego, CA 92122
(US). BHANOT, Sanjay [CA/US]; 8094 Paseo Arroyan,
Carlsbad, CA 92009 (US). WATTS, Lynnetta [US/US];
7778 Calle Mejor, Carlsbad, CA 92009 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AI, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,
KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MODULATION OF GLUCOCORTICOID RECEPTOR EXPRESSION

(57) Abstract: Compounds, compositions and methods are provided for modulating the expression of glucocorticoid receptor. The compositions comprise antisense compounds, particularly antisense oligonucleotides which have particular in vivo properties, targeted to nucleic acids encoding glucocorticoid receptor. Methods of using these compounds for modulation of glucocorticoid receptor expression and for treatment of diseases are provided.

WO 2007/035759 A1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/036527

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/11 A61K31/7088 A61P3/00 C07H21/00
ADD. A61K38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

(Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used))

EPO-Internal, Sequence Search, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/099215 A2 (PHARMACIA CORP [US]; CROSBY SETH D [US]; NALSETH AMY E [US]) 4 December 2003 (2003-12-04) paragraphs [0001], [0029], [0036], [0046], [0189] page 61 - page 62 example 14 table 1 claim 8	1-75
Y	US 2005/164271 A1 (BHANOT SANJAY [US] ET AL) 28 July 2005 (2005-07-28) paragraphs [0002], [0010], [0086], [0095], [0099], [0170] - [0181], [0246] - [0256] examples 12,13,26 claim 14	1-75
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 December 2006

Date of mailing of the international search report

10/01/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.O. Box 18 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 spa nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Surdej, Patrick

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/036527

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/042030 A (AEGERA THERAPEUTICS INC [CA]; LACASSE ERIC [CA]; MCMANUS DANIEL [CA];) 12 May 2005 (2005-05-12) page 2 page 4, last paragraph - page 5, paragraph 1 claims 17-24	1-75
Y	WO 03/070888 A2 (RIBOZYME PHARMACEUTICALS INCOP [US]; MCSWIGGEN JAMES [US]; BEIGELMAN L) 28 August 2003 (2003-08-28) page 6 page 33 figure 10	1-75
Y	WO 03/070887 A2 (SIRNA THERPEUTICS INC [US]; MCSWIGGEN JAMES [US]; BEIGELMAN LEONID [US]) 28 August 2003 (2003-08-28) pages 6,26,32 figure 10	1-75

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/036527

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 55-75 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/036527

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03099215	A2	04-12-2003	AU 2003233634 A1	12-12-2003
			EP 1534728 A2	01-06-2005
			JP 2005525829 T	02-09-2005
US 2005164271	A1	28-07-2005	US 2006025373 A1	02-02-2006
WO 2005042030	A	12-05-2005	AU 2004284855 A1	12-05-2005
			BR PI0415779 A	26-12-2006
			CA 2542884 A1	12-05-2005
			EP 1691842 A1	23-08-2006
WO 03070888	A2	28-08-2003	AU 2003213057 A1	09-09-2003
			EP 1465910 A2	13-10-2004
WO 03070887	A2	28-08-2003	AU 2003213054 A1	09-09-2003
			EP 1472265 A2	03-11-2004

ASSIGNMENT

WHEREAS, Isis Pharmaceuticals, Inc. ("Assignor"), a Delaware Corporation, having a place of business at 1896 Rutherford Road, Carlsbad, California 92008 is the sole owner of all right, title and interest in and to certain patents and/or patent applications set forth in Exhibit A ("Patents"), which Exhibit A is attached hereto and hereby made a part hereof; and

WHEREAS, Ortho-McNeil, Inc. ("Assignee"), a New Jersey Corporation, having a place of business at 1000 US Route 202, Raritan, New Jersey 08869, is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to the Patent Rights (as defined below);

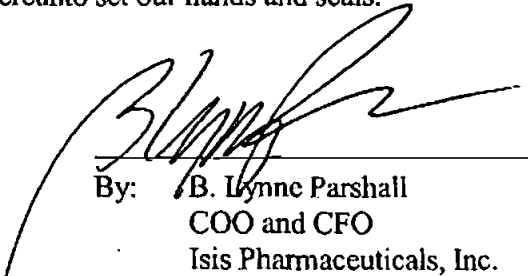
NOW, THEREFORE, BE IT KNOWN, that for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged said Assignor hereby assigns to said Assignee, its successors and assigns, the entire right, title and interest in and to the Patents in Exhibit A, hereto annexed, including without limitation:

- (a) the Patent(s) in each jurisdiction in which the Patent(s) was/is validated and all patent applications, patents and supplementary protection certificates which may derive or result from the same, including any divisionals, continuations, continuation-in-parts, reissues, reexaminations, extensions and registrations in relation to any thereof and all and any other rights in inventions comprised in the above (together referred to as "Patent Rights");
- (b) the benefit of all priority rights of the Patents; and
- (c) the right to seek and obtain registrations in other countries with respect to the Patents or any other patent included in the Patent Rights.

The Assignor agrees to execute any further documents and to do all things which the Assignee may require in order to vest or confirm the vesting in the Assignee (or the Assignee's successors in title or nominees as the case may be) of the Patents and all other Patent Rights in all relevant jurisdictions and of all other property right, title and interest intended to be assigned, transferred or granted to the Assignee hereunder and to give the Assignee the full benefit of this Assignment including doing all acts which may be necessary or desirable to record the Patents in the name of the Assignee in all relevant jurisdictions. The Assignor hereby authorizes the Assignee and the Assignee's agents to sign all such forms on behalf of the Assignor as the Assignee considers appropriate in order to record the Patents and any other Patent Rights in the name of the Assignee.

IN WITNESS WHEREOF, we have hereunto set our hands and seals.

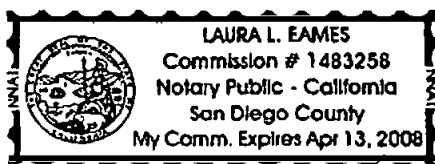
Dated: 3/10 2008


By: B. Lynne Parshall
COO and CFO
Isis Pharmaceuticals, Inc.

State of California)
County of San Diego) ss.

On March 10, 2008 before me, Laura L. Eames, Notary Public, personally appeared B. Lynne Parshall who is proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacities(ies), and that by his/her/their signatures(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.



[SEAL]

WITNESS my hand and official seal.

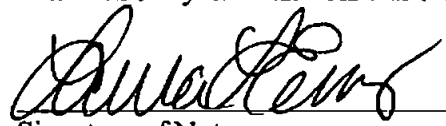

Signature of Notary

Exhibit A

Glucocorticoid Receptor Filings

Application No.

U.S. 60/538,173
U.S. 60/550,191
U.S. 11/039,629
U.S. 11/207,382
U.S. 11/207,478
PCT/US05/002431
EP1711606A2
JP2007520222T
U.S. 60/718,685
U.S. 11/524,507
PCT/US06/036527

Glucagon Receptor Filings

Application No.

U.S. 60/466,311
U.S. 60/466,256
U.S. 60/718,684
U.S. 10/832,622
U.S. 10/832,777
U.S. 11/697,280
U.S. 11/697,273
U.S. 11/697,270
U.S. 11/697,262
PCT/US04/013120
EP1620453
JP2006513404
U.S. 11/524,041
PCT/US06/036545

Attorney Docket: SPC 5261
SPC 5267
SPC 5268
SPC 5269
SPC 5270

ASSIGNMENT

WHEREAS, Ortho-McNeil, Inc. ("Assignor"), a New Jersey Corporation, having a place of business at 1000 US Route 202, Raritan, New Jersey 08869, is the sole owner of the United States Letters Patents set forth in Exhibit A, which Exhibit A is attached hereto and hereby made a part hereof; and

WHEREAS, Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, L.L.C. ("Assignee"), a New Jersey Corporation, having a place of business at 920 U.S. Route 202, Raritan, NJ 08869, is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to said Letters Patents:

NOW, THEREFORE, BE IT KNOWN, that for and in consideration of the sum of One Dollar (\$1.00) and other valuable considerations, the receipt of which is hereby acknowledged said Assignor has sold, assigned, transferred and set over, and by these presents does hereby sell, assign, transfer, and set over, unto said Assignee, its successors and assigns, the entire right, title and interest in and to each and all United States Letters Patents listed in Exhibit A, hereto annexed, and in and to all extensions, renewals and reissues thereof, including without limitation of generality, any and all choses in action and any and all claims and demands, both at law and in equity, that said Assignor has or may have for damages or profits accrued or to accrue on account of the infringement of any of said Letters Patents, the same to be held and enjoyed by said Assignee, its successors and assigns, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by Assignor if this Assignment and sale had not been made.

IN WITNESS WHEREOF, Assignor has caused this Assignment to be signed by its Assistant Secretary on this 14th day of March, 2008.

Ortho-McNeil, Inc.

By: Laura A. Donnelly
Print Name: Laura A. Donnelly

Attorney Docket: SPC 5261
SPC 5267
SPC 5268
SPC 5269
SPC 5270

STATE OF New Jersey:

COUNTY OF Middlesex :

BE IT REMEMBERED, That on this 11th day of March, 2008, before me, a Notary Public, personally appeared *Laura Donnelly*, who I am satisfied is the person named in and who executed the foregoing instrument in my presence, and I having first made known to her the contents thereof, she did acknowledge that she signed and delivered the same as her voluntary act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Subscribed and sworn before me at New Brunswick, New Jersey the date aforesaid.

Sheila R. Cole
Notary Public

SHEILA R. COLE
A NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires Oct. 18, 2010

Attorney Docket: SPC 5261
SPC 5267
SPC 5268
SPC 5269
SPC 5270

Exhibit A

GLUCOCORTICOID RECEPTOR FILINGS

Application No.
U.S. 60/538,173
U.S. 60/550,191
U.S. 11/039,629
U.S. 11/207,382
U.S. 11/207,478
PCT/US05/002431
EP1711606A2
JP2007520222T
U.S. 60/718,685
U.S. 11/524,507
PCT/US06/036527

GLUCAGON RECEPTOR FILINGS

Application No.
U.S. 60/466,311
U.S. 60/466,256
U.S. 60/718,684
U.S. 10/832,622
U.S. 10/832,777
U.S. 11/697,280
U.S. 11/697,273
U.S. 11/697,270
U.S. 11/697,262
PCT/US04/013120
EP1620453
JP2006513404
U.S. 11/524,041
PCT/US06/036545

Interested Company: JJPRD
 File Number : SPC5269WO
 Foreign Filing Deadline: 03/19/2008

COUNTRY	CERT	SPEC	PWR	ASSIGN	OATH	DISC	REMARKS	PAYCO	AGENT
AUSTRALIA								JJPRD	SHELS SHELSTON IP
BRAZIL								JJPRD	DANNE DANNEMANN, SIEMSEN, ETC.
CANADA								JJPRD	SWABY OGILVY RENAULT LLP/SEN.C.R.L., s.r.l.
CHINA (PRC)								JJPRD	CHIPAT CHINA PATENT AGENT (H.K.) LTD.
COLOMBIA								JJPRD	ESCBR ESCOBAR-URIBE ASOCIADOS
COSTA RICA								JJPRD	RUI GASTON BAUDRIT RUIZ, ESQ
ECUADOR								JJPRD	QUVED QUEVEDO & PONCE Y CARBO
EL SALVADOR								JJPRD	ROMER RICARDO ROMERO GUZMAN OFFICE
EGYPT								JJPRD	SABA
GUATEMALA								JJPRD	VITERI
HONDURAS								JJPRD	CASCO
INDIA								JJPRD	DAVAR L S DAVAR & CO
INDONESIA								JJPRD	BIRO BIRO-OKTROI ROOSSENSO
ISRAEL								JJPRD	COHEN SHLOMO COHEN
JAPAN								JJPRD	ODAJI ODAJIMA PATENT OFFICE
KOREA (SOUTH)								JJPRD	HSINT HAN SUNG INTERNATIONAL
MALAYSIA								JJPRD	SHERN SHEARN DELAMORE & CO
MEXICO								JJPRD	BECKERHIL
NEW ZEALAND								JJPRD	WEST A J PARK
NICARAGUA								JJPRD	CALDERA
NORWAY								JJPRD	BRYNS ZACCO NORWAY AS
PHILIPPINES								JJPRD	ROMLO ROMULO MABANTA, BUENAVENTURA
SINGAPORE								JJPRD	DREW DREW & NAPIER LLC
SOUTH AFRICA								JJPRD	ADAMS ADAMS & ADAMS
SRI LANKA								JJPRD	JUCRE JULIUS & CREASY
UKRAINE								JJPRD	PRGF A PRIGOF & PARTNERS LTD
VIETNAM								JJPRD	INVES INVESTIP
EA									
ARMENIA								JJPRD	CHAMB GORODISSKY & PARTNERS
AZERBAIJAN								JJPRD	CHAMB GORODISSKY & PARTNERS
BELARUS								JJPRD	CHAMB GORODISSKY & PARTNERS
EURASIAN PROCEDURE								JJPRD	CHAMB GORODISSKY & PARTNERS
KAZAKHISTAN								JJPRD	CHAMB GORODISSKY & PARTNERS
KIRGHIZISTAN								JJPRD	CHAMB GORODISSKY & PARTNERS
MOLDOVA								JJPRD	CHAMB GORODISSKY & PARTNERS

Interested Company: JJPRD
 File Number : SPC5269WO
 Foreign Filing Deadline: 03/19/2008

COUNTRY	CERT	SPEC	PWR	ASSIGN	OATH	DISC	REMARKS	PAYCO	AGENT
RUSSIA								JJPRD	CHAMB GORODISSKY & PARTNERS
TADJIKISTAN								JJPRD	CHAMB GORODISSKY & PARTNERS
TKRKMENISTAN								JJPRD	CHAMB GORODISSKY & PARTNERS
EPO								JJPRD	CARPM CARPMAELS AND RANSFORD
ALBANIA—EXT.								JJPRD	SCHUT SCHUTZ PATENTANWALTE & PARTNER
AUSTRIA								JJPRD	KIRKP KIRKPATRICK OFFICE S.A.
BELGIUM								JJPRD	RATNER RATNERPRESTIA
BOSNIA-HERZEGO—EXT.								JJPRD	IRIN IRIN PATENT LTD
BULGARIA								JJPRD	CENPA CENTAR ZA PATENTE ZAGREB S.P.O.
CROATIA—EXT.								JJPRD	THEO THEODOULOU DR. CHRISTOS A. K.ST.J.
CYPRUS								JJPRD	CERMIK CERMAK, HOREJS, MYSLIL LAWYERS AND
CZECH REPUBLIC								JJPRD	BUDDE BUDDER, SCHOU & OSTENFELD A/S
DENMARK								JJPRD	TURV A/S TURVAJA
ESTONIA								JJPRD	CARPM CARPMAELS AND RANSFORD
EPO								JJPRD	KOLST KOLSTER AB
FINLAND								JJPRD	WEINS WEINSTEIN CABINET
FRANCE								JJPRD	GROEN BOEHMERT & BOEHMERT
GERMANY								JJPRD	PAPA PAPA CONSTANTINO HELEN G.
GREECE								JJPRD	DANUB DANUBIA PATENTS
HUNGARY								JJPRD	PATICE PATICE, ICELANDIC IP LAW FIRM
ICELAND								JJPRD	KELLY F. R. KELLY AND CO.
IRELAND								JJPRD	JACOB JACOBACCI & PARTNERS S.P.A.
ITALY								JJPRD	PETER PETERSONA PATENTS
LATVIA								JJPRD	BALT A.A.A. BALTIC SERVICE COMPANY
LITHUANIA								JJPRD	FREY OFFICE ERNEST FREYLINGER
LUXEMBOURG								JJPRD	BINPRO
MACEDONIA—EXT.								JJPRD	CARPM CARPMAELS AND RANSFORD
MONACO								JJPRD	VRIES VRIESENDORP OCTROOIBUREAU & GAARD
NETHERLANDS								JJPRD	POLSE POLSERVICE PATENT AND TRADEMARK
POLAND								JJPRD	FERRE RAUL CESAR FERREIRA (HERDEIRA) LDA.
PORTUGAL								JJPRD	ROMIN ROMINVENT
ROMANIA								JJPRD	CERMIK CERMAK, HOREJS, MYSLIL LAWYERS
SLOVAK REPUBLIC								JJPRD	PISAR PATENTNA PISARNA
SLOVENIA								JJPRD	

Interested Company: JJPRD
 File Number : SPC5269WO
 Foreign Filing Deadline: 03/19/2008

COUNTRY	CERT	SPEC	PWR	ASSIGN	OATH	DISC	REMARKS	PAYCO	AGENT
SPAIN								JJPRD	UNGRI UNGRIA
SWEDEN								JJPRD	STOCK ZACCO SWEDEN AB
SWITZERLAND								JJPRD	BLUM E. BLUM & CO.
TURKEY								JJPRD	SUSSC STOCK INDUSTRIAL PROPERTY
UNITED KINGDOM								JJPRD	CARPM CARPMAELS AND RANSFORD
YUGOSLAVIA --EXT. (Serbia/Montenegro)								JJPRD	MIKIJ MIKIJELJ JANKOVIC & BOGDANOVIC

134
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-033378-00000-0000

Fecha: 2008-04-03 15:25:18
Tra: 11 PATENTE IYII
Act: 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACION
Evs: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 133



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Claudia M. Nueva Cortes

Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

135

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
ESCOBAR URIBE JIMENA

REFERENCIA	Radicación No.	8 33378
	Solicitud internacional	PCT/ES2006/036527
	Fecha inicio fase nacional	19/04/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	7775

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

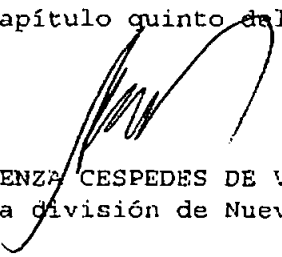
1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

3. Debe aclarar el nombre del solicitante, por cuanto la publicación internacional difiere del petitorio presentado en fase nacional.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 13 JUN. 2008
jfernand