COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MODULAR LA EXPRESIÓN DEL FACTOR B DEL COMPLEMENTO

Listado de secuencias

La presente solicitud se presenta junto con un Listado de Secuencias en formato electrónico. El listado de secuencias se proporciona como un archivo de nombre BIOL0251WOSEQ_ST25.txt, creado el 28 de abril de 2015, que tiene un tamaño de 204 kb. La información en formato electrónico del listado de secuencias se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

Campo

Las modalidades de la presente proporcionan métodos, compuestos y composiciones para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad asociada a una desregulación de la vía alternativa del complemento al administrarle un inhibidor específic del Factor B del Complemento (CFB, por sus siglas en inglés) a un sujeto.

Antecedentes

El sistema del complemento es parte del sistema inmunitario natural del hospedador que participa en el lisado de células foráneas, la potenciación de fagocitosis de antígenos, la aglomeración de agentes que incluyen antígenos y la atracción de macrófagos y neutrófilos. El sistema del complemento se divide en trs vías de iniciación—la clásica, lectina y vías alternativas—que convergen en el componente C3 para generar un complejo de enzima conocido como C3 convertasa, que escinde a C3 en C3a y C3b. C3b se asocia a la C3 convertasa mediada por CFB y da como resultado la generación de C5 convertasa, que escinde a C5 en C5a y C5b, lo que inicia la vía de ataque a la membrana que provoca la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC, por sus siglas en inglés) que comprende los componentes C5b, C6, C7, C8 y C9. El complejo de ataque a la membrana (MAC) forma canales transmembrana e interrumpe la bicapa fosfolipídica de las células objetivo, lo que lleva a la lisis celular.

En estado homeostático, la vía alternativa se activa de forma continua a un bajo nivel de "marcha" como resultado de la activación de la vía alternativa mediante hidrólisis espontánea de C3 y la producción de C3b, que genera la C5

convertasa.

Compendio

El sistema del complemento media la inmunidad natural y cumple un rol importante en la respuesta inflamatoria normal a lesiones, pero su desregulación puede provocar lesiones graves. La activación de la vía alternativa del complemento más allá de su nivel de "marcha" constitutivo puede llevar a una hiperactividad descontrolada y manifestarse como enfermedades de la desregulación del complemento.

Determinadas modalidades proporcionadas en la presente se refieren a métodos para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento en un sujeto mediante la administración de un inhibidor específico del Factor B del Complemento (CFB). Varias modalidades proporcionadas en la presente se refieren a un método para inhibir la expresión de CFB en un sujeto que padece, o que presenta riesgo de padecer, una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento mediante la administración de un inhibidor específico del CFB al sujeto. En determinadas modalidades, un método para reducir o inhibir la acumulación de depósitos de

C3 en el ojo de un sujeto que padece, o que presenta riesgo de padecer, una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento comprende administrarle un inhibidor específico del CFB al sujeto. En varias modalidades, un método para reducir o inhibir la acumulación de depósitos de C3 en el riñón de un sujeto que padece, o que presenta riesgo de padecer, una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento comprende administrarle un inhibidor específico del CFB al sujeto.

Descripción Detallada

Debe entenderse que tanto la descripción general precedente como la siguiente descripción detallada son únicamente ejemplos y explicaciones y no limitan la invención, tal como se reivindica. En la presente, el uso del singular incluye el plural a menos que se establezca específicamente lo contrario. Tal como se usa en la presente, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se especifique lo contrario. Asimismo, el uso de la expresión "que incluye" así como también otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es taxativo. Asimismo, términos tales como "elemento" o "componente" comprenden tanto elementos y componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que

comprenden más de una subunidad a menos que se especifique lo contrario.

Los encabezados de las secciones que se utilizan en la presente tienen únicamente fines de organización y no se debe interpretar que limitan la materia descrita. Todos los documentos o partes de documentos citados en esta solicitud, incluidos, de modo no taxativo, patentes, solicitudes de patente, artículos, libros y tratados, se incorporan a la presente de manera expresa mediante esta referencia, tanto las partes del documento discutidos en la presente así como en su totalidad.

A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con la química analítica, química sintética orgánica y química medicinal y farmacéutica descritas en la presente, así como sus procedimientos y técnicas, es la que se conoce y utiliza comúnmente en la técnica. Se pueden utilizar técnicas estándar para la síntesis química y el análisis químico. Determinadas de dichas técnicas y procedimientos pueden encontrarse en, por ejemplo, “Carbohydrate Modifications in Antisense Research” editado por Sangvi y Cook, American Chemical Society, Washington D.C., 1994; "Remington's Pharmaceutical Sciences,"

Mack Publishing Co., Easton, Pa., 21ª edición, 2005; y "Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications" editado por Stanley T. Crooke, CRC Press, Boca Raton, Florida; y Sambrook et ál., "Molecular Cloning, A laboratory Manual," 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, que se incorporan a la presente mediante esta referencia a todos los fines. Cuando se permita, todas las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones y otros datos mencionados en la descripción se incorporan mediante esta referencia en su totalidad.

A menos que se indique lo contrario, las siguientes expresiones tienen los siguientes significados:

"Nucleósido 2'-F" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende flúor en la posición 2'. A menos que se indique lo contrario, el flúor en un nucleósido 2'-F está en la posición ribo (reemplazando el OH de una ribosa natural).

"2'-O-metoxietilo" (también 2'-MOE y 2'-$O(CH_2)_2$-OCH_3) se refiere a una modificación de O-metoxi-etilo en la posición 2' de un anillo de furanosa. Un azúcar modificado por 2'-O-metoxietilo es un azúcar modificado.

Un "nucleósido 2’-MOE" (también nucleósido 2’-O-metoxietilo) se refiere a un nucleósido que comprende un resto azúcar modificado por 2’-MOE.

Un "nucleósido sustituido en 2’" significa un nucleósido que comprende un sustituyente en la posición 2’ del anillo de furanosilo que no sea H u OH. En determinadas modalidades, los nucleósidos sustituidos en 2’ incluyen nucleósidos con modificaciones de azúcar bicíclico.

Un "sitio objetivo 3’" se refiere al nucleótido de un ácido nucleico objetivo que es complementario al nucleótido más cercano a 3’ de un compuesto antisentido particular.

Un "sitio objetivo 5’" se refiere al nucleótido de un ácido nucleico objetivo que es complementario al nucleótido más cercano a 5’ de un compuesto antisentido particular.

“5-metilcitosina” significa una citosina modificada con un grupo metilo unida a la posición 5. Una 5-metilcitosina es una nucleobase modificada.

“Alrededor de” significa dentro de ± 10 % de un valor. Por ejemplo, de establecerse que “los compuestos afectados en al

menos alrededor de un 70 % de inhibición de CFB”, se implica que los niveles de CFB se inhiben dentro de un intervalo de 60 % a 80 %.

“Administración” o “que administra” hacen referencia a vías mediante las cuales se introduce un compuesto antisentido proporcionado en la presente en un sujeto para llevar a cabo su función deseada. Un ejemplo de una vía de administración que puede usarse incluye, de forma no taxativa, administración parenteral, tal como inyección o infusión subcutánea, intravenosa o intramuscular.

Tal como se usa en la presente, "alquilo" significa un radical de hidrocarburo ramificado o lineal que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, de modo no taxativo, metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, n-hexilo, octilo, decilo, dodecilo y similares. Los grupos alquilo típicamente incluyen de 1 a alrededor de 24 átomos de carbono, más típicamente de 1 a alrededor de 12 átomos de carbono (alquilo C1-C12) más preferentemente de 1 a alrededor de 6 átomos de carbono.

Tal como se usa en la presente, "alquenilo" significa un radical de cadena de hidrocarburo ramificada o lineal que

contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y tiene al menos un enlace doble carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, de modo no taxativo, etenilo, propenilo, butenilo, 1-metilo-2-buten-1-ilo, dienos, tales como 1,3-butadieno y similares. Los grupos alquenilo típicamente incluyen de 2 a alrededor de 24 átomos de carbono, más típicamente de 2 a alrededor de 12 átomos de carbono, más preferentemente de 2 a alrededor de 6 átomos de carbono. Los grupos alquenilo tal como se usan en la presente pueden incluir, opcionalmente, uno o más grupos sustituyentes adicionales.

Tal como se usa en la presente, "alquinilo" significa un radical de hidrocarburo ramificada o lineal que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y tiene al menos un enlace triple carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen, de modo no taxativo, etinilo, 1-propinilo, 1-butinilo y similares. Los grupos alquinilo típicamente incluyen de 2 a alrededor de 24 átomos de carbono, más típicamente de 2 a alrededor de 12 átomos de carbono, más preferentemente de 2 a alrededor de 6 átomos de carbono. Los grupos alquinilo que se usan en la presente pueden incluir, opcionalmente, uno o más grupos sustituyentes adicionales.

Tal como se usa en la presente, "acilo" significa un radical formado por una eliminación de un grupo hidroxilo de un ácido orgánico y tiene la fórmula general -C(O)-X donde X es típicamente alifático, acíclico o aromático. Los ejemplos incluyen carbonilos alifáticos, carbonilos aromáticos, sulfonilos alifáticos, sulfinilos aromáticos, sulfinilos alifáticos, fosfatos aromáticos, fosfatos alifáticos y similares. Los grupos acilo que se usan en la presente pueden incluir, opcionalmente, grupos sustituyentes adicionales.

Tal como se usa en la presente, "alicíclico" significa un sistema de anillos cíclico donde el anillo es alifático. El sistema de anillos puede comprender uno o más anillos donde al menos un anillo es alifático. Los alicíclicos preferidos incluyen anillos que tienen de alrededor de 5 a alrededor de 9 átomos de carbono en el anillo. Los alicíclicos que se usan en la presente pueden incluir, opcionalmente, grupos sustituyentes adicionales.

Tal como se usa en la presente, "alifático" significa un radical de hidrocarburo ramificado o lineal que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono, donde la saturación entre cualesquiera dos átomos de carbono es un enlace simple,

doble o triple. Un grupo alifático contiene, preferentemente, de 1 a alrededor de 24 átomos de carbono, más típicamente de 1 a alrededor de 12 átomos de carbono, más preferentemente de 1 a alrededor de 6 átomos de carbono. La cadena lineal o ramificada de un grupo alifático puede interrumpirse con uno o más heteroátomos que incluyen nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. Dichos grupos alifáticos interrumpidos por heteroátomos incluyen, de modo no taxativo, polialcoxis, tales como polialquilenglicoles, poliaminas y poliiminas. Los grupos alifáticos que se usan en la presente pueden incluir, opcionalmente, grupos sustituyentes adicionales.

Tal como se usa en la presente, "alcoxi" significa un radical que se forma entre un grupo alquilo y un átomo de oxígeno donde el átomo de oxígeno se utiliza para unir el grupo alcoxi a una molécula principal. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen, de modo no taxativo, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, *n*-butoxi, sec-butoxi, *terc*-butoxi, n-pentoxi, neopentoxi, n-hexoxi y similares. Los grupos alcoxi que se usan en la presente pueden incluir, opcionalmente, grupos sustituyentes adicionales.

Tal como se usa en la presente, "aminoalquilo" significa un radical de alquilo C1-C12 amino sustituido. La parte alquilo

de las formas radicales forma un enlace covalente con una molécula principal. El grupo amino puede ubicarse en cualquier posición y el grupo aminoalquilo puede sustituirse con un grupo sustituyente adicional en las partes amino y/o alquilo.

Tal como se usa en la presente, "aralquilo" y "arilalquilo" significan un grupo aromático que está unido covalentemente a un radical de alquilo C1-C12. La parte del radical de alquilo del grupo resultante aralquilo (o arilalquilo) forma un enlace covalente con una molécula principal. Los ejemplos incluyen, de modo no taxativo, bencilo, fenetilo y similares. Los grupos aralquilo que se utilizan en la presente pueden, opcionalmente, incluir grupos sustituyentes adicionales unidos al alquilo, arilo o ambos grupos que forman el grupo radical.

Tal como se usa en la presente, "arilo" y "aromático" significan radicales de sistemas de anillos carbocíclicos mono o policíclicos con uno o más anillos aromáticos. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, de modo no taxativo, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, idenilo y similares. Los sistemas de anillos de arilo preferidos tienen de alrededor de 5 a alrededor de 20 átomos de carbono en uno

o más anillos. Los grupos arilo que se usan en la presente pueden incluir, opcionalmente, grupos sustituyentes adicionales.

"Mejora" hace referencia a una disminución de al menos un indicador, una señal o un síntoma de una enfermedad, un trastorno o una afección asociada. En determinadas modalidades, el alivio incluye un retraso o desaceleración en la progresión de uno o más indicadores de una afección o enfermedad. La gravedad de los indicadores puede determinarse mediante medidas subjetivas u objetivas que conocen los expertos en la técnica.

"Animal" se refiere a un ser humano o a un animal no humano que incluye, de modo no taxativo, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y primates no humanos, que incluyen, de modo no taxativo, monos y chimpancés.

"Actividad antisentido" significa cualquier actividad detectable o medible que se puede atribuir a la hibridación de un compuesto antisentido con su ácido nucleico objetivo. En determinadas modalidades, la actividad antisentido es una disminución en la cantidad o expresión de un ácido nucleico o proteína objetivo codificada por dicho ácido nucleico

objetivo.

"Compuesto antisentido" significa un compuesto oligomérico que es capaz de ser sometido a hibridación de un ácido nucleico objetivo a través de enlazamiento de hidrógeno. Los ejemplos de compuestos antisentido incluyen compuestos monocatenarios y bicatenarios, tales como oligonucleótidos antisentido, ARNip, ARNhp, ARNcs y compuestos basados en la ocupación.

"Inhibición antisentido" significa una reducción de los niveles de ácido nucleico obejetivo en presencia de un compuesto antisentido complementario a un ácido nucleico objetivo comparado con los niveles de ácido nucleico objetivo en ausencia del compuesto antisentido.

"Mecanismos antisentido" son todos aquellos mecanismos que involucran la hibridación de un compuesto con un ácido nucleico objetivo, donde el resultado o efecto de la hibridación es ya sea degradación objetivo u ocupación objetivo con demora concomitante de la maquinaria celular que implica, por ejemplo, transcripción o empalme.

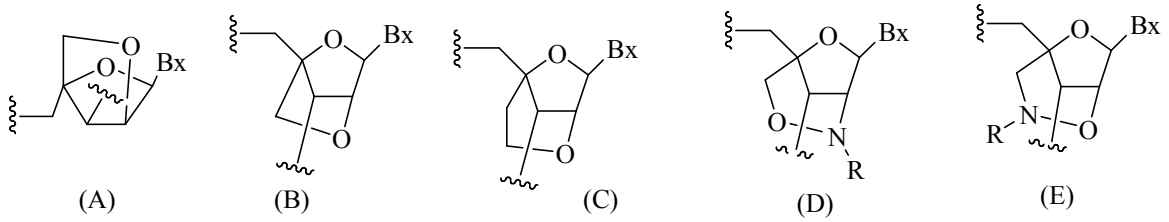
"Oligonucleótido antisentido" significa un oligonucleótido

monocatenario que tiene una secuencia de nucleobase que permite la hibridación a una región o segmento correspondiente de un ácido nucleico permite la hibridación a una región o segmento objetivo.

"Complementariedad de base" se refiere a la capacidad para el emparejamiento de base preciso de nucleobases de un oligonucleótido antisentido con nucleobases correspondientes en un ácido nucleico objetivo (es decir, hibridación), y se encuentra mediado por Watson-Crick, Hoogsteen o unión revertida de hidrógeno de Hoogsteen entre las nucleobases correspondientes.

"Resto de azúcar bicíclico" significa un resto de azúcar modificado que comprende un anillo de 4 a 7 miembros (incluido, de modo no taxativo, un furanosilo) que comprende un puente que conecta dos átomos del anillo de 4 a 7 miembros para formar un segundo anillo, que da como resultado una estructura bicíclica. En determinadas modalidades, el anillo de 4 a 7 miembros es un anillo de azúcar. En determinadas modalidades, el anillo de 4 a 7 miembros es un furanosilo. En determinadas de dichas modalidades, el puente conecta el carbono en la posición 2' y el carbono en la posición 4' del furanosilo.

"Ácido nucleico bicíclico" o "BNA" o "nucleósidos BNA" significa monómeros de ácido nucleico que tienen un puente que conecta dos átomos de carbono entre la posición 4' y 2' de la unidad de azúcar de nucleósido, lo que forma, de este modo, un azúcar bicíclico. Los ejemplos de dichos azúcares bicíclicos incluyen, de modo no taxativo, A) LNA de α-L-metilenoxi (4'-CH_2-O-2'), (B) LNA de β-D-metilenoxi (4'-CH_2-O-2'), (C) LNA de etilenoxi (4'-$(CH_2)_2$-O-2'), (D) LNA de aminooxi (4'-CH_2-O-N(R)-2') y (E) LNA de oxiamino (4'-CH_2-N(R)-O-2'), tal como se ilustra más adelante.



Tal como se usa en la presente, los compuestos de LNA incluyen, de modo no taxativo, compuestos que tienen al menos un puente entre la posición 4' y 2' del azúcar donde cada uno de los puentes comprende independientemente 1 o de 2 a 4 grupos unidos seleccionados independientemente de from $[C(R_1)(R_2)]_n$-, $C(R_1)=C(R_2)$-, $C(R_1)=N$-, $C(=NR_1)$-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, $-Si(R_1)_2$-, $-S(=O)_x$- y $N(R_1)$-; donde: x es 0, 1 o 2; n es 1, 2, 3 o 4; cada R_1 y R_2 es,

independientemente, H, un grupo protector, hidroxilo, alquilo C_1-C_{12}, alquilo C_1-C_{12} sustituido, alquenilo C_2-C_{12}, alquenilo C_2-C_{12} sustituido, alquinilo C_2-C_{12}, alquinilo C_2-C_{12} sustituido, arilo C_5-C_{20}, arilo C_5-C_{20} sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical alicíclico C_5-C_7, radical alicíclico C_5-C_7 sustituido, halógeno, OJ_1, NJ_1J_2, SJ_1, N_3, $COOJ_1$, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, CN, sulfonilo ($S(=O)_2$-J_1) o sulfoxilo (S(=O)-J_1); y cada J_1 y J_2 es, independientemente, H, alquilo C_1-C_{12}, alquilo C_1-C_{12} sustituido, alquenilo C_2-C_{12}, alquenilo C_2-C_{12} sustituido, alquinilo C_2-C_{12}, alquinilo C_2-C_{12} sustituido, arilo C_5-C_{20}, arilo C_5-C_{20} sustituidol, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, aminoalquilo C_1-C_{12}, aminoalquilo C_1-C_{12} sustituido o un grupo protector.

Los ejemplos de grupos que forman puentes 4' a 2' compredidos dentro de la definición de LNA incluyen, de forma no taxativa, una las fórmulas: $[C(R_1)(R_2)]_n$-, $[C(R_1)(R_2)]_n$-O-, $C(R_1R_2)$-$N(R_1)$-O- o $-C(R_1R_2)$-O-$N(R_1)$-. Además, otros grupos grupos que forman puentes comprendidos en la definición de LNA son los puentes 4'-CH_2-2', 4'-$(CH_2)_2$-2', 4'-$(CH_2)_3$-2', 4'-CH_2-O-2', 4'-$(CH_2)_2$-O-2', 4'-CH_2-O-$N(R_1)$-2' y 4'-CH_2-$N(R_1)$-O-

2'-, donde cada R_1 y R_2 es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C_1-C_{12}.

También se incluyen en la definición de LNA de acuerdo con la invención los LNA en los que el grupo 2'-hidroxilo del anillo de azúcar de ribosilo se conecta al átomo de carbono 4' del anillo de azúcar, formando así un puente metilenoxi (4'-CH_2-O-2') para formar el resto azúcar bicíclico. El puente también puede ser un grupo metileno (-CH_2-) que conecta el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4', para el cual se utiliza el término metilenoxi (4'-CH_2-O-2') LNA. Además, en el caso del resto de azúcar bicíclico con un grupo que forma puentes de etileno en esta posición, se utiliza el término LNA de etilenoxi (4'-CH_2CH_2-O-2'). α -L- metilenoxi (4'-CH_2-O-2'), un isómero de metilenoxi (4'-CH_2-O-2') LNA también se encuentra comprendido en la definición de LNA, como se usa en la presente.

"Estructura del casquete" o "resto de casquete terminal" significa modificaciones químicas que se incorporaron en cada extremo de un compuesto antisentido.

"Carbohidrato" significa cualquier carbohidrato de origen natural, un carbohidrato modificado o un derivado de

carbohidrato.

"Conglomerado de carbohidratos " significa un compuesto que tiene uno o más residuos de carbohidrato acoplados a un grupo enlazador o grupo estructural. (véase, por ejemplo, Maier et ál., "Synthesis of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a Multivalent Carbohydrate Cluster for Cellular Targeting," *Bioconjugate Chemistry*, 2003, (14): 18-29, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia, o Rensen et ál., "Design and Synthesis of Novel *N*-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asiaglycoprotein Receptor," *J. Med. Chem.* 2004, (47): 5798-5808, por ejemplos de conglomerados conjugados de carbohidratos).

"Derivado de carbohidrato" significa cualquier compuesto que puede sintetizarse usando un carbohidrato como material de partida o intermedio.

"cEt" o "etilo limitado" significa un resto de azúcar bicíclico que comprende un puente que conecta el carbono 4' y el carbono 2', donde el puente tiene la fórmula: 4'-$CH(CH_3)$-O-2'.

"Modificación química" significa una diferencia química en un compuesto cuando se compara con su contraparte de origen natural. Las modificaciones químicas de oligonucleótidos incluyen modificaciones de nucleósidos (incluidas modificaciones del resto de azúcar y modificaciones de nucleobases) y modificaciones de la unión internucleósido. En referencia a un oligonucleótido, la modificación química no incluye diferencias solamente en la secuencia de nucleobases.

"Enlace escindible" significa cualquier enlace químico capaz de dividirse. En determinadas modalidades, un enlace escindible se selecciona de entre: una amida, una poliamida, un éster, un éter, uno o ambos éteres de un fosfodiéster, un éster de fosfato, un carbamato, un disulfuro o un péptido.

"Resto escindible" significa un enlace o grupo que es capaz de dividirse en condiciones fisiológicas. a En determinadas modalidades, un resto escindible se escinde dentro de una célula o compartimentos subcelulares, tal como un lisosoma. En determinadas modalidades, un resto escindible se escinde por medio de enzimas endógenas, tales como nucleasas. En determinadas modalidades, un resto escindible comprende un grupo de átomos que tiene uno, dos, tres, cuatro o más de cuatro enlaces escindibles.

Tal como se usa en la presente, "conjugado" o "grupo conjugado" significa un átomo o grupo de átomos unidos a un oligonucleótido o compuesto oligomérico. En general, los grupos conjugados modifican una o más propiedades del compuesto al que están unidos, incluidas, de modo no taxativo, propiedades farmacodinámicas, farmacocinéticas, de unión, de absorción, de distribución celular, de absorción celular, de carga y/o de depuración.

"Enlazador conjugado" o "enlazador" en el contexto de un grupo conjugado significa una parte de un grupo conjugado que comprende cualquier átomo o grupo de átomos, y que unen de manera covalente (1) un oligonucleótido con otra parte del grupo conjugado o (2) dos o más partes del grupo conjugado.

Los grupos conjugados se muestran en la presente como radicales, proporcionando un enlace para formar una unión covalente a un compuesto oligomérico, tal como un oligonucleótido antisentido. En determinadas modalidades, el punto de acoplamiento del compuesto oligomérico es el átomo de oxígeno del extremo 3' del grupo 3'-hidroxilo de nucleósido del extremo 3' del compuesto oligomérico. En determinadas modalidades, el punto de acoplamiento del

compuesto oligomérico es el átomo de oxígeno del extremo 5' del grupo 5'-hidroxilo de nucleósido del extremo 5' del compuesto oligomérico. En determinadas modalidades, el enlace para formar la unión del compuesto oligomérico es un enlace escindible. En determinadas modalidades, dicho enlace escindible constituye la totalidad o parte de un resto escindible.

En determinadas modalidades, los grupos conjugados comprenden un resto escindible (por ejemplo, un enlace escindible o nucleósido escindible) y una parte de conglomerado de carbohidratos, tal como una parte de conglomerado de GalNAc. Dicha parte de conglomerado de carbohidrato comprende: un resto dirigido y, opcionalmente, un enlazador conjugado. En determinadas modalidades, la parte de conglomerado de carbohidratos se identifica mediante la cantidad e identidad del ligando. Por ejemplo, en determinadas modalidades, la parte de conglomerado de carbohidratos comprende grupos 3 GalNAc y se denomina “GalNAc3”. En determinadas modalidades, la parte de conglomerado de carbohidratos comprende grupos 4 GalNAc y se denomina “GalNAc4”. Se describen en la presente partes de conglomerados de carbohidratos (con ligaduras, grupos ramificados y grupos de enlazador conjugado específicos) y designados mediante numerales romanos seguidos

por el subíndice "a". Por consiguiente, “GalNac3-1a” se refiere a una parte de conglomerado de carbohidratos de un grupo conjugado que tiene 3 grupos GalNac y ligaduras, grupos ramificados y de unión identificados. Dicho fragmento de conglomerado de carbohidratos está acoplado a un compuesto oligomérico por medio de un resto escindible, tal como un enlace escindible o un nucleósido escindible.

Tal como se usa en la presente, "compuesto conjugado" significa cualquier átomo, grupo de átomos o grupo de átomos unidos adecuados para su uso como un grupo conjugado. En determinadas modalidades, los compuestos conjugados pueden poseer o impartir una o más propiedades, inclusive, de modo no taxativo, propiedades farmacodinámicas, farmacocinéticas, de unión, absorción, distribución celular, absorción celular, carga y/o depuración.

“Nucleósido de etilo limitado” (también denominado nucleósido de cEt) significa un nucleósido que comprende un resto azúcar bicíclico que comprende un puente 4’-CH(CH_3)-O-2’.

“Factor B del Complemento (CFB)” significa cualquier ácido nucleico o proteína de CFB. “Ácido nucleico de CFB” se refiere a cualquier ácido nucleico que codifica CFB. Por

ejemplo, en determinadas modalidades, un ácido nucleico de CFB incluye una secuencia de ADN que codifica CFB, una secuencia de ARN transcrita a partir de ADN que codifica CFB (que incluye ADN genómico que comprende intrones y exones), que incluye una secuencia de ARN de no codificación (es decir, que no codifica) de proteínas y una secuencia de ARNm que codifica CFB. "ARNm de CFB" se refiere a un ARNm que codifica una proteína CFB.

"Inhibidor específico de CFB" se refiere a cualquier agente capaz de inhibir de manera específica la expresión de ARN de CFB y/o la expresión o actividad de la proteína de CFB a nivel molecular. Por ejemplo, los inhibidores específicos de CFB incluyen ácidos nucleicos (que incluyen compuestos antisentido), péptidos, anticuerpos, moléculas pequeñas y otros agentes que pueden inhibir la expresión de ARN de CFB y/o proteína de CFB.

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

"Compuestos antisentido quiméricos" significa compuestos antisentido que tienen al menos 2 regiones distintas químicamente, donde cada posición tiene una pluralidad de subunidades.

"Complementariedad" significa la capacidad de formar pares entre nucleobases de un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico.

Se entenderá que "comprende", "comprenden" y "que comprende" implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos descritos pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos.

“Nucleobases contiguas” significa nucleobases inmediatamente adyacentes entre sí.

“Desoxinucleósido” significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar 2’-H furanosilo sugar moiety, tal como se encuentra en desoxirribonucleósidos de origen natural (ADN). En determinadas modalidades, un 2’-desoxinucleósido puede comprender una nucleobase modificada o puede comprender una

nucleobase de ARN (por ejemplo, uracilo).

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

"Que diseña" o "diseñada para" se refiere al proceso de diseño de un compuesto oligomérico que se hibrida, específicamente, con una molécula de ácido nucleico seleccionado.

"Modificado de manera diferente" significa modificaciones químicas o sustituyentes químicos que son diferentes entre sí, incluida la ausencia de modificaciones. Por lo tanto, por ejemplo, un nucleósido MOE y un nucleósido de ADN no modificado están "modificados de manera diferente", a pesar de que el nucleósido de ADN no esté modificado. De manera similar, el ADN y ARN están "modificados de manera diferente", a pesar de que ambos son nucleósidos no modificados de origen natural. Los nucleósidos que sean iguales, salvo por el hecho de que comprenden nucleobases diferentes, no están modificados de manera diferente. Por ejemplo, un nucleósido que comprende un azúcar modificado 2'-OMe y una nucleobase de adenina no modificada, y un

nucleósido que comprende un azúcar modificado 2’-OMe y una nucleobase de timina no modificada no están modificados de manera diferente.

“De cadena doble” se refiere a dos compuestos oligoméricos separados que hibridizan entre sí. Dichos compuestos de cadena doble pueden tener uno o más nucleósidos o nucleósidos no hibridables en uno o ambos extremos de una o ambas cadenas (excedentes) y/o uno o más nucleósidos internos no hibridables (malapareamientos), siempre y cuando haya complementariedad suficiente para mantener la hibridación en condiciones fisiológicamente relevantes.

Una "cantidad eficaz" significa la cantidad de agente farmacéutico activo suficiente para lograr un efecto fisiológico deseado en un individuo que necesita el agente. La cantidad eficaz puede variar entre los individuos dependiendo de la salud y el estado físico del individuo a tratar, el grupo taxonómico de sujetos a tratar, la formulación de la composición, la evaluación de la enfermedad del individuo y otros factores relevantes.

La “eficacia” significa la capacidad de producir un efecto deseado.

La "expresión" incluye todas las funciones mediante los cuales la información codificada de un gen se convierte en estructuras presentes y que funcionan en una célula. Tales estructuras incluyen, de modo no taxativo, los productos de la transcripción y la traducción.

"Complementariedad completa" o "100 % de complementariedad " significa que cada nucleobase de un primer ácido nucleico tiene una complementariedad de nucleobase en un segundo ácido nucleico. En determinadas modalidades, un primer ácido nucleico es un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana es un segundo ácido nucleico.

"Furanosilo" significa una estructura que comprende un anillo de 5 miembros que comprende cuatro átomos de carbono y un átomo de oxígeno.

“Gapmer” significa un compuesto antisentido quimérico en el que una región interna con múltiples nucleósidos que le brindan soporte a la escisión de RNasa H se coloca entre las regiones externas que tienen uno o más nucleósidos, donde los nucleósidos que comprenden la región interna son químicamente distintos del nucleósido o los nucleósidos que comprenden las

regiones externas. La región interna puede denominarse "segmento intermedio" y las regiones externas pueden denominarse "alas".

"Halo" y "halógeno" significan un átomo seleccionado de flúor, cloro, bromo y yodo.

"Heteroarilo" y "heteroaromático" significan un radical que comprende un sistema de anillos, sistema de anillos fusionados o un anillo aromático mono o policíclico donde al menos uno de los anillos es aromático e incluye uno o más heteroátomos. Se pretende que heteroarilo también incluya sistemas de anillos fusionados que incluyen sistemas donde uno o más de los anillos fusionados no contienen heteroátomos. Los grupos heteroarilo típicamente incluyen un átomo del anillo que se selecciona de azufre, nitrógeno u oxígeno. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, de modo no taxativo, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, benzooxazolilo, quinoxalinilo y similares. Los radicales heteroarilo pueden unirse a una molécula principal directamente o mediante un resto de unión, tal como un heteroátomo o grupo alifático.

Los grupos heteroarilo que se usan en la presente pueden incluir, opcionalmente, grupos sustituyentes adicionales.

"Hibridación" significa la alineación de las moléculas de ácido nucleico complementarias. En determinadas modalidades, moléculas de ácido nucleico complementarias incluyen, de modo no taxativo, un compuesto antisentido y un ácido nucleico de objetivo. En determinadas modalidades, moléculas de ácido nucleico complementarias incluyen, de modo no taxativo, un oligonucleótido antisentido y un ácido nucleico de objetivo.

"Identificar un animal que padece, o que presenta riesgo de padecer, una enfermedad, trastorno y/o afección" significa identificar un animal que ha sido diagnosticado con una enfermedad, trastorno y/o afección o identificar a un animal predispuesto a desarrollar la enfermedad, trastorno y/o afección. Dicha identificación puede lograrse mediante cualquier método que incluye la evaluación de la historia médica de un individuo y evaluaciones o pruebas clínicas estándar.

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

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

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

"Unión internucleósido" se refiere al enlace químico entre nucleósidos.

"Grupo de unión neutro internucleósido" significa un grupo de unión neutro que une directamente dos nucleósidos.

"Grupo de unión fósforo internucleósido" significa un grupo de unión a fósforo que une directamente dos nucleósidos.

Oligonucleótidos "alargados" antisentido son aquellos que tienen uno o más nucleósidos adicionales con relación a un oligonucleótido antisentido descrito en la presente.

"Motivo de unión" significa un patrón de modificaciones de unión en un oligonucleótido o una región de este. Los nucleósidos de dicho oligonucleótido pueden ser modificados o no modificados. A menos que se indique lo contrario, se

pretende que los motivos de la presente que describen únicamente uniones sean motivos de unión. Por lo tanto, en dichas instancias, los nucleósidos no están limitados.

Un "desoxinucleósido enlazado" significa una base de ácido nucleico (A, G, C, T, U) sustituido por desoxirribosa enlazado mediante un éster de fosfato para formar un nucleótido.

"Nucleósidos enlazados" significa nucleósidos adyacentes unidos mediante una unión internucleósido.

“Nucleósido de ácido nucleico bloqueado” o “LNA” significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar bicíclico que comprende un puente 4’-CH2-O-2’.

“Nucleobase no complementaria” o “mal apareada” se refiere al caso en que una nucleobase de un primer ácido nucleico no puede formar un par con la nucleobase correspondiente de un segundo ácido nucleico o un ácido nucleico objetivo.

"Unión internucleósido modificada" se refiere a una sustitución o cualquier cambio a partir de un enlace internucleósido de origen natural (es decir, un enlace

internucleósido de fosfodiéster).

“Nucleobase modificada” significa cualquier nucleobase sin ser adenina, citosina, guanina, timidina o uracilo. Una "nucleobase no modificada" significa las bases de purina adenina (A) y guanina (G) y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U).

"Nucleósido modificado" significa un nucleósido que tiene, independientemente, un resto azúcar modificado y/o una nucleobase modificada.

"Nucleótido modificado" significa un nucleótido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado, una unión internucleósido modificada o una nucleobase modificada.

"Oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido que comprende al menos una unión internucleósido modificada, un azúcar modificado y/o una nucleobase modificada.

"Azúcar modificado" significa la sustitución y/o cualquier cambio de un resto de azúcar natural.

"Modular" hace referencia a cambiar o ajustar una

característica de una célula, tejido, órgano u organismo. Por ejemplo, modular un ANRm de CFB puede significar aumentar o disminuir el nivel de ANRm de CFB y/o la proteína de CFB en una célula, tejido, órgano u organismo. Un "modulador" produce el cambio en la célula, tejido, órgano u organismo. Por ejemplo, un compuesto antisentido de CFB puede ser un modulador que aumenta o disminuye la cantidad de ANRm de CFB y/o la proteína de CFB en una célula, tejido, órgano u organismo.

"Monómero" hace referencia a una unidad única de un oligómero. Los monómeros incluyen, de forma no taxativa, nucleósidos y nucleótidos, ya sean de origen natural o modificados.

Tal como se usa en la presente, se pretende que la expresión "sistema de anillos mono o policíclicos" incluya todos los sistemas de anillos seleccionados de sistemas de anillos radicales simples o policíclicos donde los anillos están fusionados o unidos y se pretende que sea inclusiva de sistemas de anillos simples y mixtos, seleccionados de manera individual de alifático, alicíclico, arilo, heteroarilo, aralquilo, arilalquilo, heterocíclico, heteroarilo, heteroaromático y heteroarilalquilo. Dichas estructuras mono

y policíclicas pueden contener anillos que tengan, cada uno, el mismo nivel de saturación o cada uno, independientemente, tenga distintos niveles de saturación, inclusive, totalmente saturado, parcialmente saturado o totalmente insaturado. Cada anillo puede comprender átomos de anillos seleccionados de C, N, O y S para producir anillos heterocíclicos, así como anillos que comprendan únicamente átomos del anillo C, que pueden estar presentes en un motivo mixto, tal como, por ejemplo, benzimidazol, donde un anillo tiene únicamente átomos del anillo de carbono y el anillo fusionado tiene dos átomos de nitrógeno. El sistema de anillos mono o policíclicos puede sustituirse adicionalmente con grupos sustituyentes, tales como, por ejemplo, ftalimida, que tiene dos grupos =O unidos a uno de los anillos. Los sistemas de anillos mono o policíclicos pueden unirse a las moléculas principales mediante varias estrategias, tales como directamente mediante un átomo del anillo, fusionado mediante múltiples átomos del anillo, mediante un grupo sustituyente o mediante un resto de unión bifuncional.

"Motivo" significa un patrón de nucleósidos modificados y no modificados en un compuesto antisentido.

"Resto de azúcar natural" significa un resto de azúcar que se

encuentra en el ADN (2’-H) o ARN (2’-OH).

“Unión internucleósido de origen natural” significa una unión fosfodiéster 3' a 5'.

“Grupo de unión neutro” significa un grupo de unión que no está cargado. Los grupos de unión neutros incluyen, de modo no taxativo, fosfotriésteres, metilfosfonatos, MMI (-CH2-N(CH3)-O-), amida-3 (-CH2-C(=O)-N(H)-), amida-4 (-CH2-N(H)-C(=O)-), formacetal (-O-CH2-O-), y tioformacetal (-S-CH2-O-). Otros grupos de unión neutros incluyen uniones no iónicas que comprenden siloxano (dialquilsiloxano), éster de carboxilato, carboxamida, sulfuro, éster de sulfonato y amidas (ver por ejemplo: Carbohydrate Modifications in Antisense Research; Y.S. Sanghvi and P.D. Cook Eds. ACS Symposium Series 580; Capítulos 3 y 4, (pp. 40-65)). Los grupos de unión neutrales adicionales incluyen uniones no iónicas que comprenden partes componentes de N, O, S y CH2 mezcladas.

"Nucleobase no complementaria" hace referencia a un par de nucleobases que no forman enlaces de hidrógeno entre sí o permiten de otro modo la hibridación.

“Grupo de unión neutro no internucleósido" significa un grupo de unión neutro que no une directamente dos nucleósidos. En

determinadas modalidades, un grupo de unión neutro no internucleósido une un nucleósido a un grupo que no es un nucleósido. En determinadas modalidades, un grupo de unión neutro no internucleósido une dos grupos, ninguno de los cuales son nucleósidos.

"Grupo de unión a fósforo no internucleósido" significa un grupo de unión a fósforo que no une directamente dos nucleósidos. En determinadas modalidades, un grupo de unión a fósforo no internucleósido une un nucleósido a un grupo que no es un nucleósido. En determinadas modalidades, un grupo de unión a fósforo no internucleósido une dos grupos, ninguno de los cuales son nucleósidos.

"Ácido nucleico" se refiere a moléculas compuestas por nucleótidos monoméricos. Un ácido nucleico incluye, de forma no taxativa, ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos nucleicos de cadena simple y ácidos nucleicos de cadena doble.

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

"Complementariedad de nucleobase" se refiere a una

nucleobase que puede realizar un emparejamiento de base con otra nucleobase. Por ejemplo, en el ADN, la adenina (A) es complementaria a la timina (T). Por ejemplo, en el ARN, la adenina (A) es complementaria a uracilo (U). En determinadas modalidades, nucleobase complementaria se refiere a una nucleobase de un compuesto antisentido que puede realizar un emparejamiento de base con una nucleobase de su ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, si una nucleobase en una posición determinada de un compuesto antisentido es capaz de unirse mediante hidrógeno con una nucleobase en una posición determinada de un ácido nucleico objetivo, entonces la posición del enlace de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico objetivo se considera complementaria en ese par de nucleobases.

"Motivo de modificación de nucleobase" significa un patrón de modificaciones a nucleobases a lo largo de un oligonucleótido. A menos que se indique lo contrario, un motivo de modificación de nucleobase es independiente de la secuencia de nucleobases.

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

"Nucleósido" significa una nucleobase unida a un azúcar.

"Mimético de nucleósido" incluye aquellas estructuras usadas para reemplazar el azúcar o el azúcar y la base, y no necesariamente la unión en una o más posiciones de un compuesto oligomérico, tal como, por ejemplo, miméticos de nucleósidos que tienen miméticos de azúcar de morfolino, ciclohexenilo, ciclohexilo, tetrahidropiranilo, biciclo y triciclo, por ejemplo, unidades de azúcar diferentes a furanosa. "Mimético de nucleótido" incluye las estructuras usadas para remplazar el nucleósido y la unión en una o más posiciones de un compuesto oligomérico tal como, por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos o morfolinos (morfolinos enlazados por -N(H)-C(=O)-O- u otro enlace sin ser fosfodiéster). El sustituto de azúcar se superpone con el término ligeramente más amplio mimético de nucleósido, pero se pretende que indique el reemplazo únicamente de la unidad de azúcar (anillo de furanosa). Los anillos de tetrahidropiranilo proporcionados en la presente ilustran un ejemplo de un sustituto de azúcar, donde el grupo de azúcar de furanosa se reemplazó con un sistema de anillo de tetrahidropiranilo. "Mimético" hace referencia a grupos que son sustituidos por un azúcar, una nucleobase y/o una unión

internucleósido. Generalmente, un mimético se utiliza en lugar de la combinación de enlace de azúcar o azúcar-internucleósido y la nucleobase se mantiene para la hibridación de un objetivo seleccionado.

"Motivo de nucleósido" significa un patrón de modificaciones de nucleósidos en un oligonucleótido o una región de este. Las uniones de dicho oligonucleótido pueden estar modificadas o no modificadas. A menos que se indique lo contrario, se pretende que los motivos de la presente que describan únicamente nucleósidos sean motivos de nucleósidos. Por lo tanto, en dichas instancias, las uniones no están limitadas.

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

"Compuesto oligomérico" se refiere a un polímero de subunidades monoméricas enlazadas que se pueden hibridar a al menos una región de una molécula de ácido nucleico.

"Oligonucleósido" significa un olignucleótido en el que los enlaces internucleósido no contienen un átomo de fósforo.

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

"Administración parenteral" significa la administración a través de inyección o infusión. La administración parenteral incluye administración subcutánea, administración intravenosa, administración intramuscular, administración intraarterial, administración intraperitoneal o administración intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intracerebroventricular.

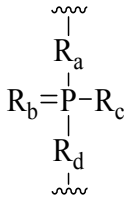
“Composición farmacéutica” significa una mezcla de sustancias adecuadas para su administración a un individuo. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender uno o más agentes farmacéuticos activos y una solución acuosa estéril.

“Sales farmacéuticamente aceptables” significa sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de compuestos antisentido, es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del oligonucleótido original y no provocan efectos toxicológicos no deseados en este.

“Unión fosforotioato” significa un enlace entre nucleósidos

en el que la unión fosfodiéster se modifica remplazando uno de los átomos de oxígeno que no forman puentes con un átomo de azufre. Una unión fosforotioato es una unión internucleósido modificada.

"Grupo de unión a fósforo" significa un grupo de unión que comprende un átomo de fósforo. Los grupos de unión a fósforo incluyen, de modo no taxativo, grupos que tienen la fórmula:



donde:

R_a y R_d son cada uno, independientemente, O, S, CH_2, NH, o NJ_1 donde J_1 es alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido;

R_b es O o S;

R_c es OH, SH, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6 sustituido, amino o amino sustituido; y

J_1 es R_b es O o S.

Los grupos de unión a fósforo incluyen, de modo no taxativo, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, fosfonato, fosforamidato, fosforotioamidato, tionoalquilfosfonato,

fosfotriésteres, tionoalquilfosfotriéster y boranofosfato.

"Parte" se refiere a una cantidad definida de nucleobases contiguas (es decir, enlazadas) de un ácido nucleico. En determinadas modalidades, una parte es una cantidad definida de nucleobases contiguas de un ácido nucleico objetivo. En determinadas modalidades, una parte es una cantidad definida de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido.

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

“Profármaco" significa una forma inactiva o menos activa de un compuesto que, al administrarse a un sujeto, se metaboliza para formar el compuesto activo o más activo (por ejemplo, fármaco).

“Cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un agente farmacéutico que le proporciona un beneficio profiláctico o preventivo a un animal.

"Grupo protector" significa cualquier compuesto o grupo protector conocido para los expertos en la técnica. Los ejemplos no taxativos de grupos protectores pueden encontrarse en "Protective Groups in Organic Chemistry", T. W. Greene, P. G. M. Wuts, ISBN 0-471-62301-6, John Wiley & Sons, Inc, Nueva York, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

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

"Ribonucleótido" significa un nucleótido que tiene un hidroxi en la posición 2' en la parte de azúcar del nucleótido. Los ribonucleótidos pueden ser modificados con cualquiera de una variedad de sustituyentes.

"Compuesto antisentido basado en RISC" significa un compuesto antisentido donde al menos cierta parte de la actividad antisentido del compuesto antisentido se puede atribuir al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés).

"Compuesto antisentido a base de RNasa H" significa un

compuesto antisentido donde al menos cierta parte de la actividad del compuesto antisentido se puede atribuir a la hibridación del compuesto antisentido con un ácido nucleico objetivo y la subsiguiente escisión del ácido nucleico objetivo mediante RNasa H.

“Segmentos” se definen como subpartes o partes más pequeñas de regiones dentro de un ácido nucleico objetivo.

“Regiones separadas" significa partes de un oligonucleótido donde las modificaciones químicas o el motivo de las modificaciones químicas de partes cercanas incluyen al menos una diferencia para permitir que las regiones separadas se distingan entre sí.

“Motivo de secuencia" significa un patrón nucleobases dispuestas a lo largo de un oligonucleótido o una parte de este. A menos que se indique lo contrario, un motivo de secuencia es independiente de las modificaciones químicas y, por lo tanto, puede tener cualquier combinación de modificaciones químicas, inclusive ninguna modificación química.

"Efectos secundarios" significa las enfermedades y/o

afecciones fisiológicas atribuibles a un tratamiento sin ser los efectos deseados. En determinadas modalidades, los efectos secundarios incluyen reacciones en el lugar de inyección, anomalías en las pruebas de función hepática, anomalías en la función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anomalías en el sistema nervioso central, miopatías y malestar. Por ejemplo, un aumento en los niveles de aminotransferasa en el suero puede indicar una toxicidad hepática o una anormalidad de la función hepática. Por ejemplo, un aumento en los niveles de bilirrubina puede indicar una toxicidad hepática o una anormalidad de la función hepática.

"Sitios", tal como se usan en la presente, se definen como posiciones de nucleobases únicas dentro de un ácido nucleico objetivo.

"Evolución lenta" significa una disminución en el desarrollo de dicha enfermedad.

"Hibridable específicamente" se refiere a un compuesto antisentido que tiene un grado suficiente de complementariedad entre un oligonucleótido antisentido y un ácido nucleico objetivo para inducir un efecto deseado, a la

vez que presenta efectos mínimos o ninguno en ácidos nucleicos objetivo bajo condiciones en las cuales se desea una unión específica, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* y tratamientos terapéuticos. "Condiciones rigurosas de hibridación" o "condiciones rigurosas" se refiere a las condiciones en las cuales un compuesto oligomérico se hibridará a su secuencia objetivo, sino a otra cantidad mínima de otras secuencias.

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

Tal como se usa en la presente, "sustituyente" y "grupo sustituyente" significan un átomo o grupo que reemplaza el átomo o grupo de un compuesto principal designado. Por ejemplo, un sustituyente de un nucleósido modificado es cualquier átomo o grupo que difiere del átomo o grupo que se encuentra en un nucleósido de origen natural (por ejemplo, un sustituyente 2' modificado es cualquier átomo o grupo en la posición 2' de un nucleósido que no sea H u OH). Los grupos sustituyentes pueden ser protegidos o no protegidos. En determinadas modalidades, los compuestos de la presente descripción tienen sustituyentes en una o en más de una posición del compuesto principal. Los sustituyentes también

pueden sustituirse con otros grupos sustituyentes y pueden unirse directamente o mediante un grupo de unión, tal como un grupo alquilo o hidrocarbilo a un compuesto principal.

De la misma manera, tal como se usa en la presente, "sustituyente", en referencia a un grupo funcional químico, significa un átomo o grupo de átomos que difiere del átomo o el grupo de átomos normalmente presente en el grupo funcional denominado. En determinadas modalidades, un sustituyente reemplaza un átomo de hidrógeno del grupo funcional (por ejemplo, en determinadas modalidades, el sustituyente de un grupo metilo sustituido es un átomo o grupo diferente al hidrógeno que reemplaza uno de los átomos de hidrógeno de un grupo metilo no sustituido). A menos que se indique lo contrario, los grupos aptos para su uso como sustituyentes incluyen, de modo no taxativo, halógeno, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, acilo (-C(O)Raa), carboxilo (-C(O)O-Raa), grupos alifáticos, grupos alicíclicos, alcoxi, oxi (-O-Raa) sustituido, arilo, aralquilo, radical heterocíclico, heteroarilo, heteroarilalquilo, amino (-N(Rbb)(Rcc)), imino(=NRbb), amido (-C(O)N(Rbb)(Rcc) o -N(Rbb)C(O)Raa), azido (-N3), nitro (-NO2), ciano (-CN), carbamido (-OC(O)N(Rbb)(Rcc) o -N(Rbb)C(O)ORaa), ureido (-N(Rbb)C(O)N(Rbb)(Rcc)), tioureido (-N(Rbb)C(S)N(Rbb)(Rcc)),

guanidinilo (-N(Rbb)C(=NRbb)N(Rbb)(Rcc)), amidinilo (-C(=NRbb)N(Rbb)(Rcc) o -N(Rbb)C(=NRbb)(Raa)), tiol (-SRbb), sulfinilo (-S(O)Rbb), sulfonilo (-S(O)2Rbb) y sulfonamidilo (-S(O)2N(Rbb)(Rcc) o -N(Rbb)S(O)2Rbb). Donde cada Raa, Rbb y Rcc es, independientemente, H, un grupo funcional químico opcionalmente unido o un grupo sustituyente adicional con una lista preferida que incluye, de modo no taxativo, alquilo, alquenilo, alquinilo, alifático, alcoxi, acilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, alicíclico, heterocíclico y heteroarilalquilo. Los sustituyentes seleccionados dentro de los compuestos descritos en la presente están presentes en un grado recursivo.

Tal como se usa en la presente, "resto de azúcar sustituido" significa un furanosilo que no es un resto de azúcar de origen natural. Los restos de azúcar sustituido incluyen, de modo no taxativo, furanosilos que comprenden sustituyentes en la posición 2', la posición 3', la posición 5' y/o la posición 4'. Determinados restos de azúcar sustituido son restos de azúcar bicíclico.

"Resto de azúcar" significa un resto de azúcar de origen natural o un resto de azúcar modificado de un nucleósido.

"Motivo de azúcar" significa un patrón de modificaciones de azúcar en un oligonucleótido o una región de este.

"Sustituto de azúcar" significa una estructura que no comprende un furanosilo y que es capaz de reemplazar el resto de azúcar de origen natural de un nucleósido, de manera que las subunidades resultantes de nucleósido sean capaces de unirse entre sí y/o de unirse a otros nucleósidos para formar un compuesto oligomérico que sea capaz de hibridarse con un compuesto oligomérico complementario. Dichas estructuras incluyen anillos que comprenden diferentes cantidades de átomos que furanosilo (por ejemplo, anillos de 4, 6 o 7 miembros), remplazo del oxígeno de un furanosilo con un átomo que no sea de oxígeno (por ejemplo, carbono, azufre o nitrógeno), o tanto un cambio en la cantidad de átomos como un remplazo del oxígeno. Dichas estructuras también pueden comprender sustituciones que corresponden a las descritas para los restos de azúcar sustituido (por ejemplo, sustitutos de azúcar bicíclicos carbocíclicos de 6 miembros que comprenden opcionalmente sustituyentes adicionales). Los sustitutos de azúcar también incluyen remplazos de azúcar más complejos (por ejemplo, los sistemas no anulares de ácido nucleico peptídico). Los sustitutos de azúcar incluyen, de modo no taxativo, morfolinos, ciclohexenilos y

ciclohexitoles.

“Objetivo” se refiere a una proteína, cuya modulación se desea.

“Gen objetivo” se refiere a un gen que codifica un objetivo.

"Dirigir" significa el proceso de diseñar y seleccionar un compuesto antisentido que se hibride específicamente a un ácido nucleico objetivo e induzca un efecto deseado.

"Ácido nucleico objetivo", "ARN objetivo" "transcripto de ARN objetivo" y "ácido nucleico objetivo" significan todos un ácido nucleico al que se pueden dirigir compuestos antisentido.

"Región objetivo" significa una parte de un ácido nucleico objetivo al cual se dirigen uno o más compuestos antisentido.

“Segmento objetivo” significa la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico objetivo al cual se dirige un compuesto antisentido. “Sitio objetivo 5’” se refiere al nucleótido más cercano a la posición 5’ de un segmento objetivo. "Sitio objetivo 3'" se refiere al nucleótido más cercano a 3' de un segmento objetivo.

Tal como se usa en la presente, "grupo terminal" significa uno o más átomos acoplados al extremo 3', al extremo 5', o a ambos, de un oligonucleótido. En determinadas modalidades, el grupo terminal es un grupo conjugado. En determinadas modalidades, un grupo terminal comprende uno o más nucleósidos de grupo terminal.

"Unión internucleósido del extremo" significa la unión entre los dos últimos nucleósidos de un oligonucleótido o región definida de este.

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

"Tratar" se refiere a la administración de una composición farmacéutica a un animal con el fin de provocar una alteración o mejora de una enfermedad, trastorno o afección en el animal. En determinadas modalidades, una o más composiciones farmacéuticas puede administrársele al animal.
Nucleobase "no modificada" significa las bases de purina adenina (A) y guanina (G) y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U).

"Nucleótido sin modificar" se refiere a un nucleótido compuesto por restos azúcar, enlaces internucleósido y nucleobases de origen natural. En determinadas modalidades, un nucleótido sin modificar es un nucleótido de ARN (es decir, β-D-ribonucleósidos) o un nucleótido de ADN (es decir,β-D-desoxirribonucleósido).

Determinadas modalidades

Determinadas modalidades proporcionan métodos, compuestos y composiciones para inhibir la expresión del Factor B del Complemento (CFB).

Determinadas modalidades proporcionan compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de CFB. En determinadas modalidades, el ácido nucleico de CFB tiene la secuencia establecida en el n.° de acceso de GENBANK NM_001710.5 (incorporada a la presente como la SEQ ID NO: 1) n.° de acceso de GENBANK NT_007592.15 truncado a partir de los nucleótidos 31852000 hasta 31861000 (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 2) n.° de acceso de GENBANK NW_001116486.1 truncado a partir de los nucleótidos 536000 hasta 545000 (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 3), n.° de acceso de GENBANK XM_001113553.2 (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 4), o n.° de acceso de GENBANK NM_008198.2 (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 5).

Determinadas modalidades proporcionan un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobases

que comprende al menos 8 nucleobases contiguas de cualquiera de las secuencias de nucleobases de las SEQ ID NO: 6-808.

Determinadas modalidades proporcionan un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 9 nucleobases contiguas de cualquiera de las secuencias de nucleobases de las SEQ ID NO: 6-808.

Determinadas modalidades proporcionan un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 10 nucleobases contiguas de cualquiera de las secuencias de nucleobases de las SEQ ID NO: 6-808.

Determinadas modalidades proporcionan un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 11 nucleobases contiguas de cualquiera de las secuencias de nucleobases de las SEQ ID NO: 6-808.

Determinadas modalidades proporcionan un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 12 nucleobases contiguas de cualquiera de las secuencias de nucleobases de las SEQ ID NO: 6-808.

Determinadas modalidades proporcionan un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobases que comprende la secuencia de nucleobases de cualquiera de las SEQ ID NO: 6-808.

Determinadas modalidades proporcionan un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en la secuencia de nucleobases de cualquiera de las SEQ ID NO: 6-808.

Determinadas modalidades proporcionan un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados complementarios dentro de nucleobases 30-49, 48-63, 150-169, 151-170, 152-171, 154-169, 154-173,

156-171, 156-175, 157-176, 158-173, 158-177, 480-499, 600-619, 638-657, 644-663, 738-757, 1089-1108, 1135-1154, 1141-1160, 1147-1166, 1150-1169, 1153-1172, 1159-1178, 1162-1181, 1165-1184, 1171-1186, 1171-1190, 1173-1188, 1173-1192, 1175-1190, 1175-1194, 1177-1196, 1183-1202, 1208-1227, 1235-1254, 1298-1317, 1304-1323, 1310-1329, 1316-1335, 1319-1338, 1322-1341, 1328-1347, 1349-1368, 1355-1374, 1393-1412, 1396-1415, 1399-1418, 1405-1424, 1421-1440, 1621-1640, 1646-1665, 1646-1665, 1647-1666, 1689-1708, 1749-1768, 1763-1782, 1912-1931, 2073-2092, 2085-2104, 2166-2185, 2172-2191, 2189-2208, 2191-2210, 2193-2212, 2195-2210, 2195-2214, 2196-2215, 2197-2212, 2197-2216, 2202-2221, 2223-2238, 2223-2242, 2225-2240, 2226-2245, 2227-2242, 2227-2246, 2238-2257, 2241-2260, 2267-2286, 2361-2380, 2388-2407, 2397-2416, 2448-2467, 2453-2472, 2455-2474, 2457-2472, 2457-2476, 2459-2474, 2459-2478, 2461-2476, 2461-2480, 2532-2551, 2550-2569, 2551-2566, 2551-2570, 2552-2568, 2552-2570, 2552-2571, 2553-2568, 2553-2570, 2553-2571, 2553-2572, 2554-2571, 2554-2572, 2554-2573, 2555-2570, 2555-2572, 2555-2574, 2556-2573, 2556-2574, 2556-2575, 2557-2573, 2557-2574, 2557-2575, 2557-2576, 2558-2575, 2558-2576, 2558-2577, 2559-2576, 2559-2577, 2559-2578, 2560-2577, 2560-2578, 2560-2579, 2561-2576, 2561-2578, 2561-2579, 2561-2580, 2562-2577, 2562-2579, 2562-2581, 2563-2578, 2563-2580, 2563-2582, 2564-2581, 2564-2583, 2565-2584, 2566-2583, 2566-2585, 2567-

2582, 2567-2584, 2567-2586, 2568-2583, 2568-2585, 2568-2587, 2569-2586, 2569-2588, 2570-2585, 2570-2587, 2570-2589, 2571-2586, 2571-2588, 2571-2590, 2572-2589, 2572-2590, 2572-2591, 2573-2590, 2573-2592, 2574-2590, 2574-2591, 2574-2593, 2575-2590, 2575-2591, 2575-2592, 2575-2594, 2576-2593, 2576-2595, 2577-2594, 2577-2595, 2577-2596, 2578-2594, 2578-2596, 2578-2597, 2579-2598, 2580-2596, 2580-2597, 2580-2598, 2580-2599, 2581-2597, 2581-2598, 2581-2599, 2581-2600, 2582-2598, 2582-2599, 2582-2600, 2582-2601, 2583-2599, 2583-2600, 2583-2601, 2583-2602, 2584-2600, 2584-2601, 2584-2602, 2584-2603, 2585-2601, 2585-2603, 2585-2604, 2586-2601, 2586-2602, 2586-2604, 2586-2605, 2587-2602, 2587-2603, 2587-2605, 2587-2606, 2588-2603, 2588-2604, 2588-2605, 2588-2606, 2588-2607, 2589-2604, 2589-2605, 2589-2606, 2589-2607, 2589-2608, 2590-2605, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2608, 2590-2609, 2590-2609, 2591-2607, 2591-2608, 2591-2609, 2591-2610, 2592-2607, 2592-2608, 2592-2609, 2592-2610, 2592-2611, 2593-2608, 2593-2609, 2593-2610, 2593-2612, 2594-2609, 2594-2610, 2594-2611, 2594-2612, 2594-2613, 2595-2610, 2595-2611, 2595-2612, 2595-2613, 2595-2614, 2596-2611, 2596-2612, 2596-2613, 2596-2614, 2596-2615, 2597-2612, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-2616, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2599-2614, 2599-2615, 2599-2616, 2599-2617, 2599-2618, 2600-2615, 2600-2616, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2601-2616, 2601-

2617, 2601-2618, 2601-2619, 2601-2620, 2602-2617, 2602-2618, 2602-2619, 2602-2620, 2602-2621, 2603-2618, 2603-2619, 2603-2620, 2603-2621, 2603-2622, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2608-2623, 2608-2624, 2608-2625, 2608-2626, 2608-2627, 2609-2624, 2609-2625, 2609-2626, 2609-2627, 2609-2628, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2627, 2610-2628, 2610-2629, 2611-2626, 2611-2627, 2611-2628, 2611-2629, 2611-2630, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2629, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2630, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630, 2615-2631, o 2616-2631 de la SEQ ID NO: 1 y donde dicho oligonucleótido modificado es al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % complementario a la SEQ ID NO: 1.

Determinadas modalidades proporcionan un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobases que comprende una parte de al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una parte de igual longitud de las nucleobases 30-49, 48-63, 150-169, 151-170, 152-171, 154-169, 154-173, 156-171, 156-175, 157-176, 158-173, 158-177, 480-

499, 600-619, 638-657, 644-663, 738-757, 1089-1108, 1135-1154, 1141-1160, 1147-1166, 1150-1169, 1153-1172, 1159-1178, 1162-1181, 1165-1184, 1171-1186, 1171-1190, 1173-1188, 1173-1192, 1175-1190, 1175-1194, 1177-1196, 1183-1202, 1208-1227, 1235-1254, 1298-1317, 1304-1323, 1310-1329, 1316-1335, 1319-1338, 1322-1341, 1328-1347, 1349-1368, 1355-1374, 1393-1412, 1396-1415, 1399-1418, 1405-1424, 1421-1440, 1621-1640, 1646-1665, 1646-1665, 1647-1666, 1689-1708, 1749-1768, 1763-1782, 1912-1931, 2073-2092, 2085-2104, 2166-2185, 2172-2191, 2189-2208, 2191-2210, 2193-2212, 2195-2210, 2195-2214, 2196-2215, 2197-2212, 2197-2216, 2202-2221, 2223-2238, 2223-2242, 2225-2240, 2226-2245, 2227-2242, 2227-2246, 2238-2257, 2241-2260, 2267-2286, 2361-2380, 2388-2407, 2397-2416, 2448-2467, 2453-2472, 2455-2474, 2457-2472, 2457-2476, 2459-2474, 2459-2478, 2461-2476, 2461-2480, 2532-2551, 2550-2569, 2551-2566, 2551-2570, 2552-2568, 2552-2570, 2552-2571, 2553-2568, 2553-2570, 2553-2571, 2553-2572, 2554-2571, 2554-2572, 2554-2573, 2555-2570, 2555-2572, 2555-2574, 2556-2573, 2556-2574, 2556-2575, 2557-2573, 2557-2574, 2557-2575, 2557-2576, 2558-2575, 2558-2576, 2558-2577, 2559-2576, 2559-2577, 2559-2578, 2560-2577, 2560-2578, 2560-2579, 2561-2576, 2561-2578, 2561-2579, 2561-2580, 2562-2577, 2562-2579, 2562-2581, 2563-2578, 2563-2580, 2563-2582, 2564-2581, 2564-2583, 2565-2584, 2566-2583, 2566-2585, 2567-2582, 2567-2584, 2567-2586, 2568-2583, 2568-2585,

2568-2587, 2569-2586, 2569-2588, 2570-2585, 2570-2587, 2570-2589, 2571-2586, 2571-2588, 2571-2590, 2572-2589, 2572-2590, 2572-2591, 2573-2590, 2573-2592, 2574-2590, 2574-2591, 2574-2593, 2575-2590, 2575-2591, 2575-2592, 2575-2594, 2576-2593, 2576-2595, 2577-2594, 2577-2595, 2577-2596, 2578-2594, 2578-2596, 2578-2597, 2579-2598, 2580-2596, 2580-2597, 2580-2598, 2580-2599, 2581-2597, 2581-2598, 2581-2599, 2581-2600, 2582-2598, 2582-2599, 2582-2600, 2582-2601, 2583-2599, 2583-2600, 2583-2601, 2583-2602, 2584-2600, 2584-2601, 2584-2602, 2584-2603, 2585-2601, 2585-2603, 2585-2604, 2586-2601, 2586-2602, 2586-2604, 2586-2605, 2587-2602, 2587-2603, 2587-2605, 2587-2606, 2588-2603, 2588-2604, 2588-2605, 2588-2606, 2588-2607, 2589-2604, 2589-2605, 2589-2606, 2589-2607, 2589-2608, 2590-2605, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2608, 2590-2609, 2590-2609, 2591-2607, 2591-2608, 2591-2609, 2591-2610, 2592-2607, 2592-2608, 2592-2609, 2592-2610, 2592-2611, 2593-2608, 2593-2609, 2593-2610, 2593-2612, 2594-2609, 2594-2610, 2594-2611, 2594-2612, 2594-2613, 2595-2610, 2595-2611, 2595-2612, 2595-2613, 2595-2614, 2596-2611, 2596-2612, 2596-2613, 2596-2614, 2596-2615, 2597-2612, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-2616, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2599-2614, 2599-2615, 2599-2616, 2599-2617, 2599-2618, 2600-2615, 2600-2616, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2601-2616, 2601-2617, 2601-2618, 2601-2619, 2601-2620, 2602-2617,

2602-2618, 2602-2619, 2602-2620, 2602-2621, 2603-2618, 2603-2619, 2603-2620, 2603-2621, 2603-2622, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2608-2623, 2608-2624, 2608-2625, 2608-2626, 2608-2627, 2609-2624, 2609-2625, 2609-2626, 2609-2627, 2609-2628, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2627, 2610-2628, 2610-2629, 2611-2626, 2611-2627, 2611-2628, 2611-2629, 2611-2630, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2629, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2630, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630, 2615-2631, o 2616-2631 de la SEQ ID NO:1 y, donde la secuencia de nucleobases del oligonucleótido modificado es al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % complementario a la SEQ ID NO: 1.

Determinadas modalidades proporcionan un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados complementarios dentro de nucleobases 1608-1627, 1685-1704, 1686-1705, 1751-1770, 1769-1784, 1871-1890, 1872-1891, 1873-1892, 1875-1890, 1875-1894, 1877-1892, 1877-1896, 1878-1897, 1879-1894, 1879-1898, 2288-2307, 2808-2827, 2846-2865, 2852-2871, 2946-2965, 3773-3792, 3819-3838,

3825-3844, 3831-3850, 3834-3853, 3837-3856, 3843-3862, 4151-4166, 4151-4170, 4153-4172, 4159-4178, 4184-4203, 4211-4230, 4609-4628, 4612-4631, 4615-4634, 4621-4640, 4642-4661, 4648-4667, 4686-4705, 4689-4708, 4692-4711, 4698-4717, 4714-4733, 5270-5289, 5295-5314, 5296-5315, 5830-5849, 5890-5909, 5904-5923, 6406-6425, 6662-6681, 6674-6693, 6954-6973, 6960-6979, 6977-6996, 6979-6998, 6981-7000, 6983-6998, 6983-7002, 6984-7003, 6985-7000, 6985-7004, 6990-7009, 7122-7141, 7125-7144, 7151-7170, 7353-7372, 7362-7381, 7683-7702, 7688-7707, 7690-7709, 7692-7707, 7692-7711, 7694-7709, 7694-7713, 7696-7711, 7696-7715, 7767-7786, 7785-7804, 7786-7801, 7787-7803, 7787-7805, 7787-7806, 7788-7803, 7788-7805, 7788-7806, 7788-7807, 7789-7806, 7789-7807, 7789-7808, 7790-7805, 7790-7807, 7790-7809, 7791-7808, 7791-7809, 7791-7810, 7792-7808, 7792-7809, 7792-7810, 7792-7811, 7793-7810, 7793-7811, 7793-7812, 7794-7811, 7794-7812, 7794-7813, 7795-7812, 7795-7813, 7795-7814, 7796-7811, 7796-7813, 7796-7814, 7796-7815, 7797-7812, 7797-7814, 7797-7816, 7798-7813, 7798-7815, 7798-7817, 7799-7816, 7799-7818, 7800-7819, 7801-7818, 7801-7820, 7802-7817, 7802-7819, 7802-7821, 7803-7818, 7803-7820, 7803-7822, 7804-7821, 7804-7823, 7805-7820, 7805-7822, 7805-7824, 7806-7821, 7806-7823, 7806-7825, 7807-7824, 7807-7825, 7807-7826, 7808-7825, 7808-7827, 7809-7825, 7809-7826, 7809-7828, 7810-7825, 7810-7826, 7810-7827, 7810-7829, 7811-7828, 7811-7830, 7812-7829,

7812-7830, 7812-7831, 7813-7829, 7813-7831, 7813-7832, 7814-7833, 7815-7831, 7815-7832, 7815-7833, 7815-7834, 7816-7832, 7816-7833, 7816-7834, 7816-7835, 7817-7833, 7817-7834, 7817-7835, 7817-7836, 7818-7834, 7818-7835, 7818-7836, 7818-7837, 7819-7835, 7819-7836, 7819-7837, 7819-7838, 7820-7836, 7820-7838, 7820-7839, 7821-7836, 7821-7837, 7821-7839, 7821-7840, 7822-7837, 7822-7838, 7822-7840, 7822-7841, 7823-7838, 7823-7839, 7823-7839, 7823-7840, 7823-7841, 7823-7842, 7824-7839, 7824-7840, 7824-7840, 7824-7841, 7824-7842, 7824-7843, 7825-7840, 7825-7841, 7825-7842, 7825-7843, 7825-7844, 7826-7842, 7826-7843, 7826-7844, 7826-7845, 7827-7842, 7827-7843, 7827-7844, 7827-7845, 7827-7846, 7828-7843, 7828-7844, 7828-7845, 7828-7847, 7829-7844, 7829-7845, 7829-7846, 7829-7847, 7829-7848, 7830-7845, 7830-7846, 7830-7847, 7830-7848, 7830-7849, 7831-7846, 7831-7847, 7831-7848, 7831-7849, 7831-7850, 7832-7847, 7832-7848, 7832-7849, 7832-7850, 7832-7851, 7833-7848, 7833-7849, 7833-7850, 7833-7851, 7833-7852, 7834-7849, 7834-7850, 7834-7851, 7834-7852, 7834-7853, 7835-7850, 7835-7851, 7835-7852, 7835-7853, 7835-7854, 7836-7851, 7836-7852, 7836-7853, 7836-7854, 7836-7855, 7837-7852, 7837-7853, 7837-7854, 7837-7855, 7837-7856, 7838-7853, 7838-7854, 7838-7855, 7838-7856, 7838-7857, 7839-7854, 7839-7855, 7839-7856, 7839-7857, 7839-7858, 7840-7855, 7840-7856, 7840-7857, 7840-7858, 7840-7859, 7841-7856, 7841-7857, 7841-7858, 7841-7859, 7841-7860,

7842-7857, 7842-7858, 7842-7859, 7842-7860, 7842-7861, 7843-7858, 7843-7859, 7843-7860, 7843-7861, 7843-7862, 7844-7859, 7844-7860, 7844-7861, 7844-7862, 7845-7860, 7845-7861, 7845-7862, 7846-7861, o 7846-7862 de la SEQ ID NO: 2 y donde dicho oligonucleótido modificado es al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % complementario a la SEQ ID NO: 2.

Determinadas modalidades proporcionan un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobases que comprende una parte de al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una parte de igual longitud de las nucleobases 1608-1627, 1685-1704, 1686-1705, 1751-1770, 1769-1784, 1871-1890, 1872-1891, 1873-1892, 1875-1890, 1875-1894, 1877-1892, 1877-1896, 1878-1897, 1879-1894, 1879-1898, 2288-2307, 2808-2827, 2846-2865, 2852-2871, 2946-2965, 3773-3792, 3819-3838, 3825-3844, 3831-3850, 3834-3853, 3837-3856, 3843-3862, 4151-4166, 4151-4170, 4153-4172, 4159-4178, 4184-4203, 4211-4230, 4609-4628, 4612-4631, 4615-4634, 4621-4640, 4642-4661, 4648-4667, 4686-4705, 4689-4708, 4692-4711, 4698-4717, 4714-4733, 5270-5289, 5295-5314, 5296-5315, 5830-5849, 5890-5909, 5904-5923, 6406-6425, 6662-6681, 6674-6693, 6954-6973, 6960-6979, 6977-6996, 6979-6998, 6981-7000, 6983-6998, 6983-

7002, 6984-7003, 6985-7000, 6985-7004, 6990-7009, 7122-7141, 7125-7144, 7151-7170, 7353-7372, 7362-7381, 7683-7702, 7688-7707, 7690-7709, 7692-7707, 7692-7711, 7694-7709, 7694-7713, 7696-7711, 7696-7715, 7767-7786, 7785-7804, 7786-7801, 7787-7803, 7787-7805, 7787-7806, 7788-7803, 7788-7805, 7788-7806, 7788-7807, 7789-7806, 7789-7807, 7789-7808, 7790-7805, 7790-7807, 7790-7809, 7791-7808, 7791-7809, 7791-7810, 7792-7808, 7792-7809, 7792-7810, 7792-7811, 7793-7810, 7793-7811, 7793-7812, 7794-7811, 7794-7812, 7794-7813, 7795-7812, 7795-7813, 7795-7814, 7796-7811, 7796-7813, 7796-7814, 7796-7815, 7797-7812, 7797-7814, 7797-7816, 7798-7813, 7798-7815, 7798-7817, 7799-7816, 7799-7818, 7800-7819, 7801-7818, 7801-7820, 7802-7817, 7802-7819, 7802-7821, 7803-7818, 7803-7820, 7803-7822, 7804-7821, 7804-7823, 7805-7820, 7805-7822, 7805-7824, 7806-7821, 7806-7823, 7806-7825, 7807-7824, 7807-7825, 7807-7826, 7808-7825, 7808-7827, 7809-7825, 7809-7826, 7809-7828, 7810-7825, 7810-7826, 7810-7827, 7810-7829, 7811-7828, 7811-7830, 7812-7829, 7812-7830, 7812-7831, 7813-7829, 7813-7831, 7813-7832, 7814-7833, 7815-7831, 7815-7832, 7815-7833, 7815-7834, 7816-7832, 7816-7833, 7816-7834, 7816-7835, 7817-7833, 7817-7834, 7817-7835, 7817-7836, 7818-7834, 7818-7835, 7818-7836, 7818-7837, 7819-7835, 7819-7836, 7819-7837, 7819-7838, 7820-7836, 7820-7838, 7820-7839, 7821-7836, 7821-7837, 7821-7839, 7821-7840, 7822-7837, 7822-7838, 7822-7840, 7822-7841, 7823-

7838, 7823-7839, 7823-7839, 7823-7840, 7823-7841, 7823-7842, 7824-7839, 7824-7840, 7824-7840, 7824-7841, 7824-7842, 7824-7843, 7825-7840, 7825-7841, 7825-7842, 7825-7843, 7825-7844, 7826-7842, 7826-7843, 7826-7844, 7826-7845, 7827-7842, 7827-7843, 7827-7844, 7827-7845, 7827-7846, 7828-7843, 7828-7844, 7828-7845, 7828-7847, 7829-7844, 7829-7845, 7829-7846, 7829-7847, 7829-7848, 7830-7845, 7830-7846, 7830-7847, 7830-7848, 7830-7849, 7831-7846, 7831-7847, 7831-7848, 7831-7849, 7831-7850, 7832-7847, 7832-7848, 7832-7849, 7832-7850, 7832-7851, 7833-7848, 7833-7849, 7833-7850, 7833-7851, 7833-7852, 7834-7849, 7834-7850, 7834-7851, 7834-7852, 7834-7853, 7835-7850, 7835-7851, 7835-7852, 7835-7853, 7835-7854, 7836-7851, 7836-7852, 7836-7853, 7836-7854, 7836-7855, 7837-7852, 7837-7853, 7837-7854, 7837-7855, 7837-7856, 7838-7853, 7838-7854, 7838-7855, 7838-7856, 7838-7857, 7839-7854, 7839-7855, 7839-7856, 7839-7857, 7839-7858, 7840-7855, 7840-7856, 7840-7857, 7840-7858, 7840-7859, 7841-7856, 7841-7857, 7841-7858, 7841-7859, 7841-7860, 7842-7857, 7842-7858, 7842-7859, 7842-7860, 7842-7861, 7843-7858, 7843-7859, 7843-7860, 7843-7861, 7843-7862, 7844-7859, 7844-7860, 7844-7861, 7844-7862, 7845-7860, 7845-7861, 7845-7862, 7846-7861, y 7846-7862 de la SEQ ID NO: 2 y donde la secuencia de nucleobases del oligonucleótido modificado es al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % complementario a la SEQ ID NO: 2.

En determinadas modalidades, los compuestos u oligonucleótidos antisentido se dirigen a una región de un ácido nucleico de CFB. En determinadas modalidades, dichos compuestos u oligonucleótidos dirigidos a la región de un ácido nucleico de CFB tienen una parte de nucleobase contigua que es complementaria a una parte de la nucleobase de la región de igual longitud. Por ejemplo, la parte puede ser al menos una parte de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleobases contiguas complementarias a una parte de una región de igual longitud descrita en la presente. En determinadas modalidades, un compuesto comprende o consiste en un conjugado y un oligonucleótido modificado que se dirige a cualquiera de las siguientes regiones de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1: 30-49, 48-63, 150-169, 151-170, 152-171, 154-169, 154-173, 156-171, 156-175, 157-176, 158-173, 158-177, 480-499, 600-619, 638-657, 644-663, 738-757, 1089-1108, 1135-1154, 1141-1160, 1147-1166, 1150-1169, 1153-1172, 1159-1178, 1162-1181, 1165-1184, 1171-1186, 1171-1190, 1173-1188, 1173-1192, 1175-1190, 1175-1194, 1177-1196, 1183-1202, 1208-1227, 1235-1254, 1298-1317, 1304-1323, 1310-1329, 1316-1335, 1319-1338, 1322-1341, 1328-1347, 1349-1368, 1355-1374, 1393-1412, 1396-1415, 1399-1418, 1405-1424, 1421-1440, 1621-1640, 1646-1665, 1646-1665, 1647-1666, 1689-1708, 1749-1768, 1763-1782,

1912-1931, 2073-2092, 2085-2104, 2166-2185, 2172-2191, 2189-2208, 2191-2210, 2193-2212, 2195-2210, 2195-2214, 2196-2215, 2197-2212, 2197-2216, 2202-2221, 2223-2238, 2223-2242, 2225-2240, 2226-2245, 2227-2242, 2227-2246, 2238-2257, 2241-2260, 2267-2286, 2361-2380, 2388-2407, 2397-2416, 2448-2467, 2453-2472, 2455-2474, 2457-2472, 2457-2476, 2459-2474, 2459-2478, 2461-2476, 2461-2480, 2532-2551, 2550-2569, 2551-2566, 2551-2570, 2552-2568, 2552-2570, 2552-2571, 2553-2568, 2553-2570, 2553-2571, 2553-2572, 2554-2571, 2554-2572, 2554-2573, 2555-2570, 2555-2572, 2555-2574, 2556-2573, 2556-2574, 2556-2575, 2557-2573, 2557-2574, 2557-2575, 2557-2576, 2558-2575, 2558-2576, 2558-2577, 2559-2576, 2559-2577, 2559-2578, 2560-2577, 2560-2578, 2560-2579, 2561-2576, 2561-2578, 2561-2579, 2561-2580, 2562-2577, 2562-2579, 2562-2581, 2563-2578, 2563-2580, 2563-2582, 2564-2581, 2564-2583, 2565-2584, 2566-2583, 2566-2585, 2567-2582, 2567-2584, 2567-2586, 2568-2583, 2568-2585, 2568-2587, 2569-2586, 2569-2588, 2570-2585, 2570-2587, 2570-2589, 2571-2586, 2571-2588, 2571-2590, 2572-2589, 2572-2590, 2572-2591, 2573-2590, 2573-2592, 2574-2590, 2574-2591, 2574-2593, 2575-2590, 2575-2591, 2575-2592, 2575-2594, 2576-2593, 2576-2595, 2577-2594, 2577-2595, 2577-2596, 2578-2594, 2578-2596, 2578-2597, 2579-2598, 2580-2596, 2580-2597, 2580-2598, 2580-2599, 2581-2597, 2581-2598, 2581-2599, 2581-2600, 2582-2598, 2582-2599, 2582-2600, 2582-2601, 2583-2599, 2583-2600,

2583-2601, 2583-2602, 2584-2600, 2584-2601, 2584-2602, 2584-2603, 2585-2601, 2585-2603, 2585-2604, 2586-2601, 2586-2602, 2586-2604, 2586-2605, 2587-2602, 2587-2603, 2587-2605, 2587-2606, 2588-2603, 2588-2604, 2588-2605, 2588-2606, 2588-2607, 2589-2604, 2589-2605, 2589-2606, 2589-2607, 2589-2608, 2590-2605, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2608, 2590-2609, 2590-2609, 2591-2607, 2591-2608, 2591-2609, 2591-2610, 2592-2607, 2592-2608, 2592-2609, 2592-2610, 2592-2611, 2593-2608, 2593-2609, 2593-2610, 2593-2612, 2594-2609, 2594-2610, 2594-2611, 2594-2612, 2594-2613, 2595-2610, 2595-2611, 2595-2612, 2595-2613, 2595-2614, 2596-2611, 2596-2612, 2596-2613, 2596-2614, 2596-2615, 2597-2612, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-2616, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2599-2614, 2599-2615, 2599-2616, 2599-2617, 2599-2618, 2600-2615, 2600-2616, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2601-2616, 2601-2617, 2601-2618, 2601-2619, 2601-2620, 2602-2617, 2602-2618, 2602-2619, 2602-2620, 2602-2621, 2603-2618, 2603-2619, 2603-2620, 2603-2621, 2603-2622, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2608-2623, 2608-2624, 2608-2625, 2608-2626, 2608-2627, 2609-2624, 2609-2625, 2609-2626, 2609-2627, 2609-2628, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2627, 2610-2628, 2610-2629,

2611-2626, 2611-2627, 2611-2628, 2611-2629, 2611-2630, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2629, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2630, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630, 2615-2631, y 2616-2631.

En determinadas modalidades, los compuestos u oligonucleótidos antisentido se dirigen a una región de un ácido nucleico de CFB. En determinadas modalidades, dichos compuestos u oligonucleótidos dirigidos a la región de un ácido nucleico de CFB tienen una parte de nucleobase contigua que es complementaria a una parte de la nucleobase de la región de igual longitud. Por ejemplo, la parte puede ser al menos una parte de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleobases contiguas complementarias a una parte de una región de igual longitud descrita en la presente. En determinadas modalidades, un compuesto comprende o consiste en un conjugado y un oligonucleótido modificado que se dirige a las siguientes regiones de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2: 1608-1627, 1685-1704, 1686-1705, 1751-1770, 1769-1784, 1871-1890, 1872-1891, 1873-1892, 1875-1890, 1875-1894, 1877-1892, 1877-1896, 1878-1897, 1879-1894, 1879-1898, 2288-2307, 2808-2827, 2846-2865, 2852-2871, 2946-2965, 3773-3792, 3819-3838, 3825-3844, 3831-3850, 3834-3853, 3837-3856, 3843-3862, 4151-4166, 4151-4170, 4153-4172, 4159-4178, 4184-4203, 4211-4230,

4609-4628, 4612-4631, 4615-4634, 4621-4640, 4642-4661, 4648-4667, 4686-4705, 4689-4708, 4692-4711, 4698-4717, 4714-4733, 5270-5289, 5295-5314, 5296-5315, 5830-5849, 5890-5909, 5904-5923, 6406-6425, 6662-6681, 6674-6693, 6954-6973, 6960-6979, 6977-6996, 6979-6998, 6981-7000, 6983-6998, 6983-7002, 6984-7003, 6985-7000, 6985-7004, 6990-7009, 7122-7141, 7125-7144, 7151-7170, 7353-7372, 7362-7381, 7683-7702, 7688-7707, 7690-7709, 7692-7707, 7692-7711, 7694-7709, 7694-7713, 7696-7711, 7696-7715, 7767-7786, 7785-7804, 7786-7801, 7787-7803, 7787-7805, 7787-7806, 7788-7803, 7788-7805, 7788-7806, 7788-7807, 7789-7806, 7789-7807, 7789-7808, 7790-7805, 7790-7807, 7790-7809, 7791-7808, 7791-7809, 7791-7810, 7792-7808, 7792-7809, 7792-7810, 7792-7811, 7793-7810, 7793-7811, 7793-7812, 7794-7811, 7794-7812, 7794-7813, 7795-7812, 7795-7813, 7795-7814, 7796-7811, 7796-7813, 7796-7814, 7796-7815, 7797-7812, 7797-7814, 7797-7816, 7798-7813, 7798-7815, 7798-7817, 7799-7816, 7799-7818, 7800-7819, 7801-7818, 7801-7820, 7802-7817, 7802-7819, 7802-7821, 7803-7818, 7803-7820, 7803-7822, 7804-7821, 7804-7823, 7805-7820, 7805-7822, 7805-7824, 7806-7821, 7806-7823, 7806-7825, 7807-7824, 7807-7825, 7807-7826, 7808-7825, 7808-7827, 7809-7825, 7809-7826, 7809-7828, 7810-7825, 7810-7826, 7810-7827, 7810-7829, 7811-7828, 7811-7830, 7812-7829, 7812-7830, 7812-7831, 7813-7829, 7813-7831, 7813-7832, 7814-7833, 7815-7831, 7815-7832, 7815-7833, 7815-7834, 7816-7832,

7816-7833, 7816-7834, 7816-7835, 7817-7833, 7817-7834, 7817-7835, 7817-7836, 7818-7834, 7818-7835, 7818-7836, 7818-7837, 7819-7835, 7819-7836, 7819-7837, 7819-7838, 7820-7836, 7820-7838, 7820-7839, 7821-7836, 7821-7837, 7821-7839, 7821-7840, 7822-7837, 7822-7838, 7822-7840, 7822-7841, 7823-7838, 7823-7839, 7823-7839, 7823-7840, 7823-7841, 7823-7842, 7824-7839, 7824-7840, 7824-7840, 7824-7841, 7824-7842, 7824-7843, 7825-7840, 7825-7841, 7825-7842, 7825-7843, 7825-7844, 7826-7842, 7826-7843, 7826-7844, 7826-7845, 7827-7842, 7827-7843, 7827-7844, 7827-7845, 7827-7846, 7828-7843, 7828-7844, 7828-7845, 7828-7847, 7829-7844, 7829-7845, 7829-7846, 7829-7847, 7829-7848, 7830-7845, 7830-7846, 7830-7847, 7830-7848, 7830-7849, 7831-7846, 7831-7847, 7831-7848, 7831-7849, 7831-7850, 7832-7847, 7832-7848, 7832-7849, 7832-7850, 7832-7851, 7833-7848, 7833-7849, 7833-7850, 7833-7851, 7833-7852, 7834-7849, 7834-7850, 7834-7851, 7834-7852, 7834-7853, 7835-7850, 7835-7851, 7835-7852, 7835-7853, 7835-7854, 7836-7851, 7836-7852, 7836-7853, 7836-7854, 7836-7855, 7837-7852, 7837-7853, 7837-7854, 7837-7855, 7837-7856, 7838-7853, 7838-7854, 7838-7855, 7838-7856, 7838-7857, 7839-7854, 7839-7855, 7839-7856, 7839-7857, 7839-7858, 7840-7855, 7840-7856, 7840-7857, 7840-7858, 7840-7859, 7841-7856, 7841-7857, 7841-7858, 7841-7859, 7841-7860, 7842-7857, 7842-7858, 7842-7859, 7842-7860, 7842-7861, 7843-7858, 7843-7859, 7843-7860, 7843-7861, 7843-7862, 7844-7859,

7844-7860, 7844-7861, 7844-7862, 7845-7860, 7845-7861, 7845-7862, 7846-7861 y 7846-7862.

En determinadas modalidades, un compuesto comprende o consiste en un conjugado y un oligonucleótido modificado que se dirige a la 3'UTR de un ácido nucleico de CFB. En determinados aspectos, el oligonucleótido modificado se dirige dentro de los nucleótidos 2574-2626 de un ácido nucleico de CFB que tiene la secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 1. En determinados aspectos, el oligonucleótido modificado tiene al menos una parte de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleobases contiguas complementarias a una parte de igual longitud dentro de los nucleótidos 2574-2626 de un ácido nucleico de CFB que tiene la secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 1.

En determinadas modalidades, un compuesto comprende o consiste en un conjugado y un oligonucleótido modificado que se dirige a una región de un ácido nucleico de CFB que tiene una secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 1 dentro de nucleobases 2457-2631, 2457-2472, 2457-2474, 2457-2476, 2457-2566, 2457-2570, 2457-2571, 2457-2572, 2457-2573, 2457-2574, 2457-2575, 2457-2576, 2457-2577, 2457-2578, 2457-2579, 2457-2580, 2457-2581, 2457-2582, 2457-2583, 2457-2584, 2457-2585,

2457-2586, 2457-2587, 2457-2588, 2457-2589, 2457-2590, 2457-2591, 2457-2592, 2457-2593, 2457-2594, 2457-2595, 2457-2596, 2457-2597, 2457-2598, 2457-2599, 2457-2600, 2457-2601, 2457-2602, 2457-2603, 2457-2604, 2457-2605, 2457-2606, 2457-2607, 2457-2608, 2457-2609, 2457-2610, 2457-2611, 2457-2612, 2457-2613, 2457-2614, 2457-2615, 2457-2616, 2457-2617, 2457-2618, 2457-2619, 2457-2620, 2457-2621, 2457-2622, 2457-2623, 2457-2624, 2457-2625, 2457-2626, 2457-2627, 2457-2628, 2457-2629, 2457-2630, 2457-2631, 2459-2474, 2459-2476, 2459-2566, 2459-2570, 2459-2571, 2459-2572, 2459-2573, 2459-2574, 2459-2575, 2459-2576, 2459-2577, 2459-2578, 2459-2579, 2459-2580, 2459-2581, 2459-2582, 2459-2583, 2459-2584, 2459-2585, 2459-2586, 2459-2587, 2459-2588, 2459-2589, 2459-2590, 2459-2591, 2459-2592, 2459-2593, 2459-2594, 2459-2595, 2459-2596, 2459-2597, 2459-2598, 2459-2599, 2459-2600, 2459-2601, 2459-2602, 2459-2603, 2459-2604, 2459-2605, 2459-2606, 2459-2607, 2459-2608, 2459-2609, 2459-2610, 2459-2611, 2459-2612, 2459-2613, 2459-2614, 2459-2615, 2459-2616, 2459-2617, 2459-2618, 2459-2619, 2459-2620, 2459-2621, 2459-2622, 2459-2623, 2459-2624, 2459-2625, 2459-2626, 2459-2627, 2459-2628, 2459-2629, 2459-2630, 2459-2631, 2461-2476, 2461-2566, 2461-2570, 2461-2571, 2461-2572, 2461-2573, 2461-2574, 2461-2575, 2461-2576, 2461-2577, 2461-2578, 2461-2579, 2461-2580, 2461-2581, 2461-2582, 2461-2583, 2461-2584, 2461-2585, 2461-2586, 2461-2587, 2461-2588,

2461-2589, 2461-2590, 2461-2591, 2461-2592, 2461-2593, 2461-2594, 2461-2595, 2461-2596, 2461-2597, 2461-2598, 2461-2599, 2461-2600, 2461-2601, 2461-2602, 2461-2603, 2461-2604, 2461-2605, 2461-2606, 2461-2607, 2461-2608, 2461-2609, 2461-2610, 2461-2611, 2461-2612, 2461-2613, 2461-2614, 2461-2615, 2461-2616, 2461-2617, 2461-2618, 2461-2619, 2461-2620, 2461-2621, 2461-2622, 2461-2623, 2461-2624, 2461-2625, 2461-2626, 2461-2627, 2461-2628, 2461-2629, 2461-2630, 2461-2631, 2551-2566, 2551-2570, 2551-2571, 2551-2572, 2551-2573, 2551-2574, 2551-2575, 2551-2576, 2551-2577, 2551-2578, 2551-2579, 2551-2580, 2551-2581, 2551-2582, 2551-2583, 2551-2584, 2551-2585, 2551-2586, 2551-2587, 2551-2588, 2551-2589, 2551-2590, 2551-2591, 2551-2592, 2551-2593, 2551-2594, 2551-2595, 2551-2596, 2551-2597, 2551-2598, 2551-2599, 2551-2600, 2551-2601, 2551-2602, 2551-2603, 2551-2604, 2551-2605, 2551-2606, 2551-2607, 2551-2608, 2551-2609, 2551-2610, 2551-2611, 2551-2612, 2551-2613, 2551-2614, 2551-2615, 2551-2616, 2551-2617, 2551-2618, 2551-2619, 2551-2620, 2551-2621, 2551-2622, 2551-2623, 2551-2624, 2551-2625, 2551-2626, 2551-2627, 2551-2628, 2551-2629, 2551-2630, 2551-2631, 2553-2570, 2553-2571, 2553-2572, 2553-2573, 2553-2574, 2553-2575, 2553-2576, 2553-2577, 2553-2578, 2553-2579, 2553-2580, 2553-2581, 2553-2582, 2553-2583, 2553-2584, 2553-2585, 2553-2586, 2553-2587, 2553-2588, 2553-2589, 2553-2590, 2553-2591, 2553-2592, 2553-2593, 2553-2594, 2553-2595,

2553-2596, 2553-2597, 2553-2598, 2553-2599, 2553-2600, 2553-2601, 2553-2602, 2553-2603, 2553-2604, 2553-2605, 2553-2606, 2553-2607, 2553-2608, 2553-2609, 2553-2610, 2553-2611, 2553-2612, 2553-2613, 2553-2614, 2553-2615, 2553-2616, 2553-2617, 2553-2618, 2553-2619, 2553-2620, 2553-2621, 2553-2622, 2553-2623, 2553-2624, 2553-2625, 2553-2626, 2553-2627, 2553-2628, 2553-2629, 2553-2630, 2553-2631, 2554-2573, 2554-2574, 2554-2575, 2554-2576, 2554-2577, 2554-2578, 2554-2579, 2554-2580, 2554-2581, 2554-2582, 2554-2583, 2554-2584, 2554-2585, 2554-2586, 2554-2587, 2554-2588, 2554-2589, 2554-2590, 2554-2591, 2554-2592, 2554-2593, 2554-2594, 2554-2595, 2554-2596, 2554-2597, 2554-2598, 2554-2599, 2554-2600, 2554-2601, 2554-2602, 2554-2603, 2554-2604, 2554-2605, 2554-2606, 2554-2607, 2554-2608, 2554-2609, 2554-2610, 2554-2611, 2554-2612, 2554-2613, 2554-2614, 2554-2615, 2554-2616, 2554-2617, 2554-2618, 2554-2619, 2554-2620, 2554-2621, 2554-2622, 2554-2623, 2554-2624, 2554-2625, 2554-2626, 2554-2627, 2554-2628, 2554-2629, 2554-2630, 2554-2631, 2555-2572, 2555-2573, 2555-2574, 2555-2575, 2555-2576, 2555-2577, 2555-2578, 2555-2579, 2555-2580, 2555-2581, 2555-2582, 2555-2583, 2555-2584, 2555-2585, 2555-2586, 2555-2587, 2555-2588, 2555-2589, 2555-2590, 2555-2591, 2555-2592, 2555-2593, 2555-2594, 2555-2595, 2555-2596, 2555-2597, 2555-2598, 2555-2599, 2555-2600, 2555-2601, 2555-2602, 2555-2603, 2555-2604, 2555-2605, 2555-2606, 2555-2607, 2555-2608,

2555-2609, 2555-2610, 2555-2611, 2555-2612, 2555-2613, 2555-2614, 2555-2615, 2555-2616, 2555-2617, 2555-2618, 2555-2619, 2555-2620, 2555-2621, 2555-2622, 2555-2623, 2555-2624, 2555-2625, 2555-2626, 2555-2627, 2555-2628, 2555-2629, 2555-2630, 2555-2631, 2556-2573, 2556-2574, 2556-2575, 2556-2576, 2556-2577, 2556-2578, 2556-2579, 2556-2580, 2556-2581, 2556-2582, 2556-2583, 2556-2584, 2556-2585, 2556-2586, 2556-2587, 2556-2588, 2556-2589, 2556-2590, 2556-2591, 2556-2592, 2556-2593, 2556-2594, 2556-2595, 2556-2596, 2556-2597, 2556-2598, 2556-2599, 2556-2600, 2556-2601, 2556-2602, 2556-2603, 2556-2604, 2556-2605, 2556-2606, 2556-2607, 2556-2608, 2556-2609, 2556-2610, 2556-2611, 2556-2612, 2556-2613, 2556-2614, 2556-2615, 2556-2616, 2556-2617, 2556-2618, 2556-2619, 2556-2620, 2556-2621, 2556-2622, 2556-2623, 2556-2624, 2556-2625, 2556-2626, 2556-2627, 2556-2628, 2556-2629, 2556-2630, 2556-2631, 2557-2574, 2557-2575, 2557-2576, 2557-2577, 2557-2578, 2557-2579, 2557-2580, 2557-2581, 2557-2582, 2557-2583, 2557-2584, 2557-2585, 2557-2586, 2557-2587, 2557-2588, 2557-2589, 2557-2590, 2557-2591, 2557-2592, 2557-2593, 2557-2594, 2557-2595, 2557-2596, 2557-2597, 2557-2598, 2557-2599, 2557-2600, 2557-2601, 2557-2602, 2557-2603, 2557-2604, 2557-2605, 2557-2606, 2557-2607, 2557-2608, 2557-2609, 2557-2610, 2557-2611, 2557-2612, 2557-2613, 2557-2614, 2557-2615, 2557-2616, 2557-2617, 2557-2618, 2557-2619, 2557-2620, 2557-2621, 2557-2622, 2557-2623,

2557-2624, 2557-2625, 2557-2626, 2557-2627, 2557-2628, 2557-2629, 2557-2630, 2557-2631, 2558-2575, 2558-2576, 2558-2577, 2558-2578, 2558-2579, 2558-2580, 2558-2581, 2558-2582, 2558-2583, 2558-2584, 2558-2585, 2558-2586, 2558-2587, 2558-2588, 2558-2589, 2558-2590, 2558-2591, 2558-2592, 2558-2593, 2558-2594, 2558-2595, 2558-2596, 2558-2597, 2558-2598, 2558-2599, 2558-2600, 2558-2601, 2558-2602, 2558-2603, 2558-2604, 2558-2605, 2558-2606, 2558-2607, 2558-2608, 2558-2609, 2558-2610, 2558-2611, 2558-2612, 2558-2613, 2558-2614, 2558-2615, 2558-2616, 2558-2617, 2558-2618, 2558-2619, 2558-2620, 2558-2621, 2558-2622, 2558-2623, 2558-2624, 2558-2625, 2558-2626, 2558-2627, 2558-2628, 2558-2629, 2558-2630, 2558-2631, 2559-2576, 2559-2577, 2559-2578, 2559-2579, 2559-2580, 2559-2581, 2559-2582, 2559-2583, 2559-2584, 2559-2585, 2559-2586, 2559-2587, 2559-2588, 2559-2589, 2559-2590, 2559-2591, 2559-2592, 2559-2593, 2559-2594, 2559-2595, 2559-2596, 2559-2597, 2559-2598, 2559-2599, 2559-2600, 2559-2601, 2559-2602, 2559-2603, 2559-2604, 2559-2605, 2559-2606, 2559-2607, 2559-2608, 2559-2609, 2559-2610, 2559-2611, 2559-2612, 2559-2613, 2559-2614, 2559-2615, 2559-2616, 2559-2617, 2559-2618, 2559-2619, 2559-2620, 2559-2621, 2559-2622, 2559-2623, 2559-2624, 2559-2625, 2559-2626, 2559-2627, 2559-2628, 2559-2629, 2559-2630, 2559-2631, 2560-2577, 2560-2578, 2560-2579, 2560-2580, 2560-2581, 2560-2582, 2560-2583, 2560-2584, 2560-2585, 2560-2586, 2560-2587,

2560-2588, 2560-2589, 2560-2590, 2560-2591, 2560-2592, 2560-2593, 2560-2594, 2560-2595, 2560-2596, 2560-2597, 2560-2598, 2560-2599, 2560-2600, 2560-2601, 2560-2602, 2560-2603, 2560-2604, 2560-2605, 2560-2606, 2560-2607, 2560-2608, 2560-2609, 2560-2610, 2560-2611, 2560-2612, 2560-2613, 2560-2614, 2560-2615, 2560-2616, 2560-2617, 2560-2618, 2560-2619, 2560-2620, 2560-2621, 2560-2622, 2560-2623, 2560-2624, 2560-2625, 2560-2626, 2560-2627, 2560-2628, 2560-2629, 2560-2630, 2560-2631, 2561-2578, 2561-2579, 2561-2580, 2561-2581, 2561-2582, 2561-2583, 2561-2584, 2561-2585, 2561-2586, 2561-2587, 2561-2588, 2561-2589, 2561-2590, 2561-2591, 2561-2592, 2561-2593, 2561-2594, 2561-2595, 2561-2596, 2561-2597, 2561-2598, 2561-2599, 2561-2600, 2561-2601, 2561-2602, 2561-2603, 2561-2604, 2561-2605, 2561-2606, 2561-2607, 2561-2608, 2561-2609, 2561-2610, 2561-2611, 2561-2612, 2561-2613, 2561-2614, 2561-2615, 2561-2616, 2561-2617, 2561-2618, 2561-2619, 2561-2620, 2561-2621, 2561-2622, 2561-2623, 2561-2624, 2561-2625, 2561-2626, 2561-2627, 2561-2628, 2561-2629, 2561-2630, 2561-2631, 2562-2577, 2562-2578, 2562-2579, 2562-2580, 2562-2581, 2562-2582, 2562-2583, 2562-2584, 2562-2585, 2562-2586, 2562-2587, 2562-2588, 2562-2589, 2562-2590, 2562-2591, 2562-2592, 2562-2593, 2562-2594, 2562-2595, 2562-2596, 2562-2597, 2562-2598, 2562-2599, 2562-2600, 2562-2601, 2562-2602, 2562-2603, 2562-2604, 2562-2605, 2562-2606, 2562-2607, 2562-2608, 2562-2609, 2562-2610,

2562-2611, 2562-2612, 2562-2613, 2562-2614, 2562-2615, 2562-2616, 2562-2617, 2562-2618, 2562-2619, 2562-2620, 2562-2621, 2562-2622, 2562-2623, 2562-2624, 2562-2625, 2562-2626, 2562-2627, 2562-2628, 2562-2629, 2562-2630, 2562-2631, 2563-2580, 2563-2581, 2563-2582, 2563-2583, 2563-2584, 2563-2585, 2563-2586, 2563-2587, 2563-2588, 2563-2589, 2563-2590, 2563-2591, 2563-2592, 2563-2593, 2563-2594, 2563-2595, 2563-2596, 2563-2597, 2563-2598, 2563-2599, 2563-2600, 2563-2601, 2563-2602, 2563-2603, 2563-2604, 2563-2605, 2563-2606, 2563-2607, 2563-2608, 2563-2609, 2563-2610, 2563-2611, 2563-2612, 2563-2613, 2563-2614, 2563-2615, 2563-2616, 2563-2617, 2563-2618, 2563-2619, 2563-2620, 2563-2621, 2563-2622, 2563-2623, 2563-2624, 2563-2625, 2563-2626, 2563-2627, 2563-2628, 2563-2629, 2563-2630, 2563-2631, 2564-2581, 2564-2582, 2564-2583, 2564-2584, 2564-2585, 2564-2586, 2564-2587, 2564-2588, 2564-2589, 2564-2590, 2564-2591, 2564-2592, 2564-2593, 2564-2594, 2564-2595, 2564-2596, 2564-2597, 2564-2598, 2564-2599, 2564-2600, 2564-2601, 2564-2602, 2564-2603, 2564-2604, 2564-2605, 2564-2606, 2564-2607, 2564-2608, 2564-2609, 2564-2610, 2564-2611, 2564-2612, 2564-2613, 2564-2614, 2564-2615, 2564-2616, 2564-2617, 2564-2618, 2564-2619, 2564-2620, 2564-2621, 2564-2622, 2564-2623, 2564-2624, 2564-2625, 2564-2626, 2564-2627, 2564-2628, 2564-2629, 2564-2630, 2564-2631, 2565-2584, 2565-2585, 2565-2586, 2565-2587, 2565-2588, 2565-2589, 2565-2590, 2565-2591,

2565-2592, 2565-2593, 2565-2594, 2565-2595, 2565-2596, 2565-2597, 2565-2598, 2565-2599, 2565-2600, 2565-2601, 2565-2602, 2565-2603, 2565-2604, 2565-2605, 2565-2606, 2565-2607, 2565-2608, 2565-2609, 2565-2610, 2565-2611, 2565-2612, 2565-2613, 2565-2614, 2565-2615, 2565-2616, 2565-2617, 2565-2618, 2565-2619, 2565-2620, 2565-2621, 2565-2622, 2565-2623, 2565-2624, 2565-2625, 2565-2626, 2565-2627, 2565-2628, 2565-2629, 2565-2630, 2565-2631, 2566-2583, 2566-2584, 2566-2585, 2566-2586, 2566-2587, 2566-2588, 2566-2589, 2566-2590, 2566-2591, 2566-2592, 2566-2593, 2566-2594, 2566-2595, 2566-2596, 2566-2597, 2566-2598, 2566-2599, 2566-2600, 2566-2601, 2566-2602, 2566-2603, 2566-2604, 2566-2605, 2566-2606, 2566-2607, 2566-2608, 2566-2609, 2566-2610, 2566-2611, 2566-2612, 2566-2613, 2566-2614, 2566-2615, 2566-2616, 2566-2617, 2566-2618, 2566-2619, 2566-2620, 2566-2621, 2566-2622, 2566-2623, 2566-2624, 2566-2625, 2566-2626, 2566-2627, 2566-2628, 2566-2629, 2566-2630, 2566-2631, 2567-2584, 2567-2585, 2567-2586, 2567-2587, 2567-2588, 2567-2589, 2567-2590, 2567-2591, 2567-2592, 2567-2593, 2567-2594, 2567-2595, 2567-2596, 2567-2597, 2567-2598, 2567-2599, 2567-2600, 2567-2601, 2567-2602, 2567-2603, 2567-2604, 2567-2605, 2567-2606, 2567-2607, 2567-2608, 2567-2609, 2567-2610, 2567-2611, 2567-2612, 2567-2613, 2567-2614, 2567-2615, 2567-2616, 2567-2617, 2567-2618, 2567-2619, 2567-2620, 2567-2621, 2567-2622, 2567-2623, 2567-2624, 2567-2625, 2567-2626,

2567-2627, 2567-2628, 2567-2629, 2567-2630, 2567-2631, 2568-2585, 2568-2586, 2568-2587, 2568-2588, 2568-2589, 2568-2590, 2568-2591, 2568-2592, 2568-2593, 2568-2594, 2568-2595, 2568-2596, 2568-2597, 2568-2598, 2568-2599, 2568-2600, 2568-2601, 2568-2602, 2568-2603, 2568-2604, 2568-2605, 2568-2606, 2568-2607, 2568-2608, 2568-2609, 2568-2610, 2568-2611, 2568-2612, 2568-2613, 2568-2614, 2568-2615, 2568-2616, 2568-2617, 2568-2618, 2568-2619, 2568-2620, 2568-2621, 2568-2622, 2568-2623, 2568-2624, 2568-2625, 2568-2626, 2568-2627, 2568-2628, 2568-2629, 2568-2630, 2568-2631, 2569-2586, 2569-2587, 2569-2588, 2569-2589, 2569-2590, 2569-2591, 2569-2592, 2569-2593, 2569-2594, 2569-2595, 2569-2596, 2569-2597, 2569-2598, 2569-2599, 2569-2600, 2569-2601, 2569-2602, 2569-2603, 2569-2604, 2569-2605, 2569-2606, 2569-2607, 2569-2608, 2569-2609, 2569-2610, 2569-2611, 2569-2612, 2569-2613, 2569-2614, 2569-2615, 2569-2616, 2569-2617, 2569-2618, 2569-2619, 2569-2620, 2569-2621, 2569-2622, 2569-2623, 2569-2624, 2569-2625, 2569-2626, 2569-2627, 2569-2628, 2569-2629, 2569-2630, 2569-2631, 2569-2586, 2569-2587, 2569-2588, 2569-2589, 2569-2590, 2569-2591, 2569-2592, 2569-2593, 2569-2594, 2569-2595, 2569-2596, 2569-2597, 2569-2598, 2569-2599, 2569-2600, 2569-2601, 2569-2602, 2569-2603, 2569-2604, 2569-2605, 2569-2606, 2569-2607, 2569-2608, 2569-2609, 2569-2610, 2569-2611, 2569-2612, 2569-2613, 2569-2614, 2569-2615, 2569-2616, 2569-2617, 2569-2618, 2569-2619,

2569-2620, 2569-2621, 2569-2622, 2569-2623, 2569-2624, 2569-2625, 2569-2626, 2569-2627, 2569-2628, 2569-2629, 2569-2630, 2569-2631, 2571-2588, 2571-2589, 2571-2590, 2571-2591, 2571-2592, 2571-2593, 2571-2594, 2571-2595, 2571-2596, 2571-2597, 2571-2598, 2571-2599, 2571-2600, 2571-2601, 2571-2602, 2571-2603, 2571-2604, 2571-2605, 2571-2606, 2571-2607, 2571-2608, 2571-2609, 2571-2610, 2571-2611, 2571-2612, 2571-2613, 2571-2614, 2571-2615, 2571-2616, 2571-2617, 2571-2618, 2571-2619, 2571-2620, 2571-2621, 2571-2622, 2571-2623, 2571-2624, 2571-2625, 2571-2626, 2571-2627, 2571-2628, 2571-2629, 2571-2630, 2571-2631, 2572-2589, 2572-2590, 2572-2591, 2572-2592, 2572-2593, 2572-2594, 2572-2595, 2572-2596, 2572-2597, 2572-2598, 2572-2599, 2572-2600, 2572-2601, 2572-2602, 2572-2603, 2572-2604, 2572-2605, 2572-2606, 2572-2607, 2572-2608, 2572-2609, 2572-2610, 2572-2611, 2572-2612, 2572-2613, 2572-2614, 2572-2615, 2572-2616, 2572-2617, 2572-2618, 2572-2619, 2572-2620, 2572-2621, 2572-2622, 2572-2623, 2572-2624, 2572-2625, 2572-2626, 2572-2627, 2572-2628, 2572-2629, 2572-2630, 2572-2631, 2573-2590, 2573-2591, 2573-2592, 2573-2593, 2573-2594, 2573-2595, 2573-2596, 2573-2597, 2573-2598, 2573-2599, 2573-2600, 2573-2601, 2573-2602, 2573-2603, 2573-2604, 2573-2605, 2573-2606, 2573-2607, 2573-2608, 2573-2609, 2573-2610, 2573-2611, 2573-2612, 2573-2613, 2573-2614, 2573-2615, 2573-2616, 2573-2617, 2573-2618, 2573-2619, 2573-2620, 2573-2621, 2573-2622,

2573-2623, 2573-2624, 2573-2625, 2573-2626, 2573-2627, 2573-2628, 2573-2629, 2573-2630, 2573-2631, 2574-2591, 2574-2592, 2574-2593, 2574-2594, 2574-2595, 2574-2596, 2574-2597, 2574-2598, 2574-2599, 2574-2600, 2574-2601, 2574-2602, 2574-2603, 2574-2604, 2574-2605, 2574-2606, 2574-2607, 2574-2608, 2574-2609, 2574-2610, 2574-2611, 2574-2612, 2574-2613, 2574-2614, 2574-2615, 2574-2616, 2574-2617, 2574-2618, 2574-2619, 2574-2620, 2574-2621, 2574-2622, 2574-2623, 2574-2624, 2574-2625, 2574-2626, 2574-2627, 2574-2628, 2574-2629, 2574-2630, 2574-2631, 2575-2592, 2575-2593, 2575-2594, 2575-2595, 2575-2596, 2575-2597, 2575-2598, 2575-2599, 2575-2600, 2575-2601, 2575-2602, 2575-2603, 2575-2604, 2575-2605, 2575-2606, 2575-2607, 2575-2608, 2575-2609, 2575-2610, 2575-2611, 2575-2612, 2575-2613, 2575-2614, 2575-2615, 2575-2616, 2575-2617, 2575-2618, 2575-2619, 2575-2620, 2575-2621, 2575-2622, 2575-2623, 2575-2624, 2575-2625, 2575-2626, 2575-2627, 2575-2628, 2575-2629, 2575-2630, 2575-2631, 2576-2593, 2576-2594, 2576-2595, 2576-2596, 2576-2597, 2576-2598, 2576-2599, 2576-2600, 2576-2601, 2576-2602, 2576-2603, 2576-2604, 2576-2605, 2576-2606, 2576-2607, 2576-2608, 2576-2609, 2576-2610, 2576-2611, 2576-2612, 2576-2613, 2576-2614, 2576-2615, 2576-2616, 2576-2617, 2576-2618, 2576-2619, 2576-2620, 2576-2621, 2576-2622, 2576-2623, 2576-2624, 2576-2625, 2576-2626, 2576-2627, 2576-2628, 2576-2629, 2576-2630, 2576-2631, 2577-2594, 2577-2595, 2577-2596,

2577-2597, 2577-2598, 2577-2599, 2577-2600, 2577-2601, 2577-2602, 2577-2603, 2577-2604, 2577-2605, 2577-2606, 2577-2607, 2577-2608, 2577-2609, 2577-2610, 2577-2611, 2577-2612, 2577-2613, 2577-2614, 2577-2615, 2577-2616, 2577-2617, 2577-2618, 2577-2619, 2577-2620, 2577-2621, 2577-2622, 2577-2623, 2577-2624, 2577-2625, 2577-2626, 2577-2627, 2577-2628, 2577-2629, 2577-2630, 2577-2631, 2578-2597, 2578-2598, 2578-2599, 2578-2600, 2578-2601, 2578-2602, 2578-2603, 2578-2604, 2578-2605, 2578-2606, 2578-2607, 2578-2608, 2578-2609, 2578-2610, 2578-2611, 2578-2612, 2578-2613, 2578-2614, 2578-2615, 2578-2616, 2578-2617, 2578-2618, 2578-2619, 2578-2620, 2578-2621, 2578-2622, 2578-2623, 2578-2624, 2578-2625, 2578-2626, 2578-2627, 2578-2628, 2578-2629, 2578-2630, 2578-2631, 2579-2598, 2579-2599, 2579-2600, 2579-2601, 2579-2602, 2579-2603, 2579-2604, 2579-2605, 2579-2606, 2579-2607, 2579-2608, 2579-2609, 2579-2610, 2579-2611, 2579-2612, 2579-2613, 2579-2614, 2579-2615, 2579-2616, 2579-2617, 2579-2618, 2579-2619, 2579-2620, 2579-2621, 2579-2622, 2579-2623, 2579-2624, 2579-2625, 2579-2626, 2579-2627, 2579-2628, 2579-2629, 2579-2630, 2579-2631, 2580-2598, 2580-2599, 2580-2600, 2580-2601, 2580-2602, 2580-2603, 2580-2604, 2580-2605, 2580-2606, 2580-2607, 2580-2608, 2580-2609, 2580-2610, 2580-2611, 2580-2612, 2580-2613, 2580-2614, 2580-2615, 2580-2616, 2580-2617, 2580-2618, 2580-2619, 2580-2620, 2580-2621, 2580-2622, 2580-2623, 2580-2624, 2580-2625,

2580-2626, 2580-2627, 2580-2628, 2580-2629, 2580-2630, 2580-2631, 2581-2597, 2581-2598, 2581-2599, 2581-2600, 2581-2601, 2581-2602, 2581-2603, 2581-2604, 2581-2605, 2581-2606, 2581-2607, 2581-2608, 2581-2609, 2581-2610, 2581-2611, 2581-2612, 2581-2613, 2581-2614, 2581-2615, 2581-2616, 2581-2617, 2581-2618, 2581-2619, 2581-2620, 2581-2621, 2581-2622, 2581-2623, 2581-2624, 2581-2625, 2581-2626, 2581-2627, 2581-2628, 2581-2629, 2581-2630, 2581-2631, 2582-2600, 2582-2601, 2582-2602, 2582-2603, 2582-2604, 2582-2605, 2582-2606, 2582-2607, 2582-2608, 2582-2609, 2582-2610, 2582-2611, 2582-2612, 2582-2613, 2582-2614, 2582-2615, 2582-2616, 2582-2617, 2582-2618, 2582-2619, 2582-2620, 2582-2621, 2582-2622, 2582-2623, 2582-2624, 2582-2625, 2582-2626, 2582-2627, 2582-2628, 2582-2629, 2582-2630, 2582-2631, 2583-2601, 2583-2602, 2583-2603, 2583-2604, 2583-2605, 2583-2606, 2583-2607, 2583-2608, 2583-2609, 2583-2610, 2583-2611, 2583-2612, 2583-2613, 2583-2614, 2583-2615, 2583-2616, 2583-2617, 2583-2618, 2583-2619, 2583-2620, 2583-2621, 2583-2622, 2583-2623, 2583-2624, 2583-2625, 2583-2626, 2583-2627, 2583-2628, 2583-2629, 2583-2630, 2583-2631, 2585-2603, 2585-2604, 2585-2605, 2585-2606, 2585-2607, 2585-2608, 2585-2609, 2585-2610, 2585-2611, 2585-2612, 2585-2613, 2585-2614, 2585-2615, 2585-2616, 2585-2617, 2585-2618, 2585-2619, 2585-2620, 2585-2621, 2585-2622, 2585-2623, 2585-2624, 2585-2625, 2585-2626, 2585-2627, 2585-2628, 2585-2629, 2585-2630,

2585-2631, 2586-2604, 2586-2605, 2586-2606, 2586-2607, 2586-2608, 2586-2609, 2586-2610, 2586-2611, 2586-2612, 2586-2613, 2586-2614, 2586-2615, 2586-2616, 2586-2617, 2586-2618, 2586-2619, 2586-2620, 2586-2621, 2586-2622, 2586-2623, 2586-2624, 2586-2625, 2586-2626, 2586-2627, 2586-2628, 2586-2629, 2586-2630, 2586-2631, 2587-2605, 2587-2606, 2587-2607, 2587-2608, 2587-2609, 2587-2610, 2587-2611, 2587-2612, 2587-2613, 2587-2614, 2587-2615, 2587-2616, 2587-2617, 2587-2618, 2587-2619, 2587-2620, 2587-2621, 2587-2622, 2587-2623, 2587-2624, 2587-2625, 2587-2626, 2587-2627, 2587-2628, 2587-2629, 2587-2630, 2587-2631, 2588-2606, 2588-2607, 2588-2608, 2588-2609, 2588-2610, 2588-2611, 2588-2612, 2588-2613, 2588-2614, 2588-2615, 2588-2616, 2588-2617, 2588-2618, 2588-2619, 2588-2620, 2588-2621, 2588-2622, 2588-2623, 2588-2624, 2588-2625, 2588-2626, 2588-2627, 2588-2628, 2588-2629, 2588-2630, 2588-2631, 2589-2607, 2589-2608, 2589-2609, 2589-2610, 2589-2611, 2589-2612, 2589-2613, 2589-2614, 2589-2615, 2589-2616, 2589-2617, 2589-2618, 2589-2619, 2589-2620, 2589-2621, 2589-2622, 2589-2623, 2589-2624, 2589-2625, 2589-2626, 2589-2627, 2589-2628, 2589-2629, 2589-2630, 2589-2631, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2608, 2590-2609, 2590-2610, 2590-2611, 2590-2612, 2590-2613, 2590-2614, 2590-2615, 2590-2616, 2590-2617, 2590-2618, 2590-2619, 2590-2620, 2590-2621, 2590-2622, 2590-2623, 2590-2624, 2590-2625, 2590-2626, 2590-2627, 2590-2628, 2590-2629, 2590-2630,

2590-2631, 2591-2610, 2591-2611, 2591-2612, 2591-2613, 2591-2614, 2591-2615, 2591-2616, 2591-2617, 2591-2618, 2591-2619, 2591-2620, 2591-2621, 2591-2622, 2591-2623, 2591-2624, 2591-2625, 2591-2626, 2591-2627, 2591-2628, 2591-2629, 2591-2630, 2591-2631, 2592-2611, 2592-2612, 2592-2613, 2592-2614, 2592-2615, 2592-2616, 2592-2617, 2592-2618, 2592-2619, 2592-2620, 2592-2621, 2592-2622, 2592-2623, 2592-2624, 2592-2625, 2592-2626, 2592-2627, 2592-2628, 2592-2629, 2592-2630, 2592-2631, 2593-2608, 2593-2612, 2593-2613, 2593-2614, 2593-2615, 2593-2616, 2593-2617, 2593-2618, 2593-2619, 2593-2620, 2593-2621, 2593-2622, 2593-2623, 2593-2624, 2593-2625, 2593-2626, 2593-2627, 2593-2628, 2593-2629, 2593-2630, 2593-2631, 2594-2612, 2594-2613, 2594-2614, 2594-2615, 2594-2616, 2594-2617, 2594-2618, 2594-2619, 2594-2620, 2594-2621, 2594-2622, 2594-2623, 2594-2624, 2594-2625, 2594-2626, 2594-2627, 2594-2628, 2594-2629, 2594-2630, 2594-2631, 2595-2611, 2595-2612, 2595-2613, 2595-2614, 2595-2615, 2595-2616, 2595-2617, 2595-2618, 2595-2619, 2595-2620, 2595-2621, 2595-2622, 2595-2623, 2595-2624, 2595-2625, 2595-2626, 2595-2627, 2595-2628, 2595-2629, 2595-2630, 2595-2631, 2596-2614, 2596-2615, 2596-2616, 2596-2617, 2596-2618, 2596-2619, 2596-2620, 2596-2621, 2596-2622, 2596-2623, 2596-2624, 2596-2625, 2596-2626, 2596-2627, 2596-2628, 2596-2629, 2596-2630, 2596-2631, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-2616, 2597-2617, 2597-2618, 2597-2619,

2597-2620, 2597-2621, 2597-2622, 2597-2623, 2597-2624, 2597-2625, 2597-2626, 2597-2627, 2597-2628, 2597-2629, 2597-2630, 2597-2631, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2598-2618, 2598-2619, 2598-2620, 2598-2621, 2598-2622, 2598-2623, 2598-2624, 2598-2625, 2598-2626, 2598-2627, 2598-2628, 2598-2629, 2598-2630, 2598-2631, 2599-2614, 2599-2615, 2599-2616, 2599-2617, 2599-2618, 2599-2619, 2599-2620, 2599-2621, 2599-2622, 2599-2623, 2599-2624, 2599-2625, 2599-2626, 2599-2627, 2599-2628, 2599-2629, 2599-2630, 2599-2631, 2600-2615, 2600-2616, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2600-2620, 2600-2621, 2600-2622, 2600-2623, 2600-2624, 2600-2625, 2600-2626, 2600-2627, 2600-2628, 2600-2629, 2600-2630, 2600-2631, 2601-2616, 2601-2617, 2601-2618, 2601-2619, 2601-2620, 2601-2621, 2601-2622, 2601-2623, 2601-2624, 2601-2625, 2601-2626, 2601-2627, 2601-2628, 2601-2629, 2601-2630, 2601-2631, 2602-2618, 2602-2619, 2602-2620, 2602-2621, 2602-2622, 2602-2623, 2602-2624, 2602-2625, 2602-2626, 2602-2627, 2602-2628, 2602-2629, 2602-2630, 2602-2631, 2603-2620, 2603-2621, 2603-2622, 2603-2623, 2603-2624, 2603-2625, 2603-2626, 2603-2627, 2603-2628, 2603-2629, 2603-2630, 2603-2631, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2604-2624, 2604-2625, 2604-2626, 2604-2627, 2604-2628, 2604-2629, 2604-2630, 2604-2631, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2605-2625, 2605-2626, 2605-2627, 2605-2628, 2605-2629, 2605-2630,

2605-2631, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2606-2626, 2606-2627, 2606-2628, 2606-2629, 2606-2630, 2606-2631, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2607-2627, 2607-2628, 2607-2629, 2607-2630, 2607-2631, 2608-2623, 2608-2624, 2608-2625, 2608-2626, 2608-2627, 2608-2628, 2608-2629, 2608-2630, 2608-2631, 2609-2624, 2609-2625, 2609-2626, 2609-2627, 2609-2628, 2609-2629, 2609-2630, 2609-2631, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2627, 2610-2628, 2610-2629, 2610-2630, 2610-2631, 2611-2626, 2611-2627, 2611-2628, 2611-2629, 2611-2630, 2611-2631, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2629, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2630, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630, 2615-2631, o 2616-2631. En determinados aspectos, los compuestos antisenido u oligonucleótidos se dirigen a al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleobases contiguas dentro de las regiones de nucleobase mencionadas anteriormente.

En determinadas modalidades, las siguientes regiones de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, cuando los compuestos u oligonucleótidos antisentido se dirigen a ellas, demuestran una inhibición de al menos un 50 %:30-49, 48-63, 150-169, 151-170, 152-171, 154-169, 154-173, 156-171, 156-175, 157-176, 158-173, 158-177, 480-499, 600-619, 638-657, 644-663, 738-757, 1089-1108, 1135-1154, 1141-1160, 1147-1166, 1150-

1169, 1153-1172, 1159-1178, 1162-1181, 1165-1184, 1171-1186, 1171-1190, 1173-1188, 1173-1192, 1175-1190, 1175-1194, 1177-1196, 1183-1202, 1208-1227, 1235-1254, 1298-1317, 1304-1323, 1310-1329, 1316-1335, 1319-1338, 1322-1341, 1328-1347, 1349-1368, 1355-1374, 1393-1412, 1396-1415, 1399-1418, 1405-1424, 1421-1440, 1621-1640, 1646-1665, 1646-1665, 1647-1666, 1689-1708, 1749-1768, 1763-1782, 1912-1931, 2073-2092, 2085-2104, 2166-2185, 2172-2191, 2189-2208, 2191-2210, 2193-2212, 2195-2210, 2195-2214, 2196-2215, 2197-2212, 2197-2216, 2202-2221, 2223-2238, 2223-2242, 2225-2240, 2226-2245, 2227-2242, 2227-2246, 2238-2257, 2241-2260, 2267-2286, 2361-2380, 2388-2407, 2397-2416, 2448-2467, 2453-2472, 2455-2474, 2457-2472, 2457-2476, 2459-2474, 2459-2478, 2461-2476, 2461-2480, 2532-2551, 2550-2569, 2551-2566, 2551-2570, 2552-2568, 2552-2570, 2552-2571, 2553-2568, 2553-2570, 2553-2571, 2553-2572, 2554-2571, 2554-2572, 2554-2573, 2555-2570, 2555-2572, 2555-2574, 2556-2573, 2556-2574, 2556-2575, 2557-2573, 2557-2574, 2557-2575, 2557-2576, 2558-2575, 2558-2576, 2558-2577, 2559-2576, 2559-2577, 2559-2578, 2560-2577, 2560-2578, 2560-2579, 2561-2576, 2561-2578, 2561-2579, 2561-2580, 2562-2577, 2562-2579, 2562-2581, 2563-2578, 2563-2580, 2563-2582, 2564-2581, 2564-2583, 2565-2584, 2566-2583, 2566-2585, 2567-2582, 2567-2584, 2567-2586, 2568-2583, 2568-2585, 2568-2587, 2569-2586, 2569-2588, 2570-2585, 2570-2587, 2570-2589, 2571-2586, 2571-2588, 2571-

2590, 2572-2589, 2572-2590, 2572-2591, 2573-2590, 2573-2592, 2574-2590, 2574-2591, 2574-2593, 2575-2590, 2575-2591, 2575-2592, 2575-2594, 2576-2593, 2576-2595, 2577-2594, 2577-2595, 2577-2596, 2578-2594, 2578-2596, 2578-2597, 2579-2598, 2580-2596, 2580-2597, 2580-2598, 2580-2599, 2581-2597, 2581-2598, 2581-2599, 2581-2600, 2582-2598, 2582-2599, 2582-2600, 2582-2601, 2583-2599, 2583-2600, 2583-2601, 2583-2602, 2584-2600, 2584-2601, 2584-2602, 2584-2603, 2585-2601, 2585-2603, 2585-2604, 2586-2601, 2586-2602, 2586-2604, 2586-2605, 2587-2602, 2587-2603, 2587-2605, 2587-2606, 2588-2603, 2588-2604, 2588-2605, 2588-2606, 2588-2607, 2589-2604, 2589-2605, 2589-2606, 2589-2607, 2589-2608, 2590-2605, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2608, 2590-2609, 2590-2609, 2591-2607, 2591-2608, 2591-2609, 2591-2610, 2592-2607, 2592-2608, 2592-2609, 2592-2610, 2592-2611, 2593-2608, 2593-2609, 2593-2610, 2593-2612, 2594-2609, 2594-2610, 2594-2611, 2594-2612, 2594-2613, 2595-2610, 2595-2611, 2595-2612, 2595-2613, 2595-2614, 2596-2611, 2596-2612, 2596-2613, 2596-2614, 2596-2615, 2597-2612, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-2616, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2599-2614, 2599-2615, 2599-2616, 2599-2617, 2599-2618, 2600-2615, 2600-2616, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2601-2616, 2601-2617, 2601-2618, 2601-2619, 2601-2620, 2602-2617, 2602-2618, 2602-2619, 2602-2620, 2602-2621, 2603-2618, 2603-2619, 2603-2620, 2603-2621, 2603-

2622, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2608-2623, 2608-2624, 2608-2625, 2608-2626, 2608-2627, 2609-2624, 2609-2625, 2609-2626, 2609-2627, 2609-2628, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2627, 2610-2628, 2610-2629, 2611-2626, 2611-2627, 2611-2628, 2611-2629, 2611-2630, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2629, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2630, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630, 2615-2631, y 2616-2631.

En determinadas modalidades, las siguientes regiones de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, cuando los compuestos u oligonucleótidos antisentido se dirigen a ellas, demuestran una inhibición de al menos un 50 %:1608-1627, 1685-1704, 1686-1705, 1751-1770, 1769-1784, 1871-1890, 1872-1891, 1873-1892, 1875-1890, 1875-1894, 1877-1892, 1877-1896, 1878-1897, 1879-1894, 1879-1898, 2288-2307, 2808-2827, 2846-2865, 2852-2871, 2946-2965, 3773-3792, 3819-3838, 3825-3844, 3831-3850, 3834-3853, 3837-3856, 3843-3862, 4151-4166, 4151-4170, 4153-4172, 4159-4178, 4184-4203, 4211-4230, 4609-4628, 4612-4631, 4615-4634, 4621-4640, 4642-4661, 4648-4667, 4686-4705, 4689-4708, 4692-4711, 4698-4717, 4714-4733, 5270-5289, 5295-5314,

5296-5315, 5830-5849, 5890-5909, 5904-5923, 6406-6425, 6662-6681, 6674-6693, 6954-6973, 6960-6979, 6977-6996, 6979-6998, 6981-7000, 6983-6998, 6983-7002, 6984-7003, 6985-7000, 6985-7004, 6990-7009, 7122-7141, 7125-7144, 7151-7170, 7353-7372, 7362-7381, 7683-7702, 7688-7707, 7690-7709, 7692-7707, 7692-7711, 7694-7709, 7694-7713, 7696-7711, 7696-7715, 7767-7786, 7785-7804, 7786-7801, 7787-7803, 7787-7805, 7787-7806, 7788-7803, 7788-7805, 7788-7806, 7788-7807, 7789-7806, 7789-7807, 7789-7808, 7790-7805, 7790-7807, 7790-7809, 7791-7808, 7791-7809, 7791-7810, 7792-7808, 7792-7809, 7792-7810, 7792-7811, 7793-7810, 7793-7811, 7793-7812, 7794-7811, 7794-7812, 7794-7813, 7795-7812, 7795-7813, 7795-7814, 7796-7811, 7796-7813, 7796-7814, 7796-7815, 7797-7812, 7797-7814, 7797-7816, 7798-7813, 7798-7815, 7798-7817, 7799-7816, 7799-7818, 7800-7819, 7801-7818, 7801-7820, 7802-7817, 7802-7819, 7802-7821, 7803-7818, 7803-7820, 7803-7822, 7804-7821, 7804-7823, 7805-7820, 7805-7822, 7805-7824, 7806-7821, 7806-7823, 7806-7825, 7807-7824, 7807-7825, 7807-7826, 7808-7825, 7808-7827, 7809-7825, 7809-7826, 7809-7828, 7810-7825, 7810-7826, 7810-7827, 7810-7829, 7811-7828, 7811-7830, 7812-7829, 7812-7830, 7812-7831, 7813-7829, 7813-7831, 7813-7832, 7814-7833, 7815-7831, 7815-7832, 7815-7833, 7815-7834, 7816-7832, 7816-7833, 7816-7834, 7816-7835, 7817-7833, 7817-7834, 7817-7835, 7817-7836, 7818-7834, 7818-7835, 7818-7836, 7818-7837, 7819-7835, 7819-7836,

7819-7837, 7819-7838, 7820-7836, 7820-7838, 7820-7839, 7821-7836, 7821-7837, 7821-7839, 7821-7840, 7822-7837, 7822-7838, 7822-7840, 7822-7841, 7823-7838, 7823-7839, 7823-7839, 7823-7840, 7823-7841, 7823-7842, 7824-7839, 7824-7840, 7824-7840, 7824-7841, 7824-7842, 7824-7843, 7825-7840, 7825-7841, 7825-7842, 7825-7843, 7825-7844, 7826-7842, 7826-7843, 7826-7844, 7826-7845, 7827-7842, 7827-7843, 7827-7844, 7827-7845, 7827-7846, 7828-7843, 7828-7844, 7828-7845, 7828-7847, 7829-7844, 7829-7845, 7829-7846, 7829-7847, 7829-7848, 7830-7845, 7830-7846, 7830-7847, 7830-7848, 7830-7849, 7831-7846, 7831-7847, 7831-7848, 7831-7849, 7831-7850, 7832-7847, 7832-7848, 7832-7849, 7832-7850, 7832-7851, 7833-7848, 7833-7849, 7833-7850, 7833-7851, 7833-7852, 7834-7849, 7834-7850, 7834-7851, 7834-7852, 7834-7853, 7835-7850, 7835-7851, 7835-7852, 7835-7853, 7835-7854, 7836-7851, 7836-7852, 7836-7853, 7836-7854, 7836-7855, 7837-7852, 7837-7853, 7837-7854, 7837-7855, 7837-7856, 7838-7853, 7838-7854, 7838-7855, 7838-7856, 7838-7857, 7839-7854, 7839-7855, 7839-7856, 7839-7857, 7839-7858, 7840-7855, 7840-7856, 7840-7857, 7840-7858, 7840-7859, 7841-7856, 7841-7857, 7841-7858, 7841-7859, 7841-7860, 7842-7857, 7842-7858, 7842-7859, 7842-7860, 7842-7861, 7843-7858, 7843-7859, 7843-7860, 7843-7861, 7843-7862, 7844-7859, 7844-7860, 7844-7861, 7844-7862, 7845-7860, 7845-7861, 7845-7862, 7846-7861, y 7846-7862.

En determinadas modalidades, las siguientes regiones de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, cuando los compuestos u oligonucleótidos antisentido se dirigen a ellas, demuestran una inhibición de al menos un 60 %: 48-63, 150-169, 152-171, 154-169, 154-173, 156-171, 156-175, 158-173, 158-177, 600-619, 1135-1154, 1141-1160, 1147-1166, 1153-1172, 1171-1186, 1173-1188, 1175-1190, 1749-1768, 1763-1782, 1763-1782, 1912-1931, 2189-2208, 2191-2210, 2193-2212, 2195-2210, 2195-2214, 2197-2212, 2197-2216, 2223-2238, 2225-2240, 2227-2242, 2238-2257, 2448-2467, 2453-2472, 2455-2474, 2457-2472, 2457-2476, 2459-2474, 2459-2478, 2461-2476, 2461-2480, 2550-2569, 2551-2566, 2552-2571, 2553-2568, 2553-2570, 2553-2571, 2553-2572, 2554-2571, 2554-2572, 2554-2573, 2555-2572, 2555-2574, 2556-2573, 2556-2574, 2556-2575, 2557-2574, 2557-2575, 2557-2576, 2558-2575, 2558-2576, 2558-2577, 2559-2576, 2559-2577, 2559-2578, 2560-2577, 2560-2578, 2560-2579, 2561-2578, 2561-2579, 2561-2580, 2562-2577, 2562-2579, 2562-2581, 2563-2578, 2563-2580, 2563-2582, 2564-2581, 2564-2583, 2565-2584, 2566-2583, 2566-2585, 2567-2582, 2567-2584, 2567-2586, 2568-2583, 2568-2585, 2568-2587, 2569-2586, 2569-2588, 2570-2587, 2570-2589, 2571-2588, 2572-2590, 2572-2591, 2573-2590, 2573-2592, 2574-2591, 2574-2593, 2575-2590, 2575-2592, 2575-2594, 2576-2593, 2576-2595, 2577-2594, 2577-2595, 2577-2596, 2578-2594, 2578-

2597, 2579-2598, 2580-2596, 2580-2597, 2580-2598, 2580-2599, 2581-2597, 2581-2598, 2581-2599, 2581-2600, 2582-2598, 2582-2599, 2582-2600, 2582-2601, 2583-2599, 2583-2600, 2583-2601, 2583-2602, 2584-2600, 2584-2602, 2584-2603, 2585-2601, 2585-2603, 2585-2604, 2586-2602, 2586-2604, 2586-2605, 2587-2603, 2587-2605, 2587-2606, 2588-2603, 2588-2604, 2588-2606, 2588-2607, 2589-2605, 2589-2606, 2589-2607, 2589-2608, 2590-2605, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2608, 2590-2609, 2591-2607, 2591-2609, 2591-2610, 2592-2608, 2592-2609, 2592-2611, 2593-2608, 2593-2609, 2593-2612, 2594-2609, 2594-2610, 2594-2611, 2594-2612, 2594-2613, 2595-2610, 2595-2611, 2595-2612, 2595-2613, 2595-2614, 2596-2611, 2596-2612, 2596-2613, 2596-2614, 2596-2615, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-2616, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2599-2614, 2599-2615, 2599-2616, 2599-2617, 2599-2618, 2600-2615, 2600-2616, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2601-2616, 2601-2617, 2601-2618, 2601-2619, 2601-2620, 2602-2617, 2602-2618, 2602-2619, 2602-2620, 2602-2621, 2603-2618, 2603-2619, 2603-2620, 2603-2621, 2603-2622, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2608-2623, 2608-2624, 2608-2625, 2608-2625, 2608-2626, 2608-2627, 2609-2624, 2609-2625, 2609-2626, 2609-2627, 2609-

2628, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2627, 2610-2628, 2610-2629, 2611-2626, 2611-2626, 2611-2627, 2611-2628, 2611-2629, 2611-2630, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2629, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2630, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630, 2615-2630, 2615-2631, 2615-2631, y 2616-2631.

En determinadas modalidades, las siguientes regiones de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, cuando los compuestos u oligonucleótidos antisentido se dirigen a ellas, demuestran una inhibición de al menos un 60 %: 1685-1704, 1686-1705, 1769-1784, 1871-1890, 1873-1892, 1875-1890, 1875-1894, 1877-1892, 1877-1896, 1879-1894, 1879-1898, 2808-2827, 3819-3838, 3825-3844, 3831-3850, 3837-3856, 4151-4166, 5890-5909, 5904-5923, 5904-5923, 6406-6425, 6977-6996, 6979-6998, 6981-7000, 6983-6998, 6983-7002, 6985-7000, 6985-7004, 7122-7141, 7683-7702, 7688-7707, 7690-7709, 7692-7707, 7692-7711, 7694-7709, 7696-7711, 7696-7715, 7786-7801, 7787-7806, 7788-7803, 7788-7805, 7788-7806, 7788-7807, 7789-7806, 7789-7807, 7789-7808, 7790-7807, 7790-7809, 7791-7808, 7791-7809, 7791-7810, 7792-7809, 7792-7810, 7792-7811, 7793-7810, 7793-7811, 7793-7812, 7794-7811, 7794-7812, 7794-7813, 7795-7812, 7795-7813, 7795-7814, 7796-7813, 7796-7814, 7796-7815, 7797-7812, 7797-7814, 7797-7816, 7798-7813, 7798-7815, 7798-7817, 7799-7816, 7799-

7818, 7800-7819, 7801-7818, 7801-7820, 7802-7817, 7802-7819, 7802-7821, 7803-7818, 7803-7820, 7803-7822, 7804-7821, 7804-7823, 7805-7822, 7805-7824, 7806-7823, 7806-7825, 7807-7824, 7807-7825, 7807-7826, 7808-7825, 7808-7827, 7809-7826, 7809-7828, 7810-7825, 7810-7827, 7810-7829, 7811-7828, 7811-7830, 7812-7829, 7812-7830, 7812-7831, 7813-7829, 7813-7832, 7814-7833, 7815-7831, 7815-7832, 7815-7833, 7815-7834, 7816-7832, 7816-7833, 7816-7834, 7816-7835, 7817-7833, 7817-7834, 7817-7835, 7817-7836, 7818-7834, 7818-7835, 7818-7836, 7818-7837, 7819-7835, 7819-7837, 7819-7838, 7820-7836, 7820-7838, 7820-7839, 7821-7837, 7821-7839, 7821-7840, 7822-7838, 7822-7840, 7822-7841, 7823-7838, 7823-7839, 7823-7841, 7823-7842, 7824-7840, 7824-7841, 7824-7842, 7824-7843, 7825-7840, 7825-7841, 7825-7842, 7825-7843, 7825-7844, 7826-7842, 7826-7844, 7826-7845, 7827-7843, 7827-7844, 7827-7846, 7828-7843, 7828-7844, 7828-7847, 7829-7844, 7829-7845, 7829-7846, 7829-7847, 7829-7848, 7830-7845, 7830-7846, 7830-7847, 7830-7848, 7830-7849, 7831-7846, 7831-7847, 7831-7848, 7831-7849, 7831-7850, 7832-7847, 7832-7848, 7832-7849, 7832-7850, 7832-7851, 7833-7848, 7833-7849, 7833-7850, 7833-7851, 7833-7852, 7834-7849, 7834-7850, 7834-7851, 7834-7852, 7834-7853, 7835-7850, 7835-7851, 7835-7852, 7835-7853, 7835-7854, 7836-7851, 7836-7852, 7836-7853, 7836-7854, 7836-7855, 7837-7852, 7837-7853, 7837-7854, 7837-7855, 7837-7856, 7838-7853, 7838-7854, 7838-7855, 7838-

7856, 7838-7857, 7839-7854, 7839-7855, 7839-7856, 7839-7857, 7839-7858, 7840-7855, 7840-7856, 7840-7857, 7840-7858, 7840-7859, 7841-7856, 7841-7857, 7841-7858, 7841-7859, 7841-7860, 7842-7857, 7842-7858, 7842-7859, 7842-7860, 7842-7861, 7843-7858, 7843-7859, 7843-7860, 7843-7861, 7843-7862, 7844-7859, 7844-7860, 7844-7861, 7844-7862, 7845-7860, 7845-7861, 7845-7862, 7846-7861, 7846-7862, y 7847-7862.

En determinadas modalidades, las siguientes regiones de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, cuando los compuestos u oligonucleótidos antisentido se dirigen a ellas, demuestran una inhibición de al menos un 70 %: 48-63, 150-169, 152-171, 154-169, 154-173, 156-171, 156-175, 158-173, 158-177, 1135-1154, 1141-1160, 1147-1166, 1171-1186, 1173-1188, 1175-1190, 1749-1768, 1763-1782, 1912-1931, 2193-2212, 2195-2210, 2195-2214, 2197-2212, 2197-2216, 2223-2238, 2225-2240, 2227-2242, 2453-2472, 2455-2474, 2457-2472, 2457-2476, 2459-2474, 2461-2476, 2461-2480, 2550-2569, 2551-2566, 2552-2571, 2553-2570, 2553-2571, 2553-2572, 2554-2571, 2554-2572, 2554-2573, 2554-2573, 2555-2572, 2555-2574, 2555-2574, 2556-2573, 2556-2574, 2556-2575, 2557-2574, 2557-2576, 2558-2575, 2558-2576, 2558-2577, 2559-2576, 2559-2577, 2559-2578, 2560-2577, 2560-2578, 2560-2579, 2561-2578, 2561-2579, 2561-2580, 2562-2577, 2562-2579, 2562-2581, 2563-2578, 2563-2580, 2563-2582, 2564-2581,

2564-2583, 2565-2584, 2566-2583, 2566-2585, 2567-2582, 2567-2584, 2567-2586, 2568-2585, 2568-2587, 2569-2586, 2569-2588, 2570-2587, 2570-2589, 2571-2588, 2571-2590, 2572-2589, 2572-2591, 2573-2590, 2573-2592, 2574-2591, 2574-2593, 2575-2592, 2575-2594, 2576-2593, 2576-2595, 2577-2594, 2577-2596, 2578-2597, 2579-2598, 2580-2596, 2580-2598, 2580-2599, 2581-2597, 2581-2600, 2582-2598, 2582-2600, 2582-2601, 2583-2599, 2583-2601, 2583-2602, 2584-2600, 2584-2602, 2584-2603, 2585-2601, 2585-2603, 2585-2604, 2586-2605, 2587-2606, 2588-2604, 2588-2606, 2588-2607, 2589-2605, 2589-2606, 2589-2607, 2589-2608, 2590-2605, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2609, 2591-2607, 2591-2610, 2592-2611, 2593-2608, 2593-2612, 2594-2609, 2594-2610, 2594-2612, 2594-2613, 2595-2610, 2595-2611, 2595-2612, 2595-2613, 2595-2614, 2596-2611, 2596-2614, 2596-2615, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-2616, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2599-2614, 2599-2615, 2599-2616, 2599-2617, 2599-2618, 2600-2615, 2600-2616, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2601-2616, 2601-2617, 2601-2618, 2601-2619, 2601-2620, 2602-2617, 2602-2618, 2602-2619, 2602-2620, 2602-2621, 2603-2619, 2603-2620, 2603-2621, 2603-2622, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2608-2623, 2608-2624,

2608-2625, 2608-2626, 2608-2627, 2609-2624, 2609-2625, 2609-2626, 2609-2627, 2609-2628, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2627, 2610-2628, 2610-2629, 2611-2626, 2611-2627, 2611-2629, 2611-2630, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2629, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2630, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630, 2615-2630, 2615-2631, y 2616-2631.

En determinadas modalidades, las siguientes regiones de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, cuando los compuestos u oligonucleótidos antisentido se dirigen a ellas, demuestran una inhibición de al menos un 70 %:1685-1704, 1686-1705, 1769-1784, 1871-1890, 1873-1892, 1875-1890, 1875-1894, 1877-1892, 1877-1896, 1879-1894, 1879-1898, 3819-3838, 3825-3844, 3831-3850, 4151-4166, 5890-5909, 5904-5923, 5904-5923, 6406-6425, 6983-6998, 6983-7002, 6985-7000, 6985-7004, 7688-7707, 7690-7709, 7692-7707, 7692-7711, 7694-7709, 7696-7711, 7696-7715, 7786-7801, 7787-7806, 7788-7805, 7788-7806, 7788-7807, 7789-7806, 7789-7807, 7789-7808, 7790-7807, 7790-7809, 7791-7808, 7791-7809, 7791-7810, 7792-7809, 7792-7811, 7793-7810, 7793-7811, 7793-7812, 7794-7811, 7794-7812, 7794-7813, 7795-7812, 7795-7813, 7795-7814, 7796-7813, 7796-7814, 7796-7815, 7797-7812, 7797-7814, 7797-7816, 7798-7813, 7798-7815, 7798-7817, 7799-7816, 7799-7818, 7800-7819, 7801-7818, 7801-7820,

7802-7817, 7802-7819, 7802-7821, 7803-7820, 7803-7822, 7804-7821, 7804-7823, 7805-7822, 7805-7824, 7806-7823, 7806-7825, 7807-7824, 7807-7826, 7808-7825, 7808-7827, 7809-7826, 7809-7828, 7810-7827, 7811-7828, 7811-7830, 7812-7829, 7812-7831, 7813-7832, 7814-7833, 7815-7831, 7815-7833, 7815-7834, 7816-7832, 7816-7835, 7817-7833, 7817-7835, 7817-7836, 7818-7834, 7818-7836, 7818-7837, 7819-7835, 7819-7837, 7819-7838, 7820-7836, 7820-7838, 7820-7839, 7821-7840, 7822-7841, 7823-7839, 7823-7841, 7823-7842, 7824-7840, 7824-7841, 7824-7842, 7824-7843, 7825-7840, 7825-7841, 7825-7842, 7825-7844, 7826-7842, 7826-7845, 7827-7846, 7828-7843, 7828-7847, 7829-7844, 7829-7845, 7829-7847, 7829-7848, 7830-7845, 7830-7846, 7830-7847, 7830-7848, 7830-7849, 7831-7846, 7831-7849, 7831-7850, 7832-7847, 7832-7848, 7832-7849, 7832-7850, 7832-7851, 7833-7848, 7833-7849, 7833-7850, 7833-7851, 7833-7852, 7834-7849, 7834-7850, 7834-7851, 7834-7852, 7834-7853, 7835-7850, 7835-7851, 7835-7852, 7835-7853, 7835-7854, 7836-7851, 7836-7852, 7836-7853, 7836-7854, 7836-7855, 7837-7852, 7837-7853, 7837-7854, 7837-7855, 7837-7856, 7838-7854, 7838-7855, 7838-7856, 7838-7857, 7839-7854, 7839-7855, 7839-7856, 7839-7857, 7839-7858, 7840-7855, 7840-7856, 7840-7857, 7840-7858, 7840-7859, 7841-7856, 7841-7857, 7841-7858, 7841-7859, 7841-7860, 7842-7857, 7842-7858, 7842-7859, 7842-7860, 7842-7861, 7843-7858, 7843-7859, 7843-7860, 7843-7861, 7843-7862, 7844-7859, 7844-7860,

7844-7861, 7844-7862, 7845-7860, 7845-7861, 7845-7862, 7846-7861, 7846-7862, y 7847-7862.

En determinadas modalidades, las siguientes regiones de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, cuando los compuestos u oligonucleótidos antisentido se dirigen a ellas, demuestran una inhibición de al menos un 80 %:152-171, 154-169, 156-171, 158-173, 1135-1154, 1171-1186, 1173-1188, 1175-1190, 1763-1782, 1912-1931, 2197-2212, 2223-2238, 2225-2240, 2227-2242, 2457-2472, 2459-2474, 2461-2476, 2551-2566, 2553-2570, 2553-2571, 2553-2572, 2554-2573, 2555-2572, 2555-2574, 2556-2573, 2556-2574, 2556-2575, 2557-2574, 2557-2576, 2558-2575, 2558-2576, 2559-2577, 2559-2578, 2560-2577, 2560-2578, 2560-2579, 2561-2578, 2561-2579, 2561-2580, 2562-2577, 2562-2579, 2562-2581, 2563-2580, 2563-2582, 2564-2581, 2564-2583, 2565-2584, 2566-2583, 2567-2584, 2567-2586, 2568-2585, 2568-2587, 2569-2586, 2569-2588, 2570-2587, 2571-2588, 2571-2590, 2572-2589, 2572-2591, 2573-2590, 2573-2592, 2574-2591, 2574-2593, 2575-2592, 2576-2593, 2576-2595, 2577-2594, 2577-2596, 2578-2597, 2580-2598, 2580-2599, 2581-2597, 2581-2600, 2582-2601, 2583-2602, 2584-2603, 2585-2604, 2586-2605, 2587-2606, 2588-2607, 2589-2608, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2609, 2591-2610, 2592-2611, 2593-2608, 2593-2612, 2594-2613, 2595-2611, 2595-2614, 2596-2615, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-

2616, 2598-2613, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2599-2614, 2599-2617, 2599-2618, 2600-2615, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2601-2616, 2601-2617, 2601-2619, 2601-2620, 2602-2618, 2602-2621, 2603-2620, 2603-2621, 2603-2622, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2608-2623, 2608-2624, 2608-2625, 2608-2627, 2609-2624, 2609-2626, 2609-2627, 2609-2628, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2628, 2610-2629, 2611-2626, 2611-2627, 2611-2629, 2611-2630, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630, y 2616-2631.

En determinadas modalidades, las siguientes regiones de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, cuando los compuestos u oligonucleótidos antisentido se dirigen a ellas, demuestran una inhibición de al menos un 80 %:1685-1704, 1686-1705, 1873-1892, 1875-1890, 1877-1892, 1879-1894, 3819-3838, 4151-4166, 5904-5923, 6406-6425, 6985-7000, 7692-7707, 7694-7709, 7696-7711, 7786-7801, 7788-7805, 7788-7806, 7788-7807, 7789-7808, 7790-7807, 7790-7809, 7791-7808, 7791-7809, 7791-7810, 7792-7809, 7792-7811, 7793-7810, 7793-7811, 7794-7812, 7794-7813, 7795-7812, 7795-7813, 7795-7814, 7796-7813, 7796-7814,

7796-7815, 7797-7812, 7797-7814, 7797-7816, 7798-7815, 7798-7817, 7799-7816, 7799-7818, 7800-7819, 7801-7818, 7802-7819, 7802-7821, 7803-7820, 7803-7822, 7804-7821, 7804-7823, 7805-7822, 7806-7823, 7806-7825, 7807-7824, 7807-7826, 7808-7825, 7808-7827, 7809-7826, 7809-7828, 7810-7827, 7811-7828, 7812-7829, 7812-7831, 7813-7832, 7814-7833, 7815-7834, 7816-7832, 7816-7835, 7817-7836, 7818-7837, 7819-7838, 7820-7839, 7821-7840, 7822-7841, 7823-7842, 7824-7843, 7825-7841, 7825-7842, 7825-7844, 7826-7845, 7827-7846, 7828-7843, 7828-7847, 7829-7848, 7830-7846, 7830-7849, 7831-7850, 7832-7847, 7832-7848, 7832-7849, 7832-7850, 7832-7851, 7833-7848, 7833-7849, 7833-7850, 7833-7851, 7833-7852, 7834-7849, 7834-7852, 7834-7853, 7835-7850, 7835-7852, 7835-7853, 7835-7854, 7836-7851, 7836-7852, 7836-7854, 7836-7855, 7837-7853, 7837-7856, 7838-7855, 7838-7856, 7838-7857, 7839-7854, 7839-7855, 7839-7856, 7839-7857, 7839-7858, 7840-7855, 7840-7856, 7840-7857, 7840-7858, 7840-7859, 7841-7856, 7841-7857, 7841-7858, 7841-7859, 7841-7860, 7842-7857, 7842-7858, 7842-7859, 7842-7860, 7842-7861, 7843-7858, 7843-7859, 7843-7860, 7843-7862, 7844-7859, 7844-7861, 7844-7862, 7845-7860, 7845-7861, 7846-7862, y 7847-7862.

En determinadas modalidades, las siguientes regiones de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, cuando los compuestos u

oligonucleótidos antisentido se dirigen a ellas, demuestran una inhibición de al menos un 90 %:154-169, 156-171, 158-173, 1135-1154, 1171-1186, 1173-1188, 1763-1782, 1912-1931, 2223-2238, 2227-2242, 2459-2474, 2461-2476, 2554-2573, 2555-2574, 2560-2577, 2561-2578, 2561-2579, 2562-2581, 2563-2580, 2563-2582, 2564-2581, 2566-2583, 2567-2584, 2568-2585, 2568-2587, 2569-2586, 2570-2587, 2576-2593, 2577-2594, 2577-2596, 2578-2597, 2580-2599, 2581-2600, 2582-2601, 2583-2602, 2584-2603, 2586-2605, 2587-2605, 2587-2606, 2588-2607, 2589-2608, 2590-2607, 2590-2609, 2592-2611, 2595-2614, 2596-2615, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2615, 2597-2616, 2598-2613, 2598-2613, 2598-2617, 2599-2614, 2599-2618, 2600-2615, 2600-2619, 2601-2617, 2601-2620, 2602-2621, 2603-2622, 2604-2623, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2624, 2606-2625, 2607-2626, 2608-2623, 2608-2625, 2609-2628, 2611-2627, 2611-2630, 2612-2628, 2612-2631, 2613-2629, 2614-2629, 2615-2630, y 2616-2631.

En determinadas modalidades, las siguientes regiones de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, cuando los compuestos u oligonucleótidos antisentido se dirigen a ellas, demuestran una inhibición de al menos un 90 %:1685-1704, 1686-1705, 1875-1890, 1877-1892, 1879-1894, 3819-3838, 5904-5923, 6406-6425, 7694-7709, 7696-7711, 7789-7808, 7790-7809, 7795-7812, 7795-7813, 7796-7813, 7796-7814, 7797-7814, 7797-7816, 7798-

7815, 7798-7817, 7799-7816, 7801-7818, 7802-7819, 7803-7820, 7803-7822, 7804-7821, 7805-7822, 7811-7828, 7812-7829, 7812-7831, 7813-7832, 7815-7834, 7818-7837, 7819-7838, 7821-7840, 7822-7840, 7822-7841, 7825-7842, 7832-7847, 7832-7848, 7832-7850, 7833-7848, 7833-7852, 7834-7849, 7834-7853, 7835-7850, 7836-7852, 7836-7855, 7837-7856, 7838-7856, 7839-7857, 7839-7858, 7840-7856, 7840-7857, 7840-7859, 7843-7858, 7843-7860, y 7846-7862.

En determinadas modalidades, los siguientes compuestos u oligonucleótidos antisentido se dirigen a una región de ácido nucleico de CFB y efectúan al menos una inhibición del 50 % de un ARNm de CFB, n.° ISIS: 516350, 532614, 532632, 532635, 532638, 532639, 532686, 532687, 532688, 532689, 532690, 532691, 532692, 532692, 532693, 532694, 532695, 532696, 532697, 532698, 532699, 532700, 532701, 532702, 532703, 532704, 532705, 532706, 532707, 532770, 532775, 532778, 532780, 532791, 532800, 532809, 532810, 532811, 532917, 532952, 588509, 588510, 588511, 588512, 588513, 588514, 588515, 588516, 588517, 588518, 588519, 588520, 588522, 588523, 588524, 588525, 588527, 588528, 588529, 588530, 588531, 588532, 588533, 588534, 588535, 588536, 588537, 588538, 588539, 588540, 588541, 588542, 588543, 588544, 588545, 588546, 588547, 588548, 588549, 588550, 588551,

588552, 588553, 588554, 588555, 588556, 588557, 588558,
588559, 588560, 588561, 588562, 588563, 588564, 588565,
588566, 588567, 588568, 588569, 588570, 588571, 588572,
588573, 588574, 588575, 588576, 588577, 588580, 588581,
588585, 588586, 588589, 588590, 588599, 588603, 588606,
588608, 588610, 588614, 588616, 588628, 588631, 588632,
588634, 588636, 588638, 588640, 588645, 588646, 588654,
588656, 588658, 588660, 588662, 588664, 588670, 588672,
588676, 588682, 588688, 588696, 588698, 588807, 588808,
588809, 588813, 588814, 588815, 588819, 588820, 588822,
588823, 588838, 588839, 588840, 588841, 588842, 588846,
588847, 588848, 588849, 588850, 588851, 588852, 588853,
588854, 588855, 588856, 588857, 588858, 588859, 588860,
588861, 588862, 588863, 588864, 588865, 588866, 588867,
588868, 588870, 588871, 588872, 588873, 588874, 588875,
588876, 588877, 588878, 588879, 588880, 588881, 588882,
588883, 588884, 598999, 599000, 599001, 599002, 599003,
599004, 599005, 599006, 599007, 599008, 599009, 599010,
599011, 599012, 599013, 599014, 599015, 599018, 599019,
599023, 599024, 599025, 599026, 599027, 599028, 599029,
599030, 599031, 599032, 599033, 599034, 599035, 599058,
599062, 599063, 599064, 599065, 599070, 599071, 599072,
599073, 599074, 599076, 599077, 599078, 599079, 599080,
599081, 599082, 599083, 599084, 599085, 599086, 599087,

599088, 599089, 599090, 599091, 599092, 599093, 599094,
599095, 599096, 599097, 599098, 599102, 599119, 599123,
599124, 599125, 599126, 599127, 599128, 599132, 599133,
599134, 599135, 599136, 599137, 599138, 599139, 599140,
599141, 599142, 599143, 599144, 599145, 599147, 599148,
599149, 599150, 599151, 599152, 599153, 599154, 599155,
599156, 599157, 599158, 599159, 599178, 599179, 599180,
599181, 599182, 599186, 599187, 599188, 599189, 599190,
599191, 599192, 599193, 599194, 599195, 599196, 599197,
599198, 599199, 599200, 599201, 599202, 599203, 599204,
599205, 599206, 599207, 599208, 599209, 599210, 599211,
599212, 599213, 599214, 599215, 599216, 599217, 599218,
599219, 599220, 599221, 599221, 599222, 599223, 599224,
599225, 599226, 599227, 599228, 599229, 599230, 599231,
599232, 599233, 599234, 599235, 599236, 599241, 599247,
599248, 599249, 599255, 599256, 599257, 599258, 599260,
599261, 599262, 599263, 599264, 599265, 599266, 599267,
599268, 599269, 599270, 599271, 599272, 599273, 599274,
599275, 599276, 599277, 599278, 599279, 599280, 599297,
599299, 599306, 599307, 599308, 599309, 599311, 599312,
599313, 599314, 599315, 599316, 599317, 599318, 599319,
599320, 599321, 599322, 599323, 599324, 599325, 599326,
599327, 599328, 599329, 599330, 599338, 599349, 599353,
599354, 599355, 599356, 599357, 599358, 599359, 599360,

599361, 599362, 599363, 599364, 599369, 599371, 599372,
599373, 599376, 599378, 599379, 599382, 599383, 599384,
599385, 599386, 599387, 599388, 599389, 599390, 599391,
599392, 599393, 599394, 599395, 599396, 599397, 599398,
599399, 599400, 599401, 599402, 599403, 599404, 599405,
599406, 599407, 599408, 599409, 599410, 599412, 599413,
599414, 599415, 599416, 599417, 599418, 599419, 599420,
599421, 599422, 599423, 599424, 599425, 599426, 599433,
599434, 599435, 599436, 599437, 599438, 599439, 599440,
599441, 599442, 599443, 599444, 599445, 599446, 599447,
599448, 599450, 599454, 599455, 599456, 599467, 599468,
599469, 599471, 599472, 599473, 599474, 599475, 599476,
599477, 599478, 599479, 599480, 599481, 599482, 599483,
599484, 599485, 599486, 599487, 599488, 599489, 599490,
599491, 599492, 599493, 599494, 599495, 599496, 599497,
599498, 599499, 599500, 599501, 599502, 599503, 599504,
599505, 599506, 599507, 599508, 599509, 599512, 599515,
599518, 599531, 599541, 599541, 599546, 599547, 599548,
599549, 599550, 599552, 599553, 599554, 599555, 599557,
599558, 599561, 599562, 599563, 599564, 599565, 599566,
599567, 599568, 599569, 599570, 599577, 599578, 599579,
599580, 599581, 599581, 599582, 599584, 599585, 599586,
599587, 599588, 599589, 599590, 599591, 599592, 599593,
599594, 599595, 601321, 601322, 601323, 601325, 601327,

601328, 601329, 601330, 601332, 601333, 601334, 601335, 601336, 601337, 601338, 601339, 601341, 601342, 601343, 601344, 601345, 601346, 601347, 601348, 601349, 601362, 601367, 601368, 601369, 601371, 601372, 601373, 601374, 601375, 601377, 601378, 601380, 601381, 601382, 601383, 601384, 601385, 601386, 601387, y 601388.

En determinadas modalidades, los siguientes compuestos u oligonucleótidos antisentido dirigen una región de un ácido nucleico de CFB y tienen al menos una inhibición del 50 % del ARNm de CFB, SEQ ID NO: 12, 30, 33, 36, 37, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 198, 203, 206, 208, 219, 228, 237, 238, 239, 317, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 468, 472, 473, 475, 478, 479, 488, 492, 494, 495, 498, 499, 500, 502, 503, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 517, 518, 522, 523, 524, 525, 529, 530, 531, 534, 535, 537, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 563, 564, 565, 569, 570,

572, 573, 577, 588, 589, 590, 591, 592, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 623, 640, 641, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 700, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 758, 759, 760, 761, 762, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 813, 833, 834, 841, 846, 849, 850, 867, y 873.

En determinadas modalidades, los siguientes compuestos u oligonucleótidos antisentido se dirigen a una región de ácido nucleico de CFB y efectúan al menos una inhibición de 60 % de un ARNm de CFB, n.° ISIS: 516350, 532614, 532635, 532686, 532687, 532688, 532689, 532770, 532800, 532809, 532810, 532811, 532917, 532952, 588512, 588513, 588514, 588515, 588516, 588517, 588518, 588519, 588522, 588523, 588524,

588525, 588527, 588528, 588529, 588530, 588531, 588532,
588533, 588534, 588535, 588536, 588537, 588538, 588539,
588540, 588541, 588542, 588543, 588544, 588545, 588546,
588547, 588548, 588549, 588550, 588551, 588552, 588553,
588554, 588555, 588556, 588557, 588558, 588559, 588560,
588561, 588562, 588563, 588564, 588565, 588566, 588567,
588568, 588569, 588570, 588571, 588572, 588573, 588574,
588575, 588576, 588577, 588636, 588638, 588640, 588664,
588676, 588696, 588698, 588807, 588808, 588814, 588815,
588819, 588820, 588840, 588842, 588846, 588847, 588848,
588849, 588850, 588851, 588852, 588853, 588854, 588855,
588856, 588857, 588858, 588859, 588860, 588861, 588862,
588863, 588864, 588866, 588867, 588868, 588870, 588871,
588872, 588873, 588874, 588875, 588876, 588877, 588878,
588879, 588880, 588881, 588882, 588883, 588884, 598999,
599000, 599001, 599002, 599003, 599004, 599005, 599006,
599007, 599008, 599009, 599010, 599011, 599012, 599013,
599014, 599015, 599019, 599024, 599025, 599026, 599027,
599028, 599029, 599030, 599031, 599032, 599033, 599034,
599035, 599064, 599065, 599071, 599072, 599077, 599078,
599079, 599080, 599083, 599084, 599085, 599086, 599087,
599088, 599089, 599090, 599091, 599092, 599093, 599094,
599095, 599096, 599097, 599125, 599126, 599127, 599133,
599134, 599135, 599136, 599138, 599139, 599140, 599141,

599142, 599148, 599149, 599150, 599151, 599152, 599154,
599155, 599156, 599157, 599158, 599159, 599178, 599179,
599180, 599181, 599187, 599188, 599190, 599192, 599193,
599194, 599195, 599196, 599197, 599198, 599199, 599200,
599201, 599202, 599203, 599204, 599205, 599206, 599207,
599208, 599209, 599210, 599211, 599212, 599213, 599214,
599215, 599216, 599217, 599218, 599219, 599220, 599221,
599222, 599223, 599224, 599225, 599226, 599227, 599228,
599229, 599230, 599231, 599232, 599233, 599234, 599235,
599236, 599247, 599255, 599256, 599257, 599263, 599264,
599265, 599266, 599270, 599271, 599272, 599273, 599274,
599275, 599276, 599277, 599278, 599279, 599280, 599306,
599307, 599308, 599311, 599312, 599313, 599314, 599315,
599316, 599317, 599318, 599319, 599320, 599321, 599322,
599323, 599324, 599325, 599327, 599328, 599329, 599330,
599349, 599353, 599355, 599356, 599357, 599358, 599359,
599360, 599361, 599362, 599363, 599364, 599369, 599371,
599372, 599373, 599376, 599378, 599379, 599382, 599384,
599386, 599387, 599388, 599389, 599390, 599391, 599392,
599393, 599394, 599395, 599396, 599397, 599398, 599399,
599400, 599401, 599402, 599403, 599404, 599405, 599406,
599407, 599408, 599409, 599410, 599412, 599413, 599414,
599415, 599416, 599417, 599418, 599419, 599420, 599421,
599422, 599423, 599424, 599425, 599433, 599434, 599435,

599436, 599437, 599438, 599439, 599440, 599441, 599442, 599443, 599444, 599445, 599446, 599447, 599448, 599456, 599467, 599468, 599471, 599472, 599473, 599474, 599475, 599476, 599477, 599478, 599479, 599480, 599481, 599482, 599483, 599484, 599485, 599486, 599487, 599488, 599489, 599490, 599491, 599492, 599493, 599494, 599495, 599496, 599497, 599498, 599499, 599500, 599501, 599502, 599503, 599504, 599505, 599506, 599507, 599508, 599512, 599531, 599547, 599548, 599549, 599552, 599553, 599554, 599555, 599557, 599558, 599562, 599563, 599564, 599565, 599566, 599567, 599568, 599569, 599570, 599577, 599578, 599579, 599580, 599581, 599582, 599584, 599585, 599586, 599587, 599588, 599589, 599590, 599591, 599592, 599593, 599594, 599595, 601323, 601327, 601329, 601332, 601333, 601333, 601334, 601335, 601336, 601338, 601339, 601341, 601342, 601343, 601344, 601345, 601346, 601347, 601348, 601349, 601368, 601369, 601371, 601372, 601374, 601375, 601377, 601378, 601380, 601381, 601382, 601383, 601384, 601385, 601386, 601387, y 601388.

En determinadas modalidades, los siguientes compuestos u oligonucleótidos antisentido dirigen una región de un ácido nucleico de CFB y tienen al menos una inhibición del 60 % del ARNm de CFB, SEQ ID NO: 12, 33, 84, 85, 86, 87, 198, 228,

237, 238, 239, 317, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 472, 473, 513, 514, 515, 531, 537, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 564, 565, 569, 570, 577, 590, 592, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 700, 704, 706, 707, 708, 709, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 758, 759, 760, 761, 767, 768, 770, 772, 773, 774, 775, 775, 776, 776, 777, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 783, 784, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 813, 833, 834, 841, 846, 849, y 850.

En determinadas modalidades, los siguientes compuestos u oligonucleótidos antisentido se dirigen a una región de ácido nucleico de CFB y efectúan al menos una inhibición de 70 % de un ARNm de CFB, n.° ISIS: 516350, 532614, 532686, 532687, 532688, 532770, 532800, 532809, 532810, 532811, 532917, 532952, 588512, 588513, 588514, 588515, 588516, 588517, 588518, 588524, 588529, 588530, 588531, 588532, 588533, 588534, 588535, 588536, 588537, 588538, 588539, 588540, 588541, 588542, 588543, 588544, 588545, 588546, 588547, 588548, 588549, 588550, 588551, 588552, 588553, 588554, 588555, 588556, 588557, 588558, 588559, 588560, 588561, 588562, 588563, 588564, 588565, 588568, 588569, 588570, 588571, 588572, 588573, 588574, 588575, 588577, 588636, 588638, 588640, 588696, 588698, 588807, 588814, 588815, 588819, 588842, 588847, 588848, 588849, 588850, 588851, 588852, 588853, 588856, 588857, 588858, 588859, 588860, 588861, 588862, 588863, 588866, 588867, 588870, 588871, 588872, 588873, 588874, 588875, 588876, 588877, 588878, 588879, 588880, 588881, 588882, 588883, 588884, 599000, 599001, 599003, 599004, 599005, 599008, 599009, 599010, 599011, 599014, 599015, 599024, 599025, 599027, 599028, 599029, 599030, 599031, 599032, 599033, 599034, 599072, 599077, 599080, 599085, 599086, 599087, 599088, 599089, 599090, 599091, 599093, 599094, 599095, 599096, 599097,

599125, 599126, 599134, 599138, 599139, 599148, 599149,
599150, 599151, 599152, 599154, 599155, 599156, 599157,
599158, 599187, 599188, 599193, 599195, 599196, 599197,
599198, 599199, 599200, 599201, 599202, 599203, 599204,
599205, 599206, 599207, 599208, 599210, 599211, 599212,
599213, 599214, 599215, 599216, 599217, 599218, 599219,
599220, 599221, 599222, 599223, 599224, 599225, 599226,
599227, 599228, 599229, 599230, 599231, 599232, 599233,
599234, 599235, 599236, 599266, 599272, 599272, 599273,
599274, 599275, 599277, 599278, 599279, 599280, 599280,
599306, 599311, 599312, 599313, 599314, 599315, 599316,
599317, 599318, 599319, 599320, 599321, 599322, 599323,
599325, 599327, 599328, 599329, 599330, 599355, 599357,
599358, 599359, 599360, 599361, 599362, 599363, 599364,
599369, 599371, 599372, 599373, 599378, 599379, 599382,
599384, 599386, 599387, 599388, 599389, 599390, 599391,
599392, 599393, 599394, 599395, 599396, 599397, 599398,
599399, 599400, 599401, 599402, 599403, 599404, 599405,
599406, 599407, 599408, 599409, 599410, 599413, 599414,
599415, 599416, 599417, 599418, 599419, 599420, 599421,
599422, 599423, 599424, 599433, 599434, 599435, 599436,
599437, 599438, 599439, 599440, 599441, 599442, 599443,
599445, 599446, 599447, 599448, 599472, 599473, 599474,
599475, 599476, 599477, 599478, 599479, 599480, 599481,

599482, 599483, 599484, 599485, 599486, 599487, 599488, 599489, 599490, 599491, 599492, 599493, 599494, 599495, 599496, 599497, 599498, 599499, 599500, 599501, 599502, 599503, 599504, 599505, 599506, 599507, 599508, 599512, 599547, 599548, 599552, 599553, 599554, 599555, 599558, 599562, 599563, 599564, 599566, 599567, 599568, 599569, 599570, 599577, 599578, 599579, 599580, 599581, 599582, 599585, 599586, 599587, 599588, 599589, 599590, 599591, 599592, 599593, 599594, 599595, 601332, 601335, 601341, 601343, 601344, 601345, 601346, 601347, 601348, 601349, 601371, 601372, 601380, 601382, 601383, 601384, 601385, 601386, y 601387.

En determinadas modalidades, los siguientes compuestos u oligonucleótidos antisentido dirigen una región de un ácido nucleico de CFB y tienen al menos una inhibición del 70% del ARNm de CFB, SEQ ID NO: 12, 84, 85, 86, 198, 228, 237, 238, 239, 317, 395, 396, 397, 398, 399, 402, 403, 404, 405, 407, 408, 410, 411, 412, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 464, 465, 472, 473, 513, 514, 515, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547,

549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 564, 565, 569, 592, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 653, 654, 655, 656, 659, 660, 662, 663, 664, 665, 666, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 677, 678, 679, 680, 682, 683, 684, 686, 687, 688, 689, 706, 708, 709, 711, 712, 713, 714, 715, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 767, 768, 773, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 793, 794, 795, 797, 798, 799, 813, 833, 834, 841, 846, 849, 867, y 873.

En determinadas modalidades, los siguientes compuestos u oligonucleótidos antisentido se dirigen a una región de ácido nucleico de CFB y efectúan al menos una inhibición de un 80 % de un ARNm de CFB, n.° ISIS: 532686, 532809, 532810, 532811, 532917, 532952, 588512, 588517, 588518, 588533, 588534, 588535, 588536, 588537, 588538, 588539, 588540, 588542, 588543, 588544, 588545, 588546, 588547, 588548, 588549, 588550, 588551, 588552, 588553, 588554, 588555, 588556, 588557, 588558, 588559, 588560, 588561, 588562, 588563, 588564, 588565, 588571, 588638, 588640, 588696, 588698,

588807, 588814, 588849, 588850, 588851, 588853, 588857,
588858, 588859, 588860, 588861, 588862, 588863, 588866,
588867, 588871, 588872, 588873, 588874, 588875, 588876,
588877, 588878, 588879, 588880, 588881, 588882, 588883,
599001, 599024, 599025, 599033, 599086, 599087, 599088,
599089, 599093, 599094, 599095, 599096, 599134, 599139,
599148, 599149, 599151, 599154, 599155, 599156, 599158,
599188, 599195, 599196, 599198, 599201, 599202, 599203,
599204, 599205, 599206, 599207, 599212, 599213, 599215,
599216, 599217, 599218, 599219, 599220, 599221, 599222,
599223, 599224, 599225, 599226, 599227, 599228, 599229,
599230, 599231, 599232, 599233, 599234, 599235, 599236,
599272, 599273, 599275, 599277, 599278, 599279, 599280,
599311, 599313, 599314, 599316, 599317, 599318, 599320,
599321, 599322, 599323, 599327, 599328, 599329, 599330,
599355, 599357, 599358, 599359, 599360, 599361, 599362,
599363, 599364, 599371, 599372, 599373, 599378, 599379,
599382, 599384, 599386, 599387, 599388, 599389, 599390,
599391, 599392, 599393, 599397, 599398, 599399, 599400,
599401, 599403, 599404, 599405, 599407, 599408, 599409,
599410, 599413, 599414, 599415, 599416, 599417, 599418,
599419, 599420, 599421, 599422, 599423, 599424, 599433,
599434, 599435, 599436, 599437, 599438, 599439, 599440,
599441, 599445, 599446, 599447, 599448, 599474, 599476,

599477, 599479, 599481, 599482, 599483, 599485, 599486, 599487, 599488, 599489, 599490, 599491, 599492, 599494, 599495, 599496, 599497, 599498, 599499, 599500, 599502, 599503, 599504, 599505, 599506, 599507, 599508, 599547, 599552, 599553, 599554, 599558, 599563, 599567, 599568, 599569, 599570, 599577, 599578, 599581, 599582, 599585, 599587, 599588, 599590, 599591, 599592, 599593, 599594, 601332, 601344, 601345, 601382, 601383, y 601385.

En determinadas modalidades, los siguientes compuestos u oligonucleótidos antisentido dirigen una región de un ácido nucleico de CFB y tienen al menos una inhibición del 80 % del ARNm de CFB, SEQ ID NO: 84, 237, 238, 239, 317, 395, 397, 411, 412, 413, 414, 415, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 425, 426, 427, 429, 430, 431, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 472, 473, 514, 515, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 564, 595, 599, 600, 601, 602, 603, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 646, 655, 660, 662, 663, 666, 669, 670, 671, 672, 673, 675, 676, 677, 678, 679, 682, 684, 686, 687, 688, 689, 706, 708, 709, 711, 712, 713, 714, 715, 720, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 729, 730, 731, 732, 733, 736,

737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 768, 775, 776, 778, 781, 782, 783, 784, 785, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 799, 813, 833, 834, 841, 849, 867, y 873.

En determinadas modalidades, los siguientes compuestos u oligonucleótidos antisentido se dirigen a una región de ácido nucleico de CFB y efectúan al menos una inhibición de 90 % de un ARNm de CFB, n.° ISIS: : 532686, 532811, 532917, 588536, 588537, 588538, 588539, 588544, 588545, 588546, 588548, 588551, 588552, 588553, 588554, 588555, 588556, 588557, 588558, 588559, 588560, 588561, 588562, 588564, 588638, 588640, 588696, 588698, 588849, 588850, 588851, 588860, 588866, 588867, 588872, 588873, 588874, 588876, 588877, 588878, 588879, 588881, 588883, 599149, 599188, 599203, 599206, 599220, 599221, 599222, 599223, 599224, 599225, 599226, 599227, 599228, 599229, 599235, 599236, 599279, 599280, 599314, 599321, 599362, 599378, 599390, 599391, 599398, 599399, 599404, 599413, 599414, 599416, 599419, 599420, 599422, 599435, 599437, 599438, 599441, 599483, 599494, 599508, 599552, 599553, 599554, 599568, 599570, 599577, 599581, 599591, 599592, y 599593.

En determinadas modalidades, los siguientes compuestos u

oligonucleótidos antisentido dirigen una región de un ácido nucleico de CFB y tienen al menos una inhibición del 90 % del ARNm de CFB, SEQ ID NO: 84, 238, 239, 317, 412, 413, 420, 421, 426, 434, 436, 437, 438, 439, 440, 442, 443, 444, 445, 446, 448, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 464, 465, 472, 473, 514, 515, 542, 543, 544, 545, 546, 551, 553, 555, 556, 599, 600, 601, 602, 610, 616, 617, 618, 662, 666, 670, 676, 677, 678, 688, 689, 713, 723, 729, 730, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 755, 756, 768, 783, 793, 833, y 867.

En determinadas modalidades, un compuesto puede comprender o consistir en cualquier oligonucleótido dirigido a CFB descrito en la presente y un grupo conjugado.

En determinadas modalidades, un compuesto comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados complementarios dentro de los nucleótidos 2193-2212, 2195-2210, 2457-2476, 2571-2590, 2584-2603, 2588-2607, 2592-2611, 2594-2613, 2597-2616, 2600-2619 o 2596-2611 de la SEQ ID NO: 1.

En determinadas modalidades, un compuesto comprende un

oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobases que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 y 598.

En determinadas modalidades, un compuesto comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que consiste en cualquiera de las SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 y 598.

En determinadas modalidades, cualquiera de los compuestos u oligonucleótidos precedentes puede comprender al menos una unión internucleósido modificado, al menos un azúcar modificado y/o al menos una nucleobase modificada.

En determinados aspectos, cualquiera de los compuestos u oligonucléotidos anteriores puede comprender al menos un azúcar modificado. En determinados aspectos, al menos un azúcar modificado comprende un grupo 2'-O-metoxietilo. En determinados aspectos, al menos un azúcar modificado es un azúcar bicíclico, tal como un grupo 4'-$CH(CH_3)$-O-2', un grupo 4'-CH_2-O-2' o un grupo 4'-$(CH_2)_2$-O-2'.

En determinados aspectos, el oligonucleótido modificado comprende al menos una unión internucleósido modificada, tal como una unión internucleósido fósforotioato.

En determinadas modalidades, el oligonucleótido modificado comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 uniones internucleósido fosfodiéster.

En determinadas modalidades, cada unión internucleósido del oligonucleótido modificado se selecciona de una unión internucleósido fosfodiéster y una unión internucleósido fosforotioato.

En determinadas modalidades, cada unión internucleósido del oligonucleótido modificado es una unión de fosforotioato.

En determinadas modalidades, cualquiera de los compuestos u oligonucléotidos anteriores comprende al menos una nucleobase modificada, tal como 5-metilcitosina.

En determinadas modalidades, un compuesto comprende un grupo conjugado y un oligonucleótido modificado que comprende:

un segmento intermedio que consiste en desoxinucleósidos enlazados;

un segmento de ala 5’ que consiste en nucleósidos enlazados; y

un segmento de ala 3’ que consiste en nucleósidos enlazados;

donde el segmento intermedio se coloca entre el segmento de ala 5’ y el segmento de ala 3’ y donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado. En determinadas modalidades, el oligonucleótido consiste en de 10 a 30 nucleósidos unidos que tienen una secuencia de nucleobase que comprende la secuencia mencionada en la SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 o 598.

En determinadas modalidades, el oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que comprende o que consiste en la secuencia mencionada en las SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453 o 455, donde el oligonucleótido modificado comprende:

un segmento intermedio que consiste en diez desoxinucleósidos enlazados;

un segmento de ala 5' que consiste en cinco nucleósidos enlazados; y

un segmento de ala 3' que consiste en cinco nucleósidos enlazados,

donde el segmento intermedio se encuentra ubicado entre

el segmento del ala 5’ y el segmento del ala 3’, donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar de 2’-O-metoxietilo, donde cada unión internucleósido es una unión de fosforotioato y donde cada citosina es una 5-metilcitosina.

En determinadas modalidades, un compuesto comprende o consiste en un oligonucleótido modificado de cadena simple y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 20 nucleósidos enlazados que tienen una secuencia de nucleobases que consiste en la secuencia mencionada en las SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453 o 455, donde el oligonucleótido comprende:

un segmento intermedio que consiste en diez desoxinucleósidos enlazados;

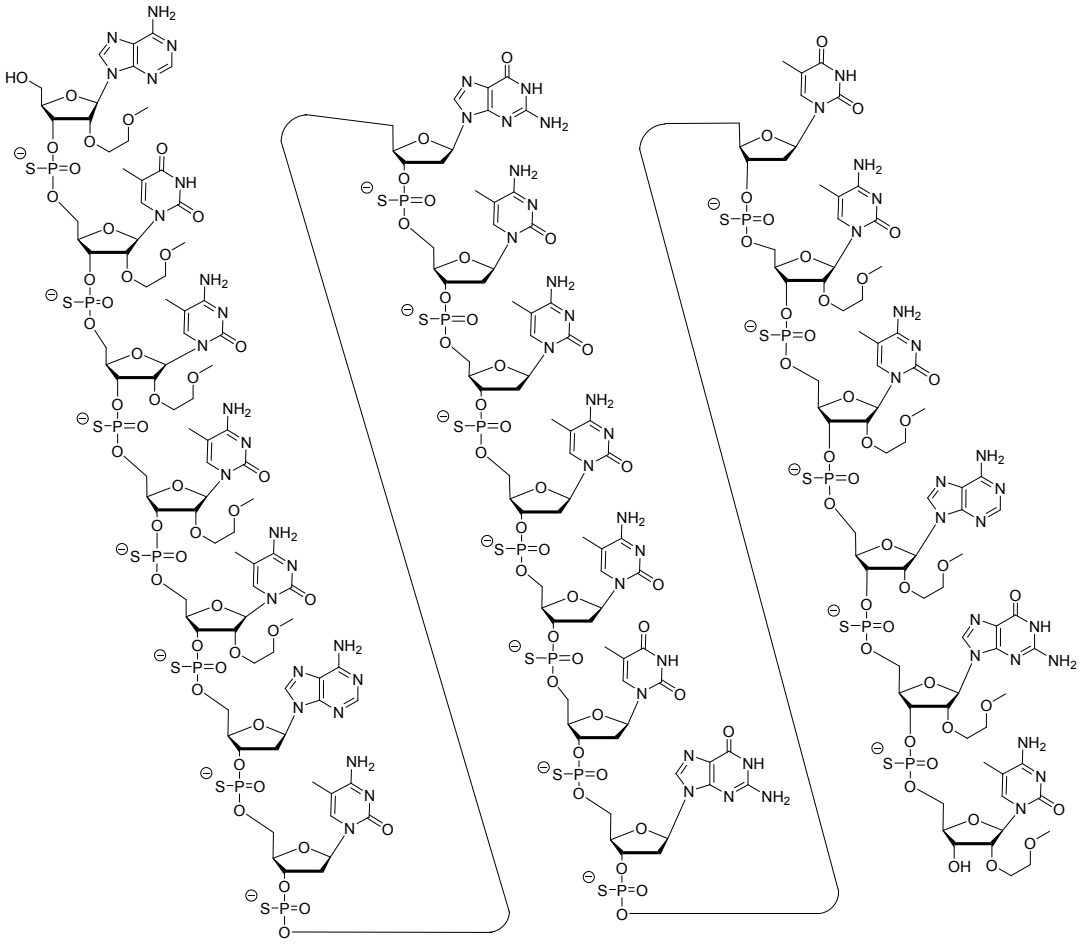
un segmento de ala 5' que consiste en cinco nucleósidos enlazados; y

un segmento de ala 3' que consiste en cinco nucleósidos enlazados,

donde el segmento intermedio se encuentra ubicado entre el segmento del ala 5’ y el segmento del ala 3’, donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar de 2’-O-metoxietilo, donde cada unión internucleósido es una unión de fosforotioato y donde cada citosina es una 5-

metilcitosina.

En determinadas modalidades, un compuesto comprende o consiste en ISIS 588540 y un grupo conjugado. En determinadas modalidades, ISIS 588540 tiene la siguiente estructura química:



En determinadas modalidades, el oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que comprende o que consiste en la secuencia mencionada en las SEQ ID NO: 549, donde el oligonucleótido modificado comprende

un segmento intermedio que consiste en diez desoxinucleósidos unidos,

un segmento de ala 5’ que consiste en tres nucleósidos unidos; y

un segmento de ala 3’ que consiste en tres nucleósidos unidos;

donde el segmento intermedio se encuentra ubicado entre el segmento del ala 5’ y el segmento del ala 3’, donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar de cEt; donde cada unión internucleósido es una unión de fosforotioato y donde cada citosina es una 5-metilcitosina.

En determinados aspectos, el oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que comprende o que consiste en la secuencia mencionada en la SEQ ID NO: 598, donde el oligonucleótido modificado comprende:

un segmento intermedio que consiste en diez desoxinucleósidos unidos,

un segmento de ala 5’ que consiste en tres nucleósidos unidos; y

un segmento de ala 3’ que consiste en tres nucleósidos unidos;

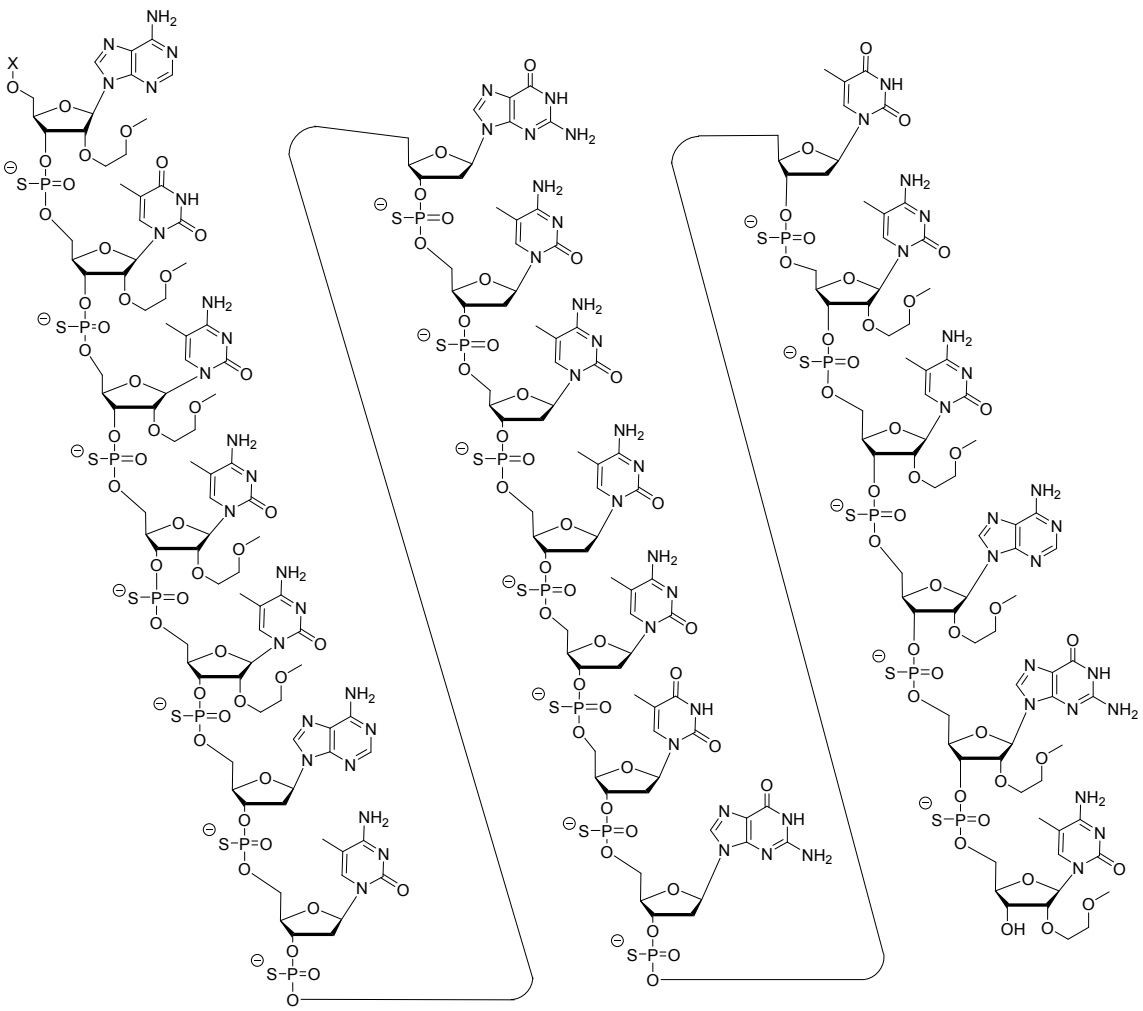
donde el segmento intermedio se encuentra ubicado entre el segmento de ala 5’ y el segmento de ala 3’; donde el

segmento de ala 5’ comprende un azúcar 2’-O-metoxietilo, azúcar 2’-O-metoxietilo y un azúcar de cEt en la dirección 5’ a 3’; donde el segmento de ala 3’ comprende u azúcar de cEt, azúcar de cEt sugar y azúcar 2’-O-metoxietilo en la dirección 5’ a 3’; donde cada unión internucleósido es una unión de fosforotioato; y donde cada citosina es una 5-metulcitosina. En cualquiera de las modalidades anteriores, el compuesto u oligonucleótido puede ser al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 100 % complementario a un ácido nucleico que codifica CFB.

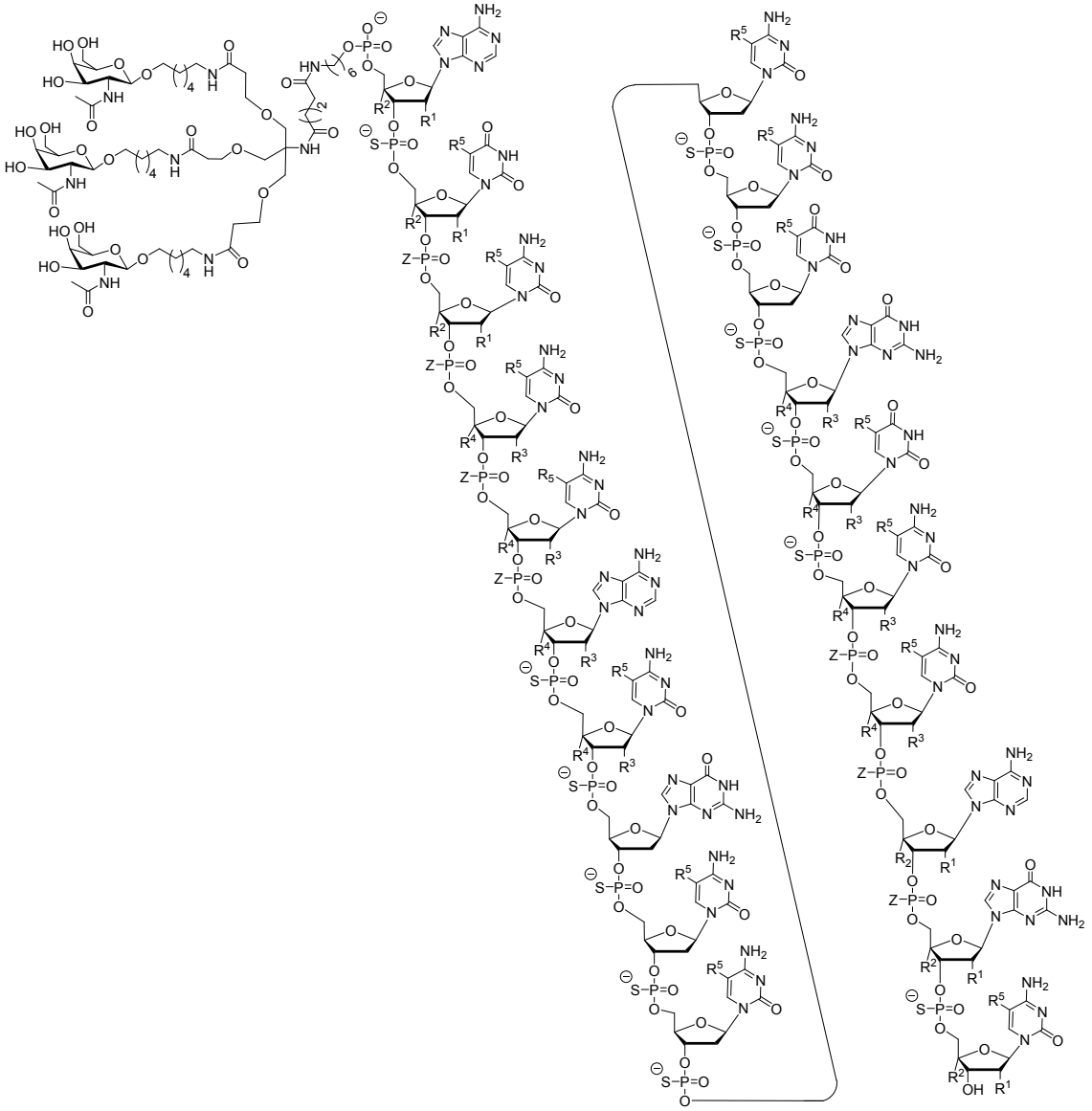
En cualquiera de las modalidades anteriores, el compuesto u oligonucleótido puede ser de cadena simple.

En determinadas modalidades, el grupo conjugado está unido al oligonucleótido modificado en el extremo 5' del oligonucleótido modificado. En determinadas modalidades, el grupo conjugado está unido al oligonucleótido modificado en el extremo 3' del oligonucleótido modificado. En determinadas modalidades, el grupo conjugado comprende al menosun *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), al menos dos *N*-acetilgalactosaminas (GalNAc), o al menos tres *N*-acetilgalactosaminas (GalNAc).

En determinadas modalidades, un compuesto que tiene la siguiente estructura química comprende o consiste en ISIS 588540 con un 5'-X, donde X es un grupo conjugado que comprende GalNAc como se describió en la presente:



En determinadas modalidades, un compuesto comprende o consiste en la SEQ ID NO: 440, 5'-GalNAc y modificaciones químicas tales como las que se representan mediante la siguiente estructura química:



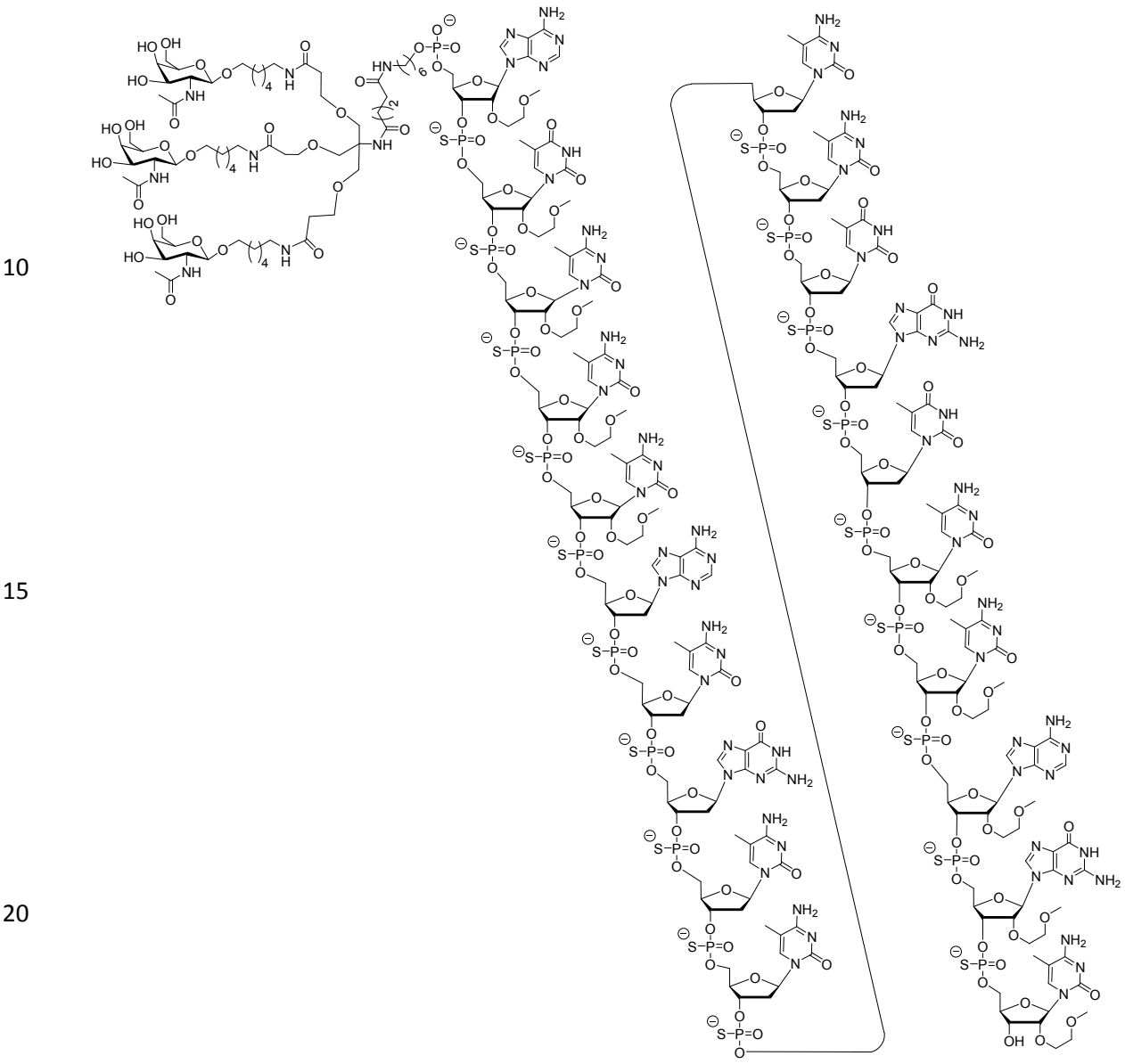
donde R^1 es $-OCH_2CH_2OCH_3$ (MOE) y R^2 es H; o R^1 y R^2 forman juntos un puente, donde R^1 es –O- y R^2 es $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, o $-CH_2CH_2-$, y R^1 y R^2 están conectados directamente de manera tal que el puente resultante se selecciona de: $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$ y $-O-CH_2CH_2-$;

y para cada par de R^3 y R^4 en el mismo anillo, independientemente para cada anillo: R^3 se selecciona de H y $-OCH_2CH_2OCH_3$ y R^4 es H; o R^3 y R^4 forman juntos un puente, donde R^3 es –O- y R^4 es $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$ o $-CH_2CH_2-$ y R^3 y R^4 están conectados directamente de manera tal que el puente resultante se seleccionade: $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$ y $-O-CH_2CH_2-$;

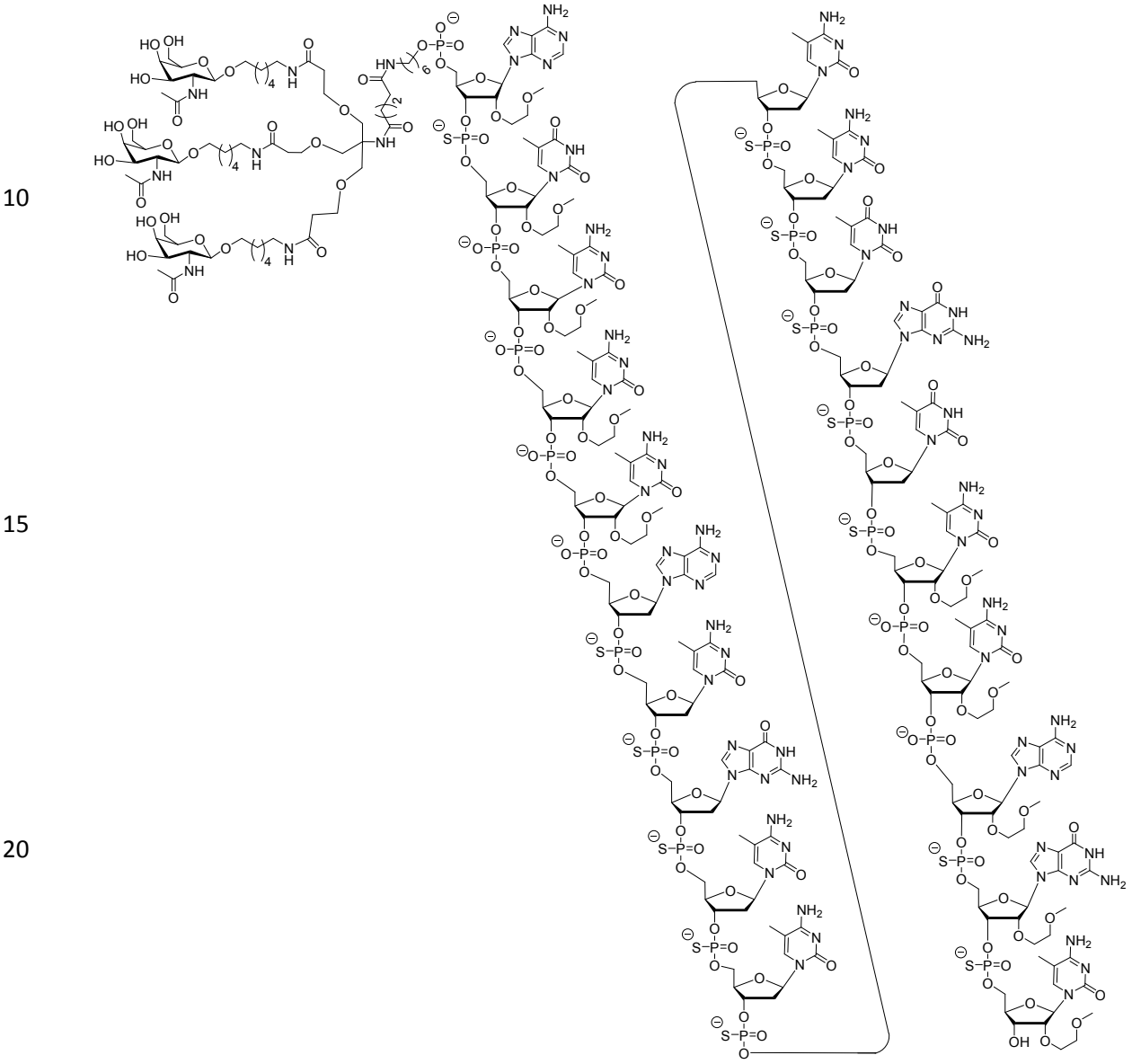
y R^5 se selecciona de H y $-CH_3$;

y Z se selecciona de S^- y O^-.

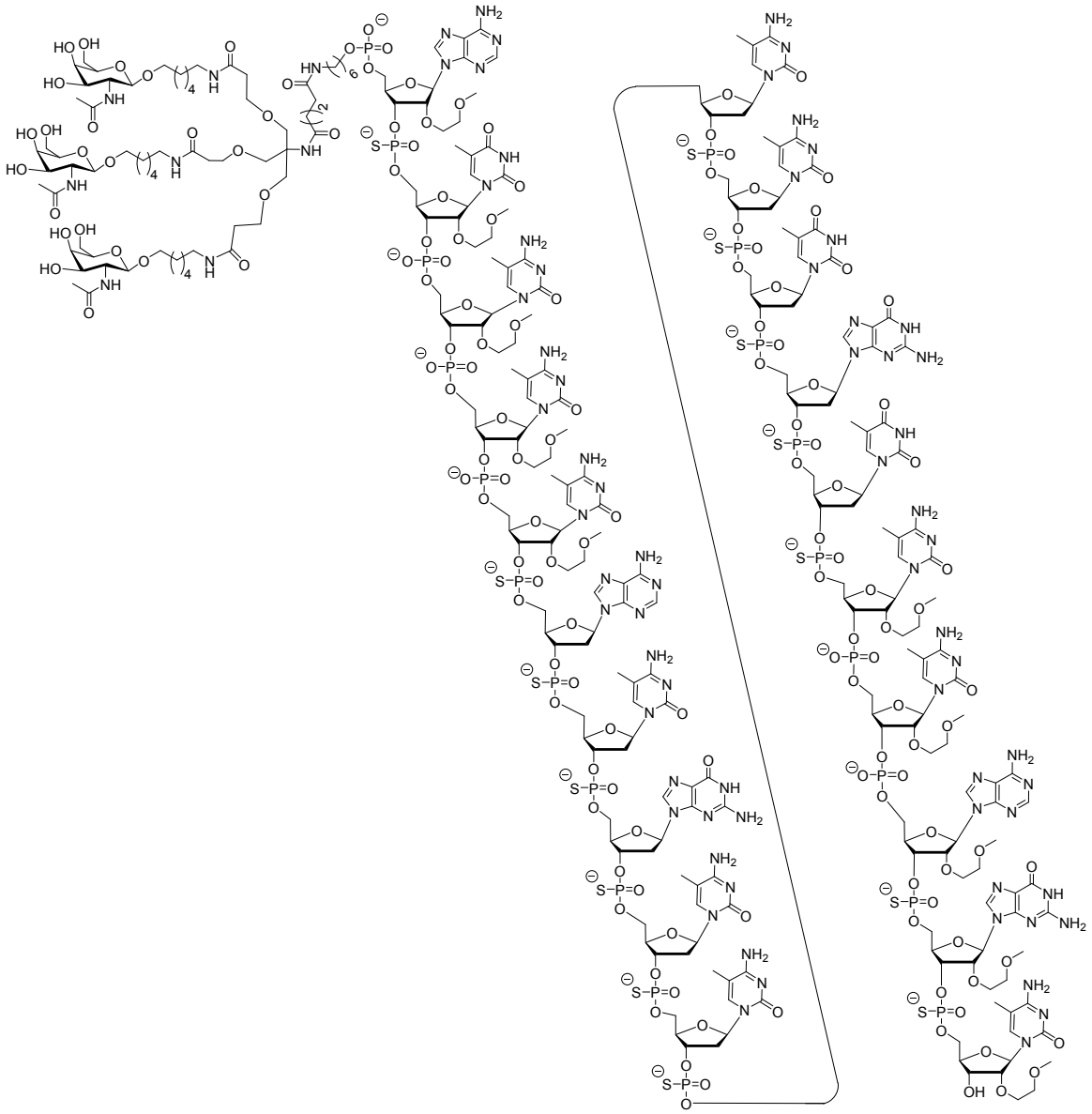
En determinadas modalidades, un compuesto comprende ISIS 696844. En determinadas modalidades, un compuesto consiste en ISIS 696844. En determinadas modalidades, ISIS 696844 tiene la siguiente estructura química:



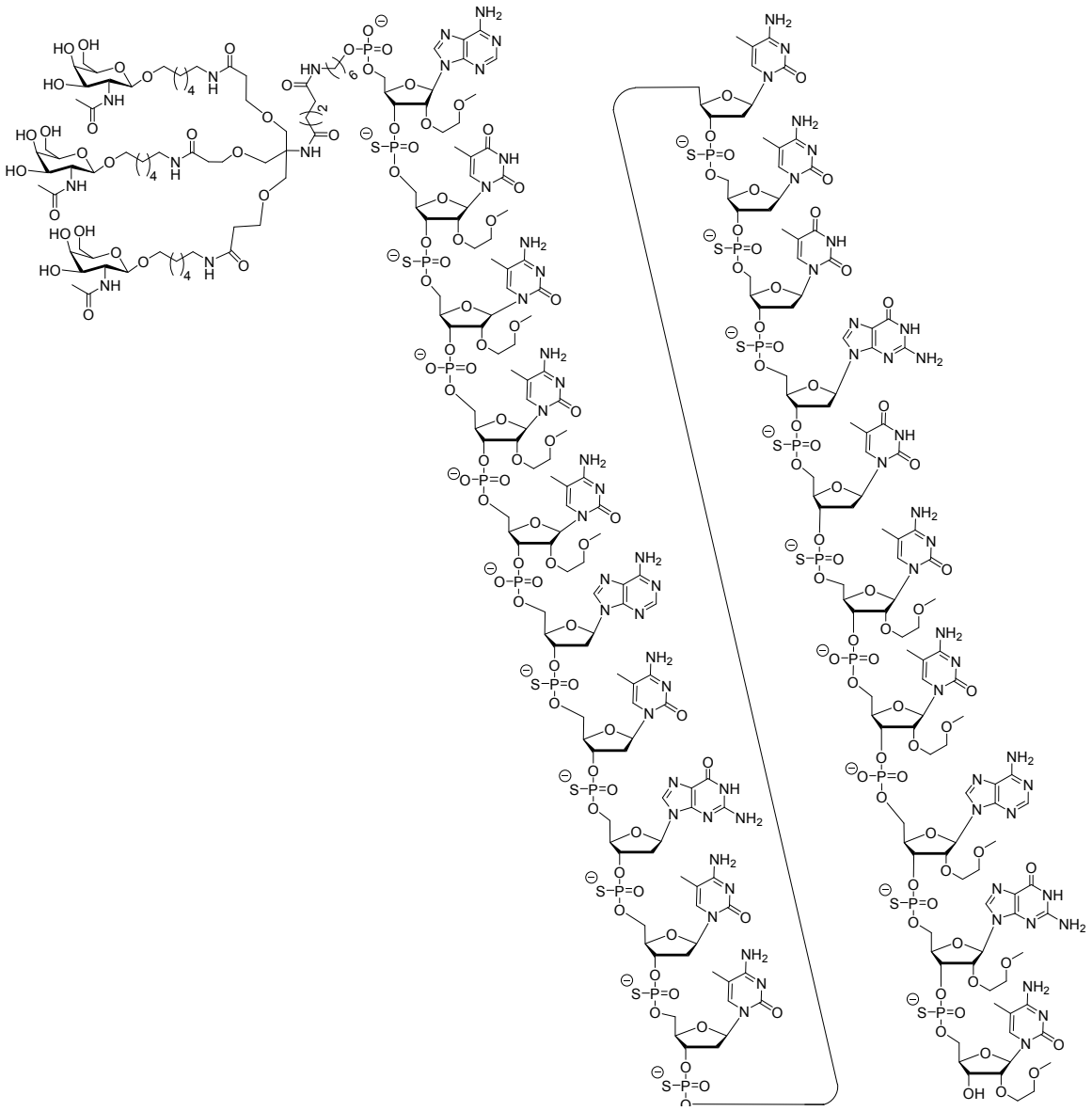
En determinadas modalidades, un compuesto comprende ISIS 696845. En determinadas modalidades, un compuesto consiste en ISIS 696845. En determinadas modalidades, ISIS 696845 tiene la siguiente estructura química:



En determinadas modalidades, un compuesto comprende ISIS 698969. En determinadas modalidades, un compuesto consiste en ISIS 698969. En determinadas modalidades, ISIS 698969 tiene la siguiente estructura química:



En determinadas modalidades, un compuesto comprende ISIS 698970. En determinadas modalidades, un compuesto consiste en ISIS 698970. En determinadas modalidades, ISIS 698970 tiene la siguiente estructura química:



Determinadas modalidades proporcionan composiciones que comprenden cualquiera de los compuestos que comprenden o consisten en un oligonucleótido modificado dirigido a CFB o sal de este y un grupo conjugado, y al menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En determinadas modalidades, los compuestos o composiciones tal como se describen en la presente son eficaces en virtud de que tienen al menos uno de una IC_{50} *in vitro* de menos de 250 nM, menos de 200 nM, menos de 150 nM, menos de 100 nM, menos de 90 nM, menos de 80 nM, menos de 70 nM, menos de 65 nM, menos de 60 nM, menos de 55 nM, menos de 50 nM, menos de 45 nM, menos de 40 nM, menos de 35 nM, menos de 30 nM, menos de 25 nM o menos de 20 nM.

En determinadas modalidades, los compuestos o composiciones tal como se describen en la presente son altamente tolerables tal como se demostró al presentar al menos uno de un aumento del valor de ALT o AST de no más de 4 veces, 3 veces o 2 veces en animales tratados con solución salina o un aumento en el peso del hígado, bazo o riñón de no más de 30 %, 20 %, 15 %, 12 %, 10 %, 5 % o 2 %. En determinadas modalidades, los compuestos o composiciones tal como se describen en la presente son altamente tolerables como se demostró al no

presentar aumento de ALT o AST en animales tratados con solución salina. En determinadas modalidades, los compuestos o composiciones como se describen en la presente son altamente tolerables como se demostró al no presentar aumento en el peso del hígado, bazo o riñón en animales tratados con solución salina.

Determinadas modalidades proporcionan una composición que comprende un compuesto de cualquiera de las modalidades mencionadas anteriormente o una sal de este y al menos uno de un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. En determinados aspectos, la composición tiene una viscosidad menor a alrededor de 40 centipoise (cP), menos de alrededor de 30 centipoise (cP), menos de alrededor de 20 centipoise (cP), menos de alrededor de 15 centipoise (cP) o menos de alrededor de 10 centipoise (cP). En determinados aspectos, la composición que tiene cualquiera de las viscosidades mencionadas anteriormente comprende un compuesto proporcionado en la presente a una concentración de alrededor de 100 mg/mL, alrededor de 125 mg/mL, alrededor de 150 mg/mL, alrededor de 175 mg/mL, alrededor de 200 mg/mL, alrededor de 225 mg/mL, alrededor de 250 mg/mL, alrededor de 275 mg/mL o alrededor de 300 mg/mL. En determinados aspectos, la composición que tiene cualquiera de las viscosidades mencionadas anteriormente y/o concentraciones de compuesto

tiene una temperatura ambiente o alrededor de 20 °C, alrededor de 21 °C, alrededor de 22 °C, alrededor de 23 °C, alrededor de 24 °C, alrededor de 25 °C, alrededor de 26 °C, alrededor de 27 °C, alrededor de 28 °C, alrededor de 29 °C, alrededor de 30 °C.

En determinadas modalidades, un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento en un sujeto comprende administrarle al sujeto un compuesto o composición descrita en la presente para de ese modo tratar, prevenir o mejorar la enfermedad. En determinados aspectos, la vía alternativa del complemento se activa más que lo normal. En determinadas modalidades, un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento en un sujeto comprende administrarle al sujeto un compuesto que comprende o consiste en un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobase que comprende la secuencia de nucleobase de cualquiera de las SEQ ID NO: 6-808. En determinadas modalidades, un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento en un sujeto comprende administrarle al sujeto un compuesto que comprende o consiste

en un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobase que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 y 598. En determinadas modalidades, un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento en un sujeto comprende administrarle al sujeto un compuesto que comprende o consiste en ISIS 696844, ISIS 696845, ISIS 698969 o ISIS 698970.

En determinadas modalidades, un método para tratar, prevenir o mejorar la degeneración macular, tal como degeneración macular asociada a la edad (DMAE) en un sujeto comprende administrarle al sujeto un compuesto o composición descrita en la presente para de ese modo tratar, prevenir o mejorar la DMAE. En determinados aspectos, la vía alternativa del complemento se activa más que lo normal. En determinados aspectos, la DMAE es DMAE húmeda. En determinados aspectos, la DMAE es DMAE seca, tal como atrofia geográfica. En determinadas modalidades, un método para tratar, prevenir o mejorar la degeneración macular en un sujeto, tal como degeneración macular asociada a la edad (DMAE), DMAE húmeda, DMAE seca o atrofia geográfica comprende administrarle al

sujeto un compuesto que comprende o consiste en un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobase que comprende la secuencia de nucleobase de cualquiera de las SEQ ID NO: 6-808. En determinadas modalidades, un método para tratar, prevenir o mejorar la degeneración macular, tal como degeneración macular asociada a la edad (DMAE), DMAE húmeda, DMAE seca o atrofia geográfica en un sujeto comprende administrarle al sujeto un compuesto que comprende o consiste en un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobase que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 y 598. En determinadas modalidades, un método para tratar, prevenir o mejorar la degeneración macular, tal como degeneración macular asociada a la edad (DMAE), DMAE húmeda, DMAE seca o atrofia geográfica en un sujeto comprende administrarle al sujeto un compuesto que comprende o consiste en ISIS 696844, ISIS 696845, ISIS 698969 o ISIS 698970. En determinados aspectos, el compuesto o composición se le administra al sujeto de forma parenteral.

En determinadas modalidades, un método para tratar, prevenir

o mejorar una enfermedad renal asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento en un sujeto comprende administrarle al sujeto un compuesto o composición descrita en la presente para de ese modo tratar, prevenir o mejorar la enfermedad renal. En determinadas modalidades, un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad renal asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento en un sujeto comprende administrarle al sujeto un compuesto que comprende o consiste en un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobase que comprende la secuencia de nucleobase de cualquiera de las SEQ ID NO: 6-808. En determinadas modalidades, un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad renal asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento en un sujeto comprende administrarle al sujeto un compuesto que comprende o consiste en un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobase que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 y 598. En determinadas modalidades, un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad renal asociada a la desregulación de la vía alternativa del

complemento en un sujeto comprende administrarle al sujeto un compuesto que comprende o consiste en ISIS 696844, ISIS 696845, ISIS 698969 o ISIS 698970. En determinados aspectos, la vía alternativa del complemento se activa más que lo normal. En determinados aspectos, la enfermedad de riñón es nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad de depósitos densos (EDD), glomerulonefritis C3 (C3GN), nefropatía CFHR5, o síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS, por sus siglas en inglés) o cualquier combinación de estos. En determinados aspectos, la enfermedad de riñón se asocia a depósitos de C3, tal como depósitos de C3 en el glomérulo. En determinados aspectos, la enfermedad de riñón se asocia nivel de C3 en circulación menores que los normales, tal como niveles de C3 en suero o plasma. En determinados aspectos, la administración del compuesto o composición reduce o inhibe la acumulación de los niveles oculares de C3, tal como los niveles de proteína de C3. En determinados aspectos, la administración del compuesto o composición reduce el nivel de depósitos oculares de C3 o inhibe la acumulación de depósitos oculares de C3. En determinados aspectos, el compuesto o composición se le administra al sujeto de forma parenteral. En determinados aspectos, la administración del compuesto o composición reduce o inhibe la acumulación de niveles de C3 en el riñón,

tal como los niveles de proteína de C3. En determinados aspectos, la administración del compuesto o composición reduce el nivel de depósitos de C3 en el riñón o inhibe la acumulación de depósitos de C3 en el riñón, tal como los niveles de C3 en el glomérulo. En determinados aspectos, se identifica que el sujeto padece o presenta riesgo de padecer una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento, por ejemplo, al detectar niveles del complemento o niveles del complejo de ataque a la membrana en la sangre del sujeto y/o al realizar una prueba genética para detectar mutaciones genéticas de factores del complemento asociados a la enfermedad.

En determinadas modalidades, un método para inhibir la expresión del Factor B del complemento (CFB) en un sujeto que padece, o que presenta riesgo de padecer, una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento comprende administrarle un compuesto o composición descrito en la presente al sujeto para inhibir, de esta forma, la expresión de CFB en el sujeto. En determinadas modalidades, un método para inhibir la expresión del Factor B del complemento (CFB) en un sujeto que padece, o que presenta riesgo de padecer, una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento comprende

administrarle al sujeto un compuesto que comprende o consiste en un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobase que comprende la secuencia de nucleobase de cualquiera de las SEQ ID NO: 6-808. En determinadas modalidades, un método para inhibir la expresión del Factor B del complemento (CFB) en un sujeto que padece, o que presenta riesgo de padecer, una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento comprende administrarle al sujeto un compuesto que comprende o consiste en un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobase que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 y 598. En determinadas modalidades, un método para inhibir la expresión del Factor B del complemento (CFB) en un sujeto que padece, o que presenta riesgo de padecer, una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento comprende administrarle al sujeto un compuesto que comprende o consiste en ISIS 696844, ISIS 696845, ISIS 698969 o ISIS 698970. En determinados aspectos, la administración del compuesto o composición inhibe la expresión de CFB en el ojo. En determinados aspectos, el

sujeto padece, o que presenta riesgo de padecer, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), tal como DMAE húmeda y DMAE seca. En determinados aspectos, la DMAE seca puede ser atrofia geográfica. Se considera que la atrofia geográfica es una forma avanzada de DMAE seca que implica la degeneración de la retina. En determinados aspectos, la administración del compuesto o composición inhibe la expresión de CFB en el riñón, tal como en el glomérulo. En determinados aspectos, el sujeto padece, o que presenta riesgo de padecer, nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad de depósitos densos (EDD), glomerulonefritis C3 (C3GN), nefropatía CFHR5, o síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS) o cualquier combinación de estos.

En determinadas modalidades, un método para reducir la acumulación de depósitos de C3 en el ojo de un sujeto que padece, o que presenta riesgo de padecer, una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento comprende administrarle un compuesto o composición descrito en la presente al sujeto para reducir, de esta forma, la acumulación de depósitos de C3 en el ojo del sujeto. En determinadas modalidades, un método para reducir la acumulación de depósitos de C3 en el ojo de un sujeto que padece, o que presenta riesgo de padecer, una

enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento comprende administrarle al sujeto un compuesto que comprende o consiste en un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobase que comprende la secuencia de nucleobase de cualquiera de las SEQ ID NO: 6-808. En determinadas modalidades, un método para reducir la acumulación de depósitos de C3 en el ojo de un sujeto que padece, o que presenta riesgo de padecer, una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento comprende administrarle al sujeto un compuesto que comprende o consiste en un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobase que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 y 598. En determinadas modalidades, un método para reducir la acumulación de depósitos de C3 en el ojo de un sujeto que padece, o que presenta riesgo de padecer, una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento comprende administrarle al sujeto un compuesto que comprende o consiste en ISIS 696844, ISIS 696845, ISIS 698969 o ISIS 698970. En determinados aspectos, el sujeto

padece, o que presenta riesgo de padecer, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), tal como DMAE húmeda y DMAE seca. En determinados aspectos, la DMAE seca puede ser atrofia geográfica. En determinados aspectos, el compuesto o composición se le administra al sujeto de forma parenteral.

En determinadas modalidades, un método para reducir la acumulación de depósitos de C3 en el riñón de un sujeto que padece, o que presenta riesgo de padecer, una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento comprende administrarle un compuesto o composición descrito en la presente al sujeto para reducir, de esta forma, la acumulación de depósitos de C3 en el riñón del sujeto. En determinadas modalidades, un método para reducir la acumulación de depósitos de C3 en el riñón de un sujeto que padece, o que presenta riesgo de padecer, una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento comprende administrarle al sujeto un compuesto que comprende o consiste en un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobase que comprende la secuencia de nucleobase de cualquiera de las SEQ ID NO: 6-808. En determinadas modalidades, un método para reducir la

acumulación de depósitos de C3 en el riñón de un sujeto que padece, o que presenta riesgo de padecer, una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento comprende administrarle al sujeto un compuesto que comprende o consiste en un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobase que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 y 598. En determinadas modalidades, un método para reducir la acumulación de depósitos de C3 en el riñón de un sujeto que padece, o que presenta riesgo de padecer, una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento comprende administrarle al sujeto un compuesto que comprende o consiste en ISIS 696844, ISIS 696845, ISIS 698969 o ISIS 698970. En determinados aspectos, el sujeto padece, o que presenta riesgo de padecer, nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad de depósitos densos (EDD), glomerulonefritis C3 (C3GN), nefropatía CFHR5, o síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS) o cualquier combinación de estos. En determinados aspectos, el compuesto o composición se le administra al sujeto de forma parenteral.

Determinadas modalidades se refieren al uso de un compuesto o

composición descrito en la presente para tratar una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento. Determinadas modalidades se refieren al uso de un compuesto que comprende o consiste en un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobases que comprende la secuencia de nucleobases de cualquiera de las SEQ ID NO: 6-808, para tratar una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento. Determinadas modalidades se refieren al uso de un compuesto que comprende o consiste en un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobases que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549, and 598, para tratar una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento. Determinadas modalidades se refieren al uso de un compuesto que comprende o consiste en ISIS 696844, ISIS 696845, ISIS 698969 o ISIS 698970 para tratar una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento. En determinados aspectos, la vía alternativa del complemento se activa más que lo normal. En determinados aspectos, la enfermedad es degeneración macular,

tal como degeneración macular asociada a la edad (DMAE), que puede ser DMAE húmeda o DMAE seca. En determinados aspectos, la DMAE seca puede ser atrofia geográfica. En determinados aspectos, la enfermedad es una enfermedad renal tal como nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad de depósitos densos (EDD), glomerulonefritis C3 (C3GN), nefropatía CFHR5, o síndrome urémico hemolítico atípico (aHUSs) o cualquier combinación de estos. En determinados aspectos, el compuesto o composición se le administra al sujeto de forma parenteral.

En determinadas modalidades, un compuesto o composición descrito en la presente, se administra de forma parenteral. Por ejemplo, en determinadas modalidades, el compuesto o composición se puede administrar mediante inyección o infusión. La administración parenteral incluye administración subcutánea, administración intravenosa, administración intramuscular, administración intraarterial, administración intraperitoneal o administración intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intracerebroventricular.

Compuestos antisentido

Los compuestos oligoméricos incluyen, de modo no taxativo,

oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos, compuestos antisentido, oligonucleótidos antisentido, y ARNip. Un compuesto oligomérico puede ser "antisentido" con respecto a un ácido nucleico objetivo, lo cual significa que puede someterse a hibridación con un ácido nucleico objetivo a través de un enlace de hidrógeno.

En determinadas modalidades, el compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobases que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso del segmento objetivo de un ácido nucleico objetivo al que se dirige.

En determinadas modalidades, un compuesto antisentido tiene 10 a 30 subunidades de longitud. En determinadas modalidades, un compuesto antisentido tiene 12 a 30 subunidades de longitud. En determinadas modalidades, un compuesto antisentido tiene 12 a 22 subunidades de longitud. En determinadas modalidades, un compuesto antisentido tiene 14 a 30 subunidades de longitud. En determinadas modalidades, un compuesto antisentido tiene 14 a 20 subunidades de longitud. En determinadas modalidades, un compuesto antisentido tiene 15 a 30 subunidades de longitud. En determinadas modalidades,

un compuesto antisentido tiene 15 a 20 subunidades de longitud. En determinadas modalidades, un compuesto antisentido tiene 16 a 30 subunidades de longitud. En determinadas modalidades, un compuesto antisentido tiene 16 a 20 subunidades de longitud. En determinadas modalidades, un compuesto antisentido tiene 17 a 30 subunidades de longitud. En determinadas modalidades, un compuesto antisentido tiene 17 a 20 subunidades de longitud. En determinadas modalidades, un compuesto antisentido tiene 18 a 30 subunidades de longitud. En determinadas modalidades, un compuesto antisentido tiene 18 a 21 subunidades de longitud. En determinadas modalidades, un compuesto antisentido tiene 18 a 20 subunidades de longitud. En determinadas modalidades, un compuesto antisentido tiene 20 a 30 subunidades de longitud. En otras palabras, dichos compuestos antisentido tienen una longitud de 12 a 30 subunidades unidas, 14 a 30 subunidades unidas, 14 a 20 subunidades, 15 a 30 subunidades, 15 a 20 subunidades, 16 a 30 subunidades, 16 a 20 subunidades, 17 a 30 subunidades, 17 a 20 subunidades, 18 a 30 subunidades, 18 a 20 subunidades, 18 a 21 subunidades, 20 a 30 subunidades o 12 a 22 subunidades unidas, respectivamente. En determinadas modalidades, un compuesto antisentido tiene 14 subunidades de longitud. En determinadas modalidades, un compuesto antisentido tiene 16 subunidades de longitud. En determinadas

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

En determinadas modalidades, los oligonucleótidos antisentido pueden acortarse o truncarse. Por ejemplo, puede eliminarse

una única subunidad del extremo 5' (truncado en 5') o, de manera alternativa, del extremo 3' (truncado en 3'). Un compuesto antisentido acortado o truncado dirigido a un ácido nucleico de CFB puede tener dos subunidades eliminadas del extremo 5' o, de manera alternativa, puede tener dos subunidades eliminadas del extremo 3', del compuesto antisentido. De manera alternativa, los nucleósidos eliminados se pueden dispersar a lo largo del compuesto antisentido, por ejemplo, en un compuesto antisentido que presenta un nucleósido eliminado del extremo 5' y un nucleósido eliminado del extremo 3'.

Cuando una única subunidad adicional está presente en un compuesto antisentido alargado, la subunidad adicional puede ubicarse en el extremo 5' o 3' del compuesto antisentido. Cuando dos o más subunidades adicionales están presentes, las subunidades agregadas pueden ser adyacentes entre sí, por ejemplo, en un compuesto antisentido que presenta dos subunidades agregadas al extremo 5' (adición en la posición 5') o, de manera alternativa, al extremo 3' (adición en la posición 3') del compuesto antisentido. De manera alternativa, las subunidades agregadas se pueden dispersar a lo largo del compuesto antisentido, por ejemplo, en un compuesto antisentido que presenta una subunidad agregada al

extremo 5' y una subunidad agregada al extremo 3'.

Es posible aumentar o disminuir la longitud de un compuesto antisentido, tal como un oligonucleótido antisentido, y/o introducir bases mal apareadas sin eliminar la actividad. Por ejemplo, en Woolf et ál. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992), se evaluó una serie de oligonucleótidos antisentido con una longitud de 13-25 nucleobases para determinar su capacidad de inducir la escisión de un ARN objetivo en un modelo de inyección de ovocitos. Los oligonucleótidos antisentido de 25 nucleobases de longitud con 8 u 11 bases con error de emparejamiento cercanas a los extremos de los oligonucleótidos antisentido presentaron la capacidad de dirigir la escisión específica del ARNm objetivo, aunque en menor medida que los oligonucleótidos antisentido que no contenían errores de emparejamiento. De manera similar, la escisión específica del objetivo se logró usando oligonucleótidos antisentido de 13 nucleobases, inclusive aquellos con 1 o 3 mal apareamientos.

Gautschi et ál. (*J. Natl. Cancer Inst*. 93:463-471, marzo de 2001) demostraron la capacidad de un oligonucleótido que tiene 100 % de complementariedad con el ARNm de bcl-2 y que tiene 3 errores de emparejamiento con el ARNm de bcl-xL de

reducir la expresión tanto de bcl-2 como de bcl-xL *in vitro* e *in vivo*. Además, este oligonucleótido demostró tener una potente actividad antitumoral *in vivo*.

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

Motivos y mecanismos de determinados compuestos antisentido

En determinadas modalidades, los compuestos antisentido tienen subunidades químicamente modificadas dispuestas en patrones, o motivos, para conferir propiedades a los compuestos antisentido tales como mejor actividad inhibidora, mayor afinidad de unión para un ácido nucleico objetivo o resistencia a la degradación mediante nucleasas *in vivo*.

Los compuestos antisentido quiméricos contienen normalmente al menos una región modificada a modo de conferir mayor resistencia a la degradación de nucleasas, mayor absorción celular, mayor afinidad de unión al ácido nucleico objetivo y/o mayor actividad inhibitoria. Una segunda región de un compuesto antisentido quimérico puede conferir otra propiedad deseada, por ejemplo, servir como un sustrato para la endonucleasa celular RNasa H, que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN.

La actividad antisentido puede ser el resultado de cualquier mecanismo que implica la hibridación del compuesto antisentido (por ejemplo, oligonucleótido) con un ácido nucleico objetivo, donde la hibridación da como resultado, en última instancia, un efecto biológico. En determinadas modalidades, se modula la cantidad y/o actividad del ácido nucleico objetivo. En determinadas modalidades, se reduce la cantidad y/o actividad del ácido nucleico objetivo. En determinadas modalidades, la hibridación del compuesto antisentido al ácido nucleico objetivo da como resultado, en última instancia, la degradación del ácido nucleico objetivo. En determinadas modalidades, la hibridación del compuesto antisentido al ácido nucleico objetivo no da como resultado

la degradación del ácido nucleico objetivo. En dichas determinadas modalidades, la presencia del compuesto antisentido hibridado con el ácido nucleico objetivo (ocupación) da como resultado una modulación de la actividad antisentido. En determinadas modalidades, los compuestos antisentido que tienen un motivo químico o patrón de modificaciones químicas particular son particularmente adecuados para explotar uno o más mecanismos. En determinadas modalidades, la función de los compuestos antisentido a través de más de un mecanismo y/o a través de mecanismos que no se han elucidado. Por consiguiente, los compuestos antisentido descritos en la presente no se ven limitados por ningún mecanismo en particular.

Los mecanismos antisentido incluyen, de modo no taxativo, antisentido mediado por RNasa H; mecanismos de ribointerferencia, que utilizan la vía de RISC e incluyen, de modo no taxativo, mecanismos de microARN, ARNip y ARNcs; y mecanismos basados en la ocupación. Determinados compuestos antisentido pueden actuar a través de más de uno de dichos mecanismos y/o mediante mecanismos adicionales.

Antisentido mediado por RNasa H

En determinadas modalidades, la actividad antisentido es el resultado, al menos en parte, de la degradación del ARN objetivo por RNasa H. El RNasa H es una endonucleasa que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. Es conocido en la técnica que los compuestos antisentido de cadena simple que son "similares a ADN" provocan la actividad de la RNasa H en células de mamífero. Por consiguiente, los compuestos antisentido que comprenden al menos una parte de los nucleósidos de ADN o similares a ADN pueden activar la RNasa H, lo que da como resultado en la escisión del ácido nucleico objetivo. En determinadas modalidades, los compuestos antisentido que utilizan la RNasa H comprenden uno o más nucleósidos modificados. En determinadas modalidades, dichos compuestos antisentido comprenden al menos un bloque de 1-8 nucleósidos modificados. En determinadas modalidades, los nucleósidos modificados no soportan la actividad de RNasa H. En determinadas modalidades, dichos compuestos antisentido son gapmers, como se describe en la presente. En dichas determinadas modalidades, el segmento intermedio del gapmer comprende nucleósidos de ADN. En dichas determinadas modalidades, el segmento intermedio del gapmer comprende nucleósidos similares a ADN. En dichas determinadas modalidades, el segmento intermedio del gapmer comprende nucleósidos de ADN y nucleósidos similares a ADN.

Determinados compuestos antisentido que presentan un motivo gapmer son considerados compuestos antisentido quiméricos. En un gapmer, una región interna con múltiples nucleótidos que sustentan la escisión de RNasa H se coloca entre las regiones externas con múltiples nucleótidos químicamente distintos de los nucleósidos de la región interna. En el caso de un oligonucleótido antisentido con un motivo gapmer, el segmento intermedio en general sirve como el sustrato para la escisión de endonucleasas, mientras que los segmentos de ala comprenden nucleósidos modificados. En determinadas modalidades, las regiones de un gapmer se diferencian según los tipos de restos de azúcar que comprende cada región distinta. Los tipos de restos de azúcar que son utilizados para diferenciar las regiones de un gapmer pueden, en algunas modalidades, incluir β-D-ribonucleósidos, β-D-desoxirribonucleósidos, nucleósidos modificados con 2' (dichos nucleósidos modificados con 2’ pueden incluir 2’-MOE y 2’-O-CH_3, entre otros), y nucleósidos modificados con azúcar bicíclica (dichos nucleósidos modificados con azúcar bicíclica pueden incluir aquellos que tienen un etilo limitado). En determinadas modalidades, los nucleósidos en las alas pueden incluir varios restos de azúcar modificados, lo cual incluye, por ejemplo, 2’-MOE y restos de azúcar

bicíclico tales como etilo limitado o LNA. En determinadas modalidades, las alas pueden incluir diversos restos de azúcar modificados y sin modificar. En determinadas modalidades, las alas pueden incluir diversas combinaciones de nucleósidos 2'-MOE, restos de azúcar bicíclico tales como nucleósidos de etilo limitado o nucleósidos LNA, y 2’-desoxinucleósidos.

Cada región diferenciada puede comprender restos de azúcar uniformes, variantes o alternantes. El motivo ala-espacio-ala con frecuencia se describe como “X-Y-Z”, donde "X" representa la longitud del ala 5', "Y" representa la longitud del espacio, y "Z" representa la longitud del ala 3'. “X” y “Z” pueden comprender restos de azúcar uniformes, variantes o alternantes. En determinadas modalidades, “X” e “Y” pueden incluir uno o más 2’-desoxinucleósidos.“Y” puede comprender 2’-desoxinucleósidos. Tal como se usa en la presente, un gapmer descrito como “X-Y-Z” tiene una configuración tal que el espacio está ubicado de forma inmediatamente adyacente a cada una de las alas 5' y 3'. Por lo tanto, no existen nucleótidos intervinientes entre el ala 5' y el espacio, o el espacio y el ala 3'. Cualquiera de los compuestos antisentido descritos en la presente pueden tener un motivo gapmer. En determinadas modalidades, “X” y “Z” son iguales; en otras

modalidades son diferentes. En determinadas modalidades, "Y" está entre 8 y 15 nucleósidos. X, Y o Z puede ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o más nucleósidos.

En determinadas modalidades, el compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico del CFB tiene un motivo gapmer en el que el espacio consiste en 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleósidos unidos.

En determinadas modalidades, el oligonucleótido antisentido tiene el motivo de azúcar descrito por la Fórmula A de la siguiente manera: $(J)_m$-$(B)_n$-$(J)_p$-$(B)_r$-$(A)_t$-$(D)_g$-$(A)_v$-$(B)_w$-$(J)_x$-$(B)_y$-$(J)_z$

donde:

cada A es independientemente un nucleósido sustituido en 2';

cada B es independientemente un nucleósido bicíclico;

cada J es independientemente ya sea un nucleósido sustituido en 2' o un 2'-desoxinucleósido;

cada D es un 2'-desoxinucleósido;

m es 0-4; n es 0-2; p es 0-2; r es 0-2; t es 0-2; v es 0-2; w es 0-4; x es 0-2; y es 0-2; z es 0-4; g es 6-14;

siempre y cuando:

al menos uno de m, n y r es diferente de 0;

al menos uno de w e y es diferente de 0;

la suma de m, n, p, r y t es de 2 a 5; y

la suma de v, w, x, y, y z es de 2 a 5.

Compuestos de ARNi

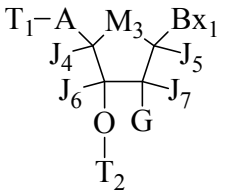
En determinadas modalidades, los compuestos antisentido son compuestos de ARN interferente (ARNi), que incluyen compuestos de ARN de cadena doble (también mencionados como ARN interferente pequeño o ARNip) o compuestos ARNi de cadena simple (o ARNcs). Dichos compuestos funcionan al menos en parte a través de la vía de RISC para degradar y/o secuestrar un ácido nucleico objetivo (por lo tanto, incluyen compuestos de microARN/mimético de microARN). En determinadas modalidades, los compuestos antisentido comprenden modificaciones que los hacen particularmente adecuados para dichos mecanismos.

i. Compuestos de ARNcs

En determinadas modalidades, los compuestos antisentido, inclusive los que son particularmente adecuados para su uso como compuestos de ARNi de cadena simple (ARNcs), comprenden un extremo 5' modificado. En dichas determinadas modalidades, el extremo 5' comprende un resto de fosfato modificado. En determinadas modalidades, dicho fosfato modificado está estabilizado (por ejemplo, resistente a la degradación/escisión en comparación con 5'-fosfato no

modificado). En determinadas modalidades, dichos nucleósidos del extremo 5' estabilizan el resto de 5'-fósforo. Determinados nucleósidos del extremo 5' pueden encontrarse en la técnica, por ejemplo, en WO/2011/139702.

En determinadas modalidades, el 5'-nucleósido de un compuesto de ARNcs tiene la Fórmula IIc:



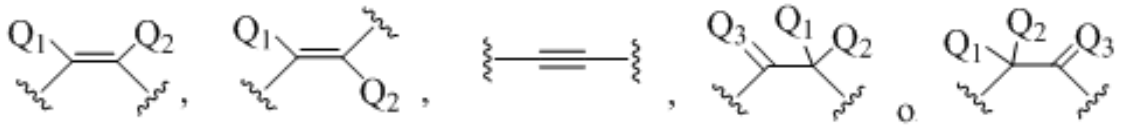
IIc

donde:

T_1 es un resto de fósforo opcionalmente protegido;

T_2 es un grupo de unión internucleósido que une el compuesto de la Fórmula IIc al compuesto oligomérico;

A tiene una de las fórmulas:



cada uno de Q_1 y Q_2 es, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6 sustituido o $N(R_3)(R_4)$;

Q_3 es O, S, $N(R_5)$ o $C(R_6)(R_7)$;

cada R_3, R_4 R_5, R_6 y R_7 es, independientemente, H, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido o alcoxi C_1-C_6;

M_3 es O, S, NR_{14}, $C(R_{15})(R_{16})$, $C(R_{15})(R_{16})C(R_{17})(R_{18})$, $C(R_{15})=C(R_{17})$, $OC(R_{15})(R_{16})$ u $OC(R_{15})(Bx_2)$;

R_{14} es H, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido;

cada uno de R_{15}, R_{16}, R_{17} y R_{18} es independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido;

Bx_1 es un resto de base heterocíclica;

o, si Bx_2 se encuentra presente, Bx_2 es un resto de base heterocíclica y Bx_1 es H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido;

cada uno de J_4, J_5, J_6 y J_7 es, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido;

o J_4 forma un puente con uno de J_5 o J_7, donde dicho puente comprende de 1 a 3 grupos birradicales enlazados seleccionados de O, S, NR_{19}, $C(R_{20})(R_{21})$, $C(R_{20})=C(R_{21})$,

$C[=C(R_{20})(R_{21})]$ y C(=O) y cada uno de los otros dos de J_5, J_6 y J_7 es, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido;

cada uno de R_{19}, R_{20} y R_{21} es, independientemente, H, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 sustituido;

G es H, OH, halógeno u $O-[C(R_8)(R_9)]_n-[(C=O)_m-X_1]_j-Z$;

cada R_8 y R_9 es, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido;

X_1 es O, S o $N(E_1)$;

Z es H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6 sustituido o $N(E_2)(E_3)$;

cada uno de E_1, E_2 y E_3 es, independientemente, H, alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido;

n es de 1 a alrededor de 6;

m es 0 o 1;

j es 0 o 1;

cada grupo sustituido comprende uno o más grupos sustituyentes opcionalmente protegidos, que se seleccionan independientemente de halógeno, OJ_1, $N(J_1)(J_2)$, $=NJ_1$, SJ_1, N_3,

CN, $OC(=X_2)J_1$, $OC(=X_2)N(J_1)(J_2)$ y $C(=X_2)N(J_1)(J_2)$;

X_2 es O, S o NJ_3;

cada J_1, J_2 y J_3 es, independientemente, H o alquilo C_1-C_6;

cuando j es 1, Z no es halógeno ni $N(E_2)(E_3)$; y

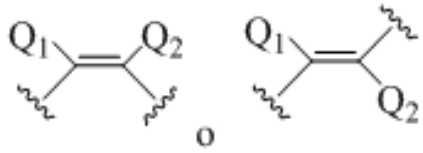
donde dicho compuesto oligomérico comprende de 8 a 40 subunidades monoméricas y es hibridable con al menos una parte de un ácido nucleico objetivo.

En determinadas modalidades, M_3 es O, CH=CH, OCH_2 u $OC(H)(Bx_2)$. En determinadas modalidades, M_3 es O.

En determinadas modalidades, J_4, J_5, J_6 y J_7 son cada uno H.

En determinadas modalidades, J_4 forma un puente con uno de J_5 o J_7.

En determinadas modalidades, A tiene una de las fórmulas:

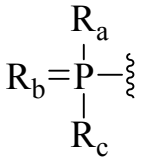


donde:

cada uno de Q_1 y Q_2 es, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6 o alcoxi

C_1-C_6 sustituido. En determinadas modalidades, cada uno de Q_1 y Q_2 es H. En determinadas modalidades, cada uno de Q_1 y Q_2 es, independientemente, H o halógeno. En determinadas modalidades, Q_1 y Q_2 son H y el otro de Q_1 y Q_2 es F, CH_3 u OCH_3.

En determinadas modalidades, T_1 tiene la fórmula:



donde:

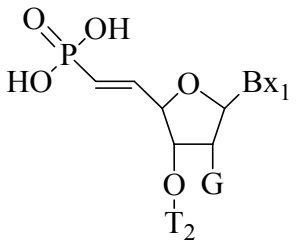
cada uno de R_a y R_c es, independientemente, hidroxilo protegido, tiol protegido, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alcoxi C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6 sustituido, amino protegido o amino sustituido; y

R_b es O o S. En determinadas modalidades, R_b es O y cada uno de R_a y R_c es, independientemente, OCH_3, OCH_2CH_3 o $CH(CH_3)_2$.

En determinadas modalidades, G es halógeno, OCH_3, OCH_2F, $OCHF_2$, OCF_3, OCH_2CH_3, $O(CH_2)_2F$, OCH_2CHF_2, OCH_2CF_3, OCH_2-$CH=CH_2$, $O(CH_2)_2$-OCH_3, $O(CH_2)_2$-SCH_3, $O(CH_2)_2$-OCF_3, $O(CH_2)_3$-$N(R_{10})(R_{11})$, $O(CH_2)_2$-$ON(R_{10})(R_{11})$, $O(CH_2)_2$-$O(CH_2)_2$-$N(R_{10})(R_{11})$, $OCH_2C(=O)$-$N(R_{10})(R_{11})$, $OCH_2C(=O)$-$N(R_{12})$-$(CH_2)_2$-$N(R_{10})(R_{11})$ u $O(CH_2)_2$-$N(R_{12})$-

$C(=NR_{13})[N(R_{10})(R_{11})]$ donde cada uno de R_{10}, R_{11}, R_{12} y R_{13} es, independientemente, H o alquilo C_1-C_6. En determinadas modalidades, G es halógeno, OCH_3, OCF_3, OCH_2CH_3, OCH_2CF_3, OCH_2-$CH=CH_2$, $O(CH_2)_2$-OCH_3, $O(CH_2)_2$-$O(CH_2)_2$-$N(CH_3)_2$, $OCH_2C(=O)$-$N(H)CH_3$, $OCH_2C(=O)$-$N(H)$-$(CH_2)_2$-$N(CH_3)_2$ u OCH_2-$N(H)$-$C(=NH)NH_2$. En determinadas modalidades, G es F, OCH_3 u $O(CH_2)_2$-OCH_3. En determinadas modalidades, G es $O(CH_2)_2$-OCH_3.

En determinadas modalidades, el nucleósido del extremo 5' tiene la Fórmula IIe:



IIe

En determinadas modalidades, los compuestos antisentido, que incluyen los particularmente adecuados para ARNcs comprenden uno o más tipos de restos de azúcar modificados y/o restos de azúcar de origen natural dispuestos a lo largo de un oligonucleótido o región de este en un patrón definido o motivo de modificación de azúcar. Dichos motivos pueden incluir cualquiera de las modificaciones de azúcar descritas en la presente y/u otras modificaciones de azúcar conocidas.

En determinadas modalidades, los oligonucleótidos comprenden o consisten en una región que tiene modificaciones uniformes de azúcar. En determinadas modalidades, cada nucleósido de la región comprende la misma modificación de azúcar similar a ARN. En determinadas modalidades, cada nucleósido de la región es un nucleósido 2'-F. En determinadas modalidades, cada nucleósido de la región es un nucleósido 2'-OMe. En determinadas modalidades, cada nucleósido de la región es un nucleósido 2'-MOE. En determinadas modalidades, cada nucleósido de la región es un nucleósido cEt. En determinadas modalidades, cada nucleósido de la región es un nucleósido LNA. En determinadas modalidades, la región uniforme constituye la totalidad o esencialmente la totalidad del oligonucleótido. En determinadas modalidades, la región constituye la totalidad del oligonucleótido, excepto por los nucleósidos 1-4 terminales.

En determinadas modalidades, los oligonucleótidos comprenden una o más regiones de modificaciones de azúcar alternadas, donde los nucleósidos alternados entre nucleótidos que tienen una modificación de azúcar de un primer tipo y nucleótidos que tienen una modificación de azúcar de un segundo tipo. En determinadas modalidades, los nucleósidos de ambos tipos son

nucleósidos de tipo ARN. En determinadas modalidades, los nucleósidos alternados se seleccionan de: 2'-OMe, 2'-F, 2'-MOE, LNA y cEt. En determinadas modalidades, las modificaciones alternadas son 2'-F y 2'-OMe. Dichas regiones pueden ser contiguas o pueden ser interrumpidas por nucleósidos conjugados o nucleósidos modificados de manera diferente.

En determinadas modalidades, en la región alternada de modificaciones alternadas, cada una consiste en un único nucleósido (es decir, el patrón es $(AB)_xA_y$, donde A es un nucleósido que tiene una modificación de azúcar de un primer tipo y B es un nucleósido que tiene una modificación de azúcar de un segundo tipo; x es 1-20 e y es 0 o 1). En determinadas modalidades, una o más regiones alternadas en un motivo alternado incluyen más que un único nucleósido de un tipo. Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden incluir una o más regiones de cualquiera de los siguientes motivos de nucleósidos:

AABBAA;

ABBABB;

AABAAB;

ABBABAABB;

ABABAA;

AABABAB;

ABABAA;

ABBAABBABABAA;

BABBAABBABABAA; o

ABABBAABBABABAA;

donde A es un nucleósido de un primer tipo y B es un nucleósido de un segundo tipo. En determinadas modalidades, cada uno de A y B se selecciona de 2'-F, 2'-OMe, BNA y MOE.

En determinadas modalidades, los oligonucleótidos que tienen dicho motivo alternado también comprenden un nucleósido del extremo 5', tal como los de la fórmula IIc o IIe.

En determinadas modalidades, los oligonucleótidos comprenden una región que tiene un motivo 2-2-3. Dichas regiones comprenden el siguiente motivo:

$-(A)_2-(B)_x-(A)_2-(C)_y-(A)_3-$

donde: A es un primer tipo de nucleósido modificado;

B y C son nucleósidos que están modificados de manera diferente que A, sin embargo, B y C pueden tener el mismo tipo de modificación o uno diferente;

x e y son de 1 a 15.

En determinadas modalidades, A es un nucleósido modificado

2'-OMe. En determinadas modalidades, B y C son ambos nucleósidos modificados 2'-F. En determinadas modalidades, A es un nucleósido modificado 2'-OMe, y B y C son ambos nucleósidos modificados 2'-F.

En determinadas modalidades, los oligonucleósidos tienen el siguiente motivo de azúcar:

5’- (Q)- $(AB)_xA_y$-$(D)_z$

donde:

Q es un nucleósido que comprende un resto fosfato estabilizado. En determinadas modalidades, Q es un nucleósido que tiene la Fórmula IIc o IIe;

A es un primer tipo de nucleósido modificado;

B es un segundo tipo de nucleósido modificado;

D es un nucleósido modificado que comprende una modificación diferente del nucleósido adyacente a esta. Por lo tanto, si y es 0, entonces D debe estar modificado de manera diferente que B, y si y es 1, entonces D debe estar modificado de manera diferente que A. En determinadas modalidades, D es distinto de A y B.

X es 5-15;

Y es 0 o 1;

Z es 0-4.

En determinadas modalidades, los oligonucleósidos tienen el siguiente motivo de azúcar:

5'- (Q)- $(A)_x$-$(D)_z$

donde:

Q es un nucleósido que comprende un resto fosfato estabilizado. En determinadas modalidades, Q es un nucleósido que tiene la Fórmula IIc o IIe;

A es un primer tipo de nucleósido modificado;

D es un nucleósido modificado que comprende una modificación diferente de A.

X es 11-30;

Z es 0-4.

En determinadas modalidades, A, B, C y D en los motivos anteriores se selecciona de: 2'-OMe, 2'-F, 2'-MOE, LNA y cEt. En determinadas modalidades, D representa nucleósidos terminales. En determinadas modalidades, dichos nucleósidos terminales no están diseñados para hibridarse al ácido nucleico objetivo (aunque uno o más pueden hibridarse por casualidad). En determinadas modalidades, la nucleobase de cada nucleósido D es adenina, sin importar la identidad de la nucleobase en la posición correspondiente del ácido nucleico objetivo. En determinadas modalidades, la nucleobase de cada nucleósido D es timina.

En determinadas modalidades, los compuestos antisentido, inclusive los que son particularmente adecuados para su uso como ARNcs comprenden uniones internucleósido modificadas dispuestas a lo largo del oligonucleótido o región de este en un patrón definido o motivo de unión internucleósido modificado. En determinadas modalidades, los oligonucleótidos comprenden una región con un motivo alternado de unión internucleósido. En determinadas modalidades, los oligonucleótidos comprenden una región de enlaces internucleósido modificados de manera uniforme. En algunas de estas modalidades, el oligonucleótido comprende una región que está unida de manera uniforme mediante enlaces internucleósido fosforotioato. En determinadas modalidades, el oligonucleótido está unido de manera uniforme mediante uniones internucleósido fosforotioato. En determinadas modalidades, cada unión internucleósido del oligonucleótido se selecciona de fosfodiéster y fosforotioato. En determinadas modalidades, cada unión internucleósido del oligonucleótido se selecciona de fosfodiéster y fosforotioato y al menos una unión internucleósido es fosforotioato.

En determinadas modalidades, el oligonucleótido comprende al menos 6 uniones internucleósido fosforotioato. En

determinadas modalidades, el oligonucleótido comprende al menos 8 uniones internucleósido fosforotioato. En determinadas modalidades, el oligonucleótido comprende al menos 10 uniones internucleósido fosforotioato. En determinadas modalidades, el oligonucleótido comprende al menos un bloque de al menos 6 uniones internucleósido fosforotioato consecutivas. En determinadas modalidades, el oligonucleótido comprende al menos un bloque de al menos 8 uniones internucleósido fosforotioato consecutivas. En determinadas modalidades, el oligonucleótido comprende al menos un bloque de al menos 10 uniones internucleósido fosforotioato consecutivas. En determinadas modalidades, el oligonucleótido comprende al menos un bloque de al menos 12 uniones internucleósido fosforotioato consecutivas. En algunas de estas modalidades, al menos uno de dichos bloques está ubicado en el extremo 3' del oligonucleótido. En algunas de estas modalidades, al menos uno de dichos bloques está ubicado dentro de 3 nucleósidos del extremo 3' del oligonucleótido.

Los oligonucleótidos que tienen cualquiera de los diversos motivos de azúcar descritos en la presente pueden tener cualquier motivo de enlace. Por ejemplo, los oligonucleótidos, inclusive, de modo no taxativo, los

descritos anteriormente, pueden tener un motivo de enlace seleccionado de la tabla no taxativa a continuación:

Enlace más cercano a 5'	Región central	Región 3'
PS	PO/PS alternado	6 PS
PS	PO/PS alternado	7 PS
PS	PO/PS alternado	8 PS

ii. Compuestos de ARNip

En determinadas modalidades, los compuestos antisentido son compuestos de ARNi de cadena doble (ARNip). En dichas modalidades, una o ambas cadenas puede comprender cualquier motivo de modificación descrito anteriormente para ARNcs. En determinadas modalidades, los compuestos de ARNcs pueden ser ARN no modificado. En determinadas modalidades, los compuestos de ARNip pueden comprender nucleósidos de ARN no modificado y enlaces internucleósido modificados.

Varias modalidades se refieren a composiciones de cadena doble, donde cada cadena comprende un motivo definido por la ubicación de uno o más nucleósidos modificados o no modificados. En determinadas modalidades, se proporcionan

composiciones que comprenden un primer y segundo compuesto oligomérico que está completa o al menos parcialmente hibridado para formar una región de dúplex y que comprende además una región que se hibrida con un ácido nucleico objetivo y es complementaria a este. Es adecuado que dicha composición comprenda un primer compuesto oligomérico que sea una cadena antisentido que tenga complementariedad completa o parcial a un ácido nucleico objetivo y un segundo compuesto oligomérico que sea una cadena sentido que tenga una o más regiones que forman al menos una región de dúplex con el primer compuesto oligomérico y sean complementarias a esta.

Las composiciones de varias modalidades modulan la expresión génica mediante la hibridación a un objetivo de ácido nucleico que da como resultado la pérdida de su función normal. En algunas modalidades, el ácido nucleico objetivo es CFB. En determinadas modalidades, la degradación del CFB dirigido se facilita mediante un complejo de RISC activado que se forma con composiciones de la invención.

Varias modalidades se refieren a composiciones de cadena doble, donde una de las cadenas es útil, por ejemplo, para influir en la carga preferencial de la cadena opuesta en el complejo de RISC (o escisión). Las composiciones son útiles

para dirigirse a moléculas de ácido nucleico seleccionadas y modular la expresión de uno o más genes. En algunas modalidades, las composiciones de la presente invención se hibridan a una parte de un ARN objetivo, lo cual da como resultado la pérdida de la función normal del ARN objetivo.

Determinadas modalidades se refieren a composiciones de cadena doble, donde ambas cadenas comprenden un motivo hemimer, un motivo completamente modificado, un motivo modificado de manera posicional o un motivo alternante. Cada cadena de las composiciones de la presente invención puede ser modificada para cumplir con un papel particular en, por ejemplo, la vía de ARNip. Mediante la utilización de diferentes motivos en cada cadena o el mismo motivo con diferentes modificaciones químicas en cada cadena, se permite el direccionamiento de la cadena antisentido para el complejo de RISC, a la vez que se inhibe la incorporación de la cadena sentido. Dentro de este modelo, cada cadena puede modificarse de manera independiente, de manera que sea mejorada para su papel particular. La cadena antisentido puede modificarse en el extremo 5' para mejorar su papel en una región de RISC, mientras que el extremo 3' puede modificarse de manera diferente para mejorar su papel en una región diferente de RISC.

Las moléculas de oligonucleótido de cadena doble pueden ser una molécula de polinucleótido de cadena doble que comprende regiones autocomplementarias sentido y antisentido, donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico objetivo o una parte de esta y la región sentido que tiene una secuencia de nucleótidos que corresponde a la secuencia de ácido nucleico objetivo o una parte de esta. Las moléculas de oligonucleótido de cadena doble pueden ensamblarse a partir de dos oligonucleótidos separados, donde una cadena es la cadena sentido y la otra es la cadena antisentido, donde las cadenas sentido y antisentido son autocomplementarias (es decir, cada cadena comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en la otra cadena; tal como cuando la cadena antisentido y la cadena sentido forman un dúplex o estructura de cadena doble, por ejemplo, donde la región de cadena doble es de alrededor de 15 a alrededor de 30, por ejemplo, alrededor de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 pares de bases; la cadena antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico objetivo o una

parte de esta y la cadena sentido comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a la secuencia de ácido nucleico objetivo o una parte de esta (por ejemplo, alrededor de 15 a alrededor de 25 o más nucleótidos de la molécula de oligonucleótido de cadena doble son complementarios al ácido nucleico objetivo o una parte de este). De manera alternativa, el oligonucleótido de cadena doble se ensambla a partir de un oligonucleótido de cadena simple, donde las regiones autocomplementarias sentido y antisentido del ARNip están enlazadas por medio de uno o más enlazadores basados en ácido nucleico o no basados en ácido nucleótido.

El oligonucleótido de cadena doble puede ser un polinucleótido con una estructura de dúplex, dúplex asimétrico, horquilla u horquilla asimétrica, que tiene regiones autocomplementarias sentido y antisentido, donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico objetivo separada o una parte de esta, y la región sentido tiene una secuencia de nucleótidos que corresponde a la secuencia de ácido nucleico objetivo o una parte de esta. El oligonucleótido de cadena doble puede ser un polinucleótido de cadena doble circular que tiene dos o más estructuras de bucle y un tallo que comprende regiones

autocomplementarias sentido y antisentido, donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico objetivo o una parte de esta y la región sentido que tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico objetivo o una parte de esta, y donde el polinucleótido circular puede ser procesado ya sea in vivo o in vitro para generar una molécula de ARNip activa capaz de mediar ARNi.

En determinadas modalidades, el oligonucleótido de cadena doble comprende secuencias o regiones sentido y antisentido separadas, donde las regiones sentido y antisentido están unidas covalentemente mediante moléculas enlazadoras nucleótidos o que no son nucleótidos, tal como se conoce en la técnica, o están unidas no covalentemente de manera alternativa mediante interacciones iónicas, enlace de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones hidrofóbicas y/o interacciones de apilamiento. En determinadas modalidades, el oligonucleótido de cadena doble comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de un gen objetivo. En otra modalidad, el oligonucleótido de cadena doble interactúa con una secuencia de nucleótidos de un gen objetivo de una manera

que produce la inhibición de la expresión del gen objetivo.

Tal como se usa en la presente, no es necesario que los oligonucleótidos de cadena doble se limiten a las moléculas que contienen ARN solamente, sino que también comprenden nucleótidos modificados o no nucleótidos. En determinadas modalidades, las moléculas de ácido nucleico interferente pequeño carecen de nucleótidos que contengan 2'-hidroxi (2'-OH). En determinadas modalidades, los ácidos nucleicos interferentes pequeños opcionalmente no incluyen ningún ribonucleótido (por ejemplo, nucleótidos que tengan un grupo 2'-OH). Dichos oligonucleótidos de cadena doble que no necesitan la presencia de ribonucleótidos dentro de la molécula para sustentar ARNi pueden, sin embargo, tener uno o más enlazadores unidos u otros grupos, restos, o cadenas asociadas o acopladas que contengan uno o más nucleótidos con grupos 2'-OH. Opcionalmente, los oligonucleótidos de cadena doble pueden comprender ribonucleótidos en alrededor de 5, 10, 20, 30, 40 o 50 % de las posiciones de nucleótidos. Tal como se usa en la presente, se pretende que el término ARNip sea equivalente a otros términos usados para describir moléculas de ácido nucleico que sean capaces de mediar ARNi específico de secuencia, por ejemplo, ARN interferente pequeño (ARNip), ARN de cadena doble (ARNcd), micro-ARN

(miARN), ARN de horquilla pequeña (ARNhp), oligonucleótido interferente pequeño, ácido nucleico interferente pequeño, oligonucleótido modificado pequeño, ARNip modificado químicamente, ARN de silenciamiento génico postranscripcional (ptgsRNA) y otros. Además, tal como se usa en la presente, se pretende que el término ARNi sea equivalente a otros términos utilizados para definir la interferencia de ARN específico de secuencia, tal como silenciamiento génico postranscripcional, inhibición transcripcional o epigenética. Por ejemplo, los oligonucleótidos de cadena doble pueden usarse para silenciar epigenéticamente genes tanto a nivel postranscripcional como a nivel pretranscripcional. En un ejemplo no taxativo, la regulación epigenética de la expresión génica mediante moléculas de ARNip de la invención pueden surgir de modificación mediada por ARNip de la estructura de cromatina o patrón de metilación para alterar la expresión genética (ver, por ejemplo, Verdel et ál., 2004, Science, 303, 672-676; Pal-Bhadra et ál., 2004, Science, 303, 669-672; Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et ál., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218; y Hall et ál., 2002, Science, 297, 2232-2237).

Se contempla que los compuestos y composiciones de las diversas modalidades proporcionadas en la presente pueden

dirigirse a CFB mediante un mecanismo de ARNi o silenciamiento génico mediado por ARNcd, inclusive, por ejemplo, moléculas efectoras de ARN de cadena doble de tallo-bucle u "horquilla" en las cuales una cadena simple de ARN con secuencias autocomplementarias sea capaz de asumir una conformación de cadena doble, o moléculas efectoras de ARNcd en dúplex que comprendan dos cadenas separadas de ARN. En varias modalidades, el ARNcd consiste completamente en ribonucleótidos o consiste en una mezcla de ribonucleótidos y desoxinucleótidos, tal como híbridos de ARN/ADN descritos, por ejemplo, en WO 00/63364, presentada el 19 de abril de 2000, o el n.º de serie estadounidense 60/130,377, presentado el 21 de abril de 1999. El ARNcd o molécula efectora de ARNcd puede ser una molécula simple con una región de autocomplementariedad, de manera que los nucleótidos en un segmento de la molécula formen pares de bases con los nucleótidos en otro segmento de la molécula. En varias modalidades, el ARNcd que consiste en una molécula simple consiste completamente en ribonucleótidos o incluye una región de ribonucleótidos que es complementaria a una región de desoxirribonucleótidos. De manera alternativa, el ARNcd puede incluir dos cadenas diferentes que tienen una región de complementariedad entre ambas.

En varias modalidades, ambas cadenas consisten completamente en ribonucleótidos, una cadena consiste completamente en ribonucleótidos y una cadena consiste completamente en desoxirribonucleótidos, o una o ambas cadenas contienen una mezcla de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. En determinadas modalidades, las regiones de complementariedad son al menos 70, 80, 90, 95, 98 o 100 % complementarias entre sí y a una secuencia de ácido nucleico objetivo. En determinadas modalidades, la región del ARNcd que está presente en una conformación de cadena doble incluye al menos 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 50, 75,100, 200, 500, 1000, 2000 o 5000 nucleótidos o incluye todos los nucleótidos en un ADNc u otra secuencia de ácido nucleico objetivo representada en el ARNcd. En algunas modalidades, el ARNcd no contiene regiones de cadena simple, tales como extremos de cadena simple, o el ARNcd es una horquilla. En otras modalidades, el ARNcd tiene uno o más excedentes o regiones de cadena simple. En determinadas modalidades, los híbridos de ARN/ADN incluyen una región o cadena de ADN que es una región o cadena antisentido (por ejemplo, tiene al menos 70, 80, 90, 95, 98 o 100 % de complementariedad a un ácido nucleico objetivo) o una región o cadena de ARN que es una región o cadena de sentido (por ejemplo, tiene al menos 70, 80, 90, 95, 98 o 100 % de identidad con un ácido nucleico

objetivo), y viceversa.

En varias modalidades, el híbrido ARN/ADN se hace in vitro mediante métodos sintéticos químicos o enzimáticos tales como aquellos descritos en la presente o aquellos descritos en WO 00/63364, presentado el 19 de abril de 2000, o el n.° de serie estadounidense 60/130,377, presentado el 21 de abril de 1999. En otras modalidades, una cadena de ADN sintetizada in vitro forma complejos con una cadena de ARN hecha in vivo o in vitro antes, después o simultáneamente a la transformación de la cadena de ADN en la célula. En aun otras modalidades, el ARNcd es un ácido nucleico circular simple que contiene una región de sentido y antisentido, o el ARNcd incluye un ácido nucleico circular y un segundo ácido nucleico circular o un ácido nucleico lineal (ver, por ejemplo, WO 00/63364, presentado el 19 de abril de 2000, o el n.° de serie estadounidense 60/130,377, presentado el 21 de abril de 1999). Los ejemplos de ácidos nucleicos circulares incluyen estructuras en lazo en las cuales el grupo fosforilo libre 5' de un nucleótido se une al grupo hidroxilo 2' de otro nucleótido en forma de bucle de retorno.

En otras modalidades, el ARNcd incluye uno o más nucleótidos modificados en los cuales la posición 2' en el azúcar

contiene un halógeno (tal como grupo flúor) o contiene un grupo alcoxi (tal como un grupo metoxi) que aumenta la semivida del ARNcd in vitro o in vivo en comparación con el ARNcd correspondiente en el cual la posición 2' correspondiente contiene un grupo hidroxilo o hidrógeno. En aun otras modalidades, el ARNcd incluye uno o más enlaces entre nucleótidos adyacentes que no son un enlace fosfodiéster de origen natural. Los ejemplos de dichas uniones incluyen uniones fosforamida, fosforotioato y fosforoditioato. Los ARNcd también pueden ser moléculas de ácido nucleico modificadas químicamente, tal como se aprecia en la patente estadounidense n.° 6,673,661. En otras modalidades, el ARNcd contiene una o dos cadenas con casquete, tal como se describe, por ejemplo, en WO 00/63364, presentado el 19 de abril de 2000, o el n.° de serie estadounidense 60/130,377, presentado el 21 de abril de 1999. En otras modalidades, ARNcd puede ser cualquiera de las moléculas de ARNcd al menos parciales descritas en WO 00/63364, así como cualquiera de las moléculas de ARNcd descritas en la solicitud provisional estadounidense 60/399,998; y la solicitud provisional estadounidense 60/419,532 y PCT/US2003/033466, las enseñanzas de las cuales se incorporan a la presente mediante esta referencia. Cualquiera de los ARNcd puede expresarse in vitro o in vivo

mediante el uso de los métodos descritos en la presente o métodos estándar, tales como los descritos en WO 00/63364.

Ocupación

En determinadas modalidades, no se espera que los compuestos antisentido den como resultado la escisión o el ácido nucleico objetivo mediante RNasa H o den como resultado la escisión o el secuestro a través de una vía RISC. En dichas determinadas modalidades, la actividad antisentido puede ser el resultado de la ocupación, donde la presencia del compuesto antisentido hibridado altera la actividad del ácido nucleico objetivo. En dichas determinadas modalidades, el compuesto antisentido puede ser modificado de forma uniforme o puede comprender una mezcla de modificaciones y/o nucleósidos modificados o no modificados.

Ácidos nucleicos objetivo, secuencias de nucleótidos y regiones objetivo

Las secuencias de nucleótidos que codifican el Factor B del complemento (CFB) incluyen, de modo no taxativo, las siguientes: n.° de acceso de GENBANK NM_001710.5 (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 1) n.° de acceso de GENBANK NT_007592.15 truncado a partir de los nucleótidos 31852000 hasta 31861000 (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 2) n.° de acceso de GENBANK NW_001116486.1 truncado a partir de los nucleótidos 536000 hasta 545000 (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 3), n.° de acceso de GENBANK XM_001113553.2 (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 4), o n.° de acceso de GENBANK NM_008198.2 (incorporada en la presente como SEQ ID NO: 5).

Hibridación

En algunas modalidades, la hibridación ocurre entre un compuesto antisentido descrito en la presente y un ácido nucleico de CFB. El mecanismo más común de hibridación implica enlaces de hidrógeno (por ejemplo, enlaces de hidrógeno Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso) entre nucleobases complementarias de las moléculas de ácido

nucleico.

La hibridación puede ocurrir en condiciones variables. Las condiciones rigurosas dependen de las secuencia y se determinan según la naturaleza y la composición de las moléculas de ácido nucleico que se desea hibridar.

Se conocen en la técnica métodos para determinar si una secuencia puede hibridarse de manera específica con un ácido nucleico objetivo. En determinadas modalidades, los compuestos antisentido proporcionados en la presente pueden hibridarse de manera específica con un ácido nucleico de CFB.

Complementariedad

Un compuesto antisentido y un ácido nucleico objetivo son complementarios entre sí cuando una cantidad suficiente de nucleobases del compuesto antisentido puede unirse mediante un enlace de hidrógeno con las nucleobases correspondientes del ácido nucleico objetivo, de manea que se produzca el efecto deseado (por ejemplo, la inhibición antisentido de un ácido nucleico objetivo, tal como un ácido nucleico de CFB). Las nucleobases no complementarias entre un compuesto antisentido y un ácido nucleico de CFB pueden tolerarse

siempre que el compuesto antisentido siga teniendo la capacidad de hibridarse de manera específica con un ácido nucleico objetivo. Además, un compuesto antisentido puede hibridarse en uno o más segmentos de un ácido nucleico de CFB, de manera que los segmentos intervinientes o adyacentes no se vean implicados en el evento de hibridación (por ejemplo, una estructura de bucle, malapareamiento o estructura de horquilla).

En determinadas modalidades, los compuestos antisentido proporcionados en la presente o una parte específica de estos son o son al menos 70 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % complementarios a un ácido nucleico de CFB, una región objetivo, un segmento objetivo o una parte específica de estos. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con un ácido nucleico objetivo se puede determinar mediante métodos de rutina.

Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de 20 nucleobases del compuesto antisentido son complementarias a una región objetivo y que, por lo tanto, se hibridarían de manera específica, representarían un 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, las nucleobases no

complementarias restantes pueden ser agrupadas o intercaladas con nucleobases complementarias y no necesitan ser contiguas las unas de las otras o ser nucleobases complementarias. Como tal, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleobases de longitud, que posee cuatro nucleobases no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico objetivo tendrían 77.8% de complementariedad global con el ácido nucleico objetivo y, por lo tanto, quedaría dentro del alcance de la presente invención. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico objetivo puede ser determinado de forma rutinaria mediante programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineación local básica) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul et ál., J. Mol. *Biol*., 1990, 215, 403 410; Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7, 649 656). El porcentaje de homología, la identidad de secuencia o la complementariedad se pueden determinar, por ejemplo, mediante el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.) con una configuración predeterminada, que utiliza el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482 489).

En determinadas modalidades, los compuestos antisentido

proporcionados en la presente o partes específicas de estos son totalmente complementarios (es decir, 100% complementarios) con un ácido nucleico objetivo o una parte específica de este. Por ejemplo, un compuesto antisentido puede ser completamente complementario a un ácido nucleico de CFB o una región objetivo o un segmento objetivo o secuencia objetivo de este. Tal como se usa en la presente, "completamente complementario" significa que cada nucleobase de un compuesto antisentido tiene la capacidad de realizar un emparejamiento de bases preciso con las nucleobases correspondientes de un ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, un compuesto antisentido de 20 nucleobases es completamente complementario de una secuencia objetivo con una longitud de 400 nucleobases, siempre que haya una parte de 20 nucleobases correspondiente del ácido nucleico objetivo completamente complementaria del compuesto antisentido. La complementariedad completa también puede utilizarse en relación con una parte específica del primer y/o el segundo ácido nucleico. Por ejemplo, una parte de 20 nucleobases de un compuesto antisentido de 30 nucleobases puede ser “completamente complementaria” de una secuencia objetivo con una longitud de 400 nucleobases. La parte de 20 nucleobases del oligonucleótido de 30 nucleobases es completamente complementaria de la secuencia objetivo si la secuencia

objetivo tiene una parte de 20 nucleobases correspondiente en la que cada nucleobase es complementaria de la parte de 20 nucleobases del compuesto antisentido. Al mismo tiempo, todo el compuesto antisentido de 30 nucleobases puede ser o no ser completamente complementario a la secuencia objetivo, dependiendo de si las 10 nucleobases restantes del compuesto antisentido también son complementarias a la secuencia objetivo.

La ubicación de una nucleobase no complementaria puede encontrarse en el extremo 5’ o extremo 3’ del compuesto antisentido. De manera alternativa, la nucleobase o las nucleobases no complementarias pueden estar en una posición interna del compuesto antisentido. Cuando dos o más nucleobases no complementarias están presentes, pueden ser contiguas (es decir, estar enlazadas) o no contiguas. En una modalidad, una nucleobase no complementaria se ubica en el segmento de ala de un oligonucleótido antisentido gapmer.

En determinadas modalidades, los compuestos antisentido que tiene una longitud de o de de hasta 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases comprenden no más de 4, no más de 3, no más de 2 o no más de 1 nucleobase no complementaria en relación con un ácido nucleico objetivo, como un ácido

nucleico de CFB o una parte específica de este.

En determinadas modalidades, los compuestos antisentido que tienen una longitud de o de hasta 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleobases comprenden no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2 o no más de 1 nucleobase no complementaria en relación con un ácido nucleico objetivo, como un ácido nucleico de CFB o una parte específica de este.

Los compuestos antisentido proporcionados también incluyen los que son complementarios a una parte de un ácido nucleico objetivo. Como se usa en la presente, "parte" se refiere a un número definido de nucleobases contiguas (es decir, unidas) dentro de una región o segmento de un ácido nucleico diana. Una "parte" también puede referirse a un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido. En determinadas modalidades, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una parte de 8 nucleobases de un segmento objetivo. En determinadas modalidades, los compuestos antisentido son complementarios a al menos una parte de 9 nucleobases de un segmento objetivo. En determinadas modalidades, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una parte de 10 nucleobases de un

segmento objetivo. En determinadas modalidades, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una parte de 11 nucleobases de un segmento objetivo. En determinadas modalidades, los compuestos antisentido son complementarios a al menos una parte de 12 nucleobases de un segmento objetivo. En determinadas modalidades, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una parte de 13 nucleobases de un segmento objetivo. En determinadas modalidades, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una parte de 14 nucleobases de un segmento objetivo. En determinadas modalidades, los compuestos antisentido son complementarios de al menos una parte de 15 nucleobases de un segmento objetivo. También se contemplan compuestos antisentido que son complementarios a al menos una parte de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleobases de un segmento objetivo o un intervalo definido por dos cualesquiera de estos valores.

Identidad

Los compuestos antisentido proporcionados en la presente también pueden tener un porcentaje de identidad definido a una secuencia de nucleótidos en particular, SEQ ID NO o compuesto representado por un número Isis específico o parte

de este. Tal como se usa en la presente, un compuesto antisentido es idéntico a la secuencia descrita en la presente si tiene la misma capacidad de formar pares de bases. Por ejemplo, un ARN que contiene uracilo en lugar de timidina en una secuencia de ADN descrita se consideraría idéntico a la secuencia de ADN, ya que tanto el uracilo como la timidina se emparejan con la adenina. También se contemplan las versiones acotadas o alargadas de los compuestos antisentido descritos en la presente, así como los compuestos que tienen bases no idénticas con relación a los compuestos antisentido proporcionados en la presente. Las bases no idénticas pueden ser adyacentes entre sí o estar dispersas en todo el compuesto antisentido. El porcentaje de identidad de un compuesto antisentido se calcula según la cantidad de bases con emparejamientos de bases idénticos con relación a la secuencia con la que se compara.

En determinadas modalidades, los compuestos antisentido o partes de estos son al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticos a uno o más de los compuestos antisentido o SEQ ID NO, o una parte de estos, descritos en la presente.

En determinadas modalidades, una parte del compuesto

antisentido se compara con una parte de igual longitud del ácido nucleico objetivo. En determinadas modalidades una parte de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleobases se compara con una parte de igual longitud del ácido nucleico objetivo.

En determinadas modalidades, una parte del oligonucleótido antisentido se compara con una parte de igual longitud del ácido nucleico objetivo. En determinadas modalidades una parte de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleobases se compara con una parte de igual longitud del ácido nucleico objetivo.

Modificaciones

Un nucleósido es una combinación de azúcar y una base. La parte de nucleobase (también conocida como "base") del nucleósido es comúnmente un resto de base heterocíclico. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la parte de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyan un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede enlazarse al resto de hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. Se forman oligonucleótidos a través del enlace covalente de los nucleósidos adyacentes

los unos de los otros, para formar un oligonucleótido polimérico lineal. Dentro de la estructura del oligonucleótido, generalmente se hace referencia a los grupos fosfato como formadores de los enlaces internucleósidos del oligonucleótido.

Las modificaciones de compuestos antisentido abarcan las sustituciones o cambios de enlaces internucleósidos, restos de azúcar o nucleobases. A menudo se prefieren los compuestos antisentido modificados por sobre las formas naturales debido a sus propiedades deseables como, por ejemplo, mejor absorción celular, mejor afinidad para dirigirse al ácido nucleico, mayor estabilidad en presencia de nucleasas o mayor actividad de inhibición.

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

Uniones internucleósidos modificadas

La unión internucleósido de origen natural de ARN y ADN es una unión fosfodiéster de 3' a 5'. A menudo se seleccionan compuestos antisentido que tienen uno o más enlaces internucleósidos modificados, es decir, de origen no natural en luegar de compuestos antisentido que poseen enlaces internucleósidos de origen natural debido a que poseen propiedades deseables como, por ejemplo, una mejor absorción celular, mejor afinidad con los ácidos nucleicos objetivo y un aumento de la estabilidad en presencia de nucleasas.

Los oligonucleótidos con uniones internucleósido modificadas incluyen uniones internucleósido que conservan un átomo de fósforo, así como uniones internucleósido sin átomo de fósforo. Las uniones internucleósido representativas que contienen fósforo incluyen, de modo no taxativo, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidato y fosforotioatos. Se conocen los métodos de preparación de uniones que contienen fósforo y que no contienen fósforo.

En determinadas modalidades, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de CFB comprenden uno o más enlaces internucleósido modificados. En determinadas modalidades, las uniones internucleósido modificadas son

uniones fosforotioato. En determinadas modalidades, cada unión internucleósido de un compuesto antisentido es una unión internucleósido de fosforotioato.

En determinadas modalidades, los oligonucleótidos comprenden uniones internucleósido modificadas dispuestas a lo largo del oligonucleótido o región de este en un patrón definido o motivo de unión internucleósido modificada. En determinadas modalidades, las uniones internucleósido se disponen en un motivo con segmentos intermedios. En dichas modalidades, las uniones internucleósido en cada una de dos regiones de ala son distintas de las uniones internucleósido de la región de segmento intermedio. En determinadas modalidades, las uniones internucleósido en las alas son fosfodiéster y las uniones internucleósido en el segmento intermedio son fosforotioato. El motivo de nucleósido se selecciona independientemente, de manera que dichos oligonucleótidos que tengan un motivo de unión internucleósido con segmentos intermedio pueda o no tener un motivo de nucleósido con segmentos intermedios y, si tiene un motivo de nucleósido con segmentos intermedios, la longitud del ala y segmento intermedio pueden o no ser iguales.

En determinadas modalidades, los oligonucleótidos comprenden

una región con un motivo alternante de unión internucleósido. En determinadas modalidades, los oligonucleótidos de la presente invención comprenden una región de uniones internucleósido modificadas de manera uniforme. En algunas de estas modalidades, el oligonucleótido comprende una región que está unida de manera uniforme mediante enlaces internucleósido fosforotioato. En determinadas modalidades, el oligonucleótido está unido de manera uniforme mediante fosforotioato. En determinadas modalidades, cada unión internucleósido del oligonucleótido se selecciona de fosfodiéster y fosforotioato. En determinadas modalidades, cada unión internucleósido del oligonucleótido se selecciona de fosfodiéster y fosforotioato y al menos una unión internucleósido es fosforotioato.

En determinadas modalidades, el oligonucleótido comprende al menos 6 uniones internucleósido fosforotioato. En determinadas modalidades, el oligonucleótido comprende al menos 8 uniones internucleósido fosforotioato. En determinadas modalidades, el oligonucleótido comprende al menos 10 uniones internucleósido fosforotioato. En determinadas modalidades, el oligonucleótido comprende al menos un bloque de al menos 6 uniones internucleósido fosforotioato consecutivas. En determinadas modalidades, el

oligonucleótido comprende al menos un bloque de al menos 8 uniones internucleósido fosforotioato consecutivas. En determinadas modalidades, el oligonucleótido comprende al menos un bloque de al menos 10 uniones internucleósido fosforotioato consecutivas. En determinadas modalidades, el oligonucleótido comprende al menos un bloque de al menos 12 uniones internucleósido fosforotioato consecutivas. En algunas de estas modalidades, al menos uno de dichos bloques está ubicado en el extremo 3' del oligonucleótido. En algunas de estas modalidades, al menos uno de dichos bloques está ubicado dentro de 3 nucleósidos del extremo 3' del oligonucleótido.

En determinadas modalidades, los oligonucleótidos comprenden una o más uniones de metilfosfonato. En determinadas modalidades, los oligonucleótidos que tienen un motivo de nucleósido gapmer comprenden un motivo de unión que comprende todas las uniones fosforotioato excepto una o dos uniones de metilfosfonato. En determinadas modalidades, una unión metilfosfonato se encuentra en el segmento intermedio central de un oligonucleótido que tiene un motivo de nucleósido gapmer.

En determinadas modalidades, es conveniente disponer la

cantidad de uniones internucleósido fosforotioato y uniones internucleósido fosfodiéster para mantener la resistencia de nucleasa. En determinadas modalidades, es conveniente disponer la cantidad y posición de las uniones internucleósido fosforotioato y la cantidad y posición de las uniones internucleósido fosfodiéster para mantener la resistencia de nucleasa. En determinadas modalidades, la cantidad de uniones internucleósido fosforotioato puede disminuir y la cantidad de uniones internucleósido fosfodiéster puede aumentar. En determinadas modalidades, la cantidad de uniones internucleósido fosforotioato puede disminuir y la cantidad de uniones internucleósido fosfodiéster puede aumentar mientras se mantiene la resistencia de nucleasa. En determinadas modalidades, es conveniente reducir la cantidad de uniones internucleósido fosforotioato y al mismo tiempo retener la resistencia de nucleasa. En determinadas modalidades, es conveniente aumentar la cantidad de uniones internucleósido fosfodiéster y al mismo tiempo retener la resistencia de nucleasa.

Restos de azúcar modificados

Los compuestos antisentido pueden contener de manera opcional uno o más nucleósidos donde el grupo de azúcar se vio

modificado. Dichos nucleósidos de azúcar modificado pueden impartirle mejor estabilidad de nucleasas, mayor afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos antisentido. En determinadas modalidades, los nucleósidos comprenden restos de anillo de ribofuranosa químicamente modificados. Los ejemplos de anillos de ribofuranosa químicamente modificados incluyen, de modo no taxativo, la adición de grupos sustituyentes (inclusive grupos sustituyentes de 5' y 2'), la formación de puentes de átomos de anillos no geminales para formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA), el remplazo del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S, N(R) o $C(R_1)(R_2)$ (cada uno de R, R_1 y R_2 es independientemente H, alquilo C_1-C_{12} o un grupo protector) y combinaciones de estos. Los ejemplos de azúcares modificados químicamente incluyen nucleósido sustituido 2'-F-5'-metilo (véase, Solicitud Internacional PCT WO 2008/101157, publicada el 8/21/08 para otros nucleósidos 5', 2'-bis sustituidos descritos), o reemplazo del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S con una sustitución adicional en la posición 2' (véase, Solicitud de Patente estadounidense publicada US2005/0130923, publicada el 16 de junio de 2005) o, alternativamente, sustitución en 5' de un BNA (véase, Solicitud Internacional PCT WO 2007/134181, publicada el 22/11/07, donde el LNA se sustituye con, por ejemplo, un

grupo 5'-metilo o 5'-vinilo).

Los ejemplos de nucleósidos con restos azúcar modificados incluyen, de modo no taxativo, nucleósidos que comprenden grupos sustituyentes 5'-vinilo, 5'-metilo (R o S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH_3, 2'-OCH_2CH_3, 2'-OCH_2CH_2F y 2'-$O(CH_2)_2OCH_3$. El sustituyente en la posición 2' se puede seleccionar de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C_1-C_{10}, OCF_3, OCH_2F, $O(CH_2)_2SCH_3$, $O(CH_2)_2$-O-$N(R_m)(R_n)$, O-CH_2-C(=O)-$N(R_m)(R_n)$ y O-CH_2-C(=O)-$N(R_l)$-$(CH_2)_2$-$N(R_m)(R_n)$, donde cada R_l, R_m t R_n es, independientemente, H o alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido.

Tal como se usa en la presente, "nucleósidos bicíclicos" hace referencia a nucleósidos modificados que comprenden un resto azúcar bicíclico. Los ejemplos de nucleósidos bicíclicos incluyen, de modo no taxativo, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo ribosilo 4' y 2'. En determinadas modalidades, los compuestos antisentido proporcionados en la presente incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos que comprenden un puente de 4' a 2'. Los ejemplos de dichos nucleósidos bicíclicos puenteados 4' a 2', incluyen, de modo no taxativo, uno de la fórmula 4'-(CH_2)-O-2' (LNA); 4'-(CH_2)-S-2'; 4'-$(CH_2)_2$-O-2' (ENA); 4'-$CH(CH_3)$-O-2'

(también denominado etilo limitado o cEt) y 4'-$CH(CH_2OCH_3)$-O-2', (y análogos de estos véase la patente estadounidense 7,399,845, emitida el 15 de julio de 2008); 4'-$C(CH_3)(CH_3)$-O-2' (y análogos de estos véase la solicitud internacional publicada WO 2009/006478, publicada el 8 de enero de 2009); 4'-CH_2-$N(OCH_3)$-2' (y análogos de estos véase la solicitud internacional publicada WO/2008/150729, publicada el 11 de diciembre de 2008); 4'-CH_2-O-$N(CH_3)$-2' (véase la solicitud de patente estadounidenseUS2004/-0171570, publicada el 2 de setiembre de 2004); 4'-$CH_2N(R)$-O-2', donde R es H, alquilo C_1-C_{12} o un grupo protector (véase, la patente estadounidense 7,427,672, emitida el 23 de setiembre de 2008); 4'-CH_2-$C(H)(CH_3)$-2' (véase Zhou et ál., *J. Org. Chem.*, 2009, *74*, 118-134); y 4'-CH_2-$C(=CH_2)$-2' (y análogos de estos ver la solicitud internacional publicada WO 2008/154401, publicada el 8 de diciembre de 2008).

También se pueden encontrar informes adicionales relacionados con nucleósidos bicíclicos en la literatura publicada (véase, por ejemplo: Singh et ál., *Chem. Commun.*, 1998, *4*, 455-456; Koshkin *et ál.*, *Tetrahedron*, 1998, *54*, 3607-3630; Wahlestedt *et ál.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, *97*, 5633-5638; Kumar et ál., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, *8*, 2219-2222; Singh et ál., *J. Org. Chem.*, 1998, *63*, 10035-10039;

Srivastava et ál., *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, *129(26)* 8362-8379; Elayadi et ál., *Curr. Opinion Invest. Drugs,* 2001, *2*, 558-561; Braasch et ál., *Chem. Biol.,* 2001, *8*, 1-7; y Orum et ál., *Curr. Opinion Mol. Ther.,* 2001, *3*, 239-243; n.° de patentes estadounidenses 6,268,490; 6,525,191; 6,670,461; 6,770,748; 6,794,499; 7,034,133; 7,053,207; 7,399,845; 7,547,684; 8,530,640; y 7,696,345; publicación de patente estadounidense n.° US2008-0039618; US2009-0012281; patentea estadounidenses n.° de serie 61/026,995 y 61/097,787; solicitudes internacionales PCT publicadas; WO 2009/067647; WO 2011/017521; WO 2010/036698 WO 1999/014226; WO 2004/106356; WO 2005/021570; WO 2007/134181; WO 2008/150729; WO 2008/154401; y WO 2009/006478. Cada uno de los nucleósidos bicíclicos anteriores se puede preparar con una o más configuraciones estereoquímicas de azúcar, inclusive, por ejemplo, α-L-ribofuranosa y β-D-ribofuranosa (véase la solicitud internacional PCT PCT/DK98/00393, publicada el 25 de marzo de 1999 como WO 99/14226).

En determinadas modalidades, los restos de azúcar bicíclicos de nucleósidos de BNA incluyen, de modo no taxativo, compuestos que tienen al menos un puente entre la posición 4' y 2’ del resto de azúcar de pentofuranosilo donde dichos puentes comprenden independientemente 1 o de 2 a 4 grupos

enlazados seleccionados independientemente de $-[C(R_a)(R_b)]_n-$, $C(R_a)=C(R_b)-$, $C(R_a)=N-$, $-C(=O)-$, $C(=NR_a)-$, $-C(=S)-$, $-O-$, $-Si(R_a)_2-$, $-S(=O)_x-$ y $N(R_a)-$;

donde:

x es 0, 1 o 2;

n es 1, 2, 3 o 4;

cada R_a y R_b es, independientemente, H, un grupo protector, hidroxilo, alquilo C_1-C_{12}, alquilo C_1-C_{12} sustituido, alquenilo C_2-C_{12}, alquenilo C_2-C_{12} sustituido, alquinilo C_2-C_{12}, alquinilo C_2-C_{12} sustituido, arilo C_5-C_{20}, arilo C_5-C_{20} sustituido, radical de heterociclo, radical de heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical de alicíclico C_5-C_7, radical de alicíclico C_5-C_7 sustituido, halógeno, OJ_1, NJ_1J_2, SJ_1, N_3, $COOJ_1$, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, CN, sulfonilo ($S(=O)_2-J_1$), o sulfoxilo ($S(=O)-J_1$); y

cada J_1 y J_2 es, independientemente, H, alquilo C_1-C_{12}, alquilo C_1-C_{12} sustituido, alquenilo C_2-C_{12}, alquenilo C_2-C_{12} sustituido, alquinilo C_2-C_{12}, alquinilo C_2-C_{12} sustituido, arilo C_5-C_{20}, arilo C_5-C_{20} sustituido, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, un radical de heterociclo, un radical de heterociclo sustituido, aminoalquilo C_1-C_{12}, aminoalquilo C_1-C_{12} sustituido, o un grupo protector.

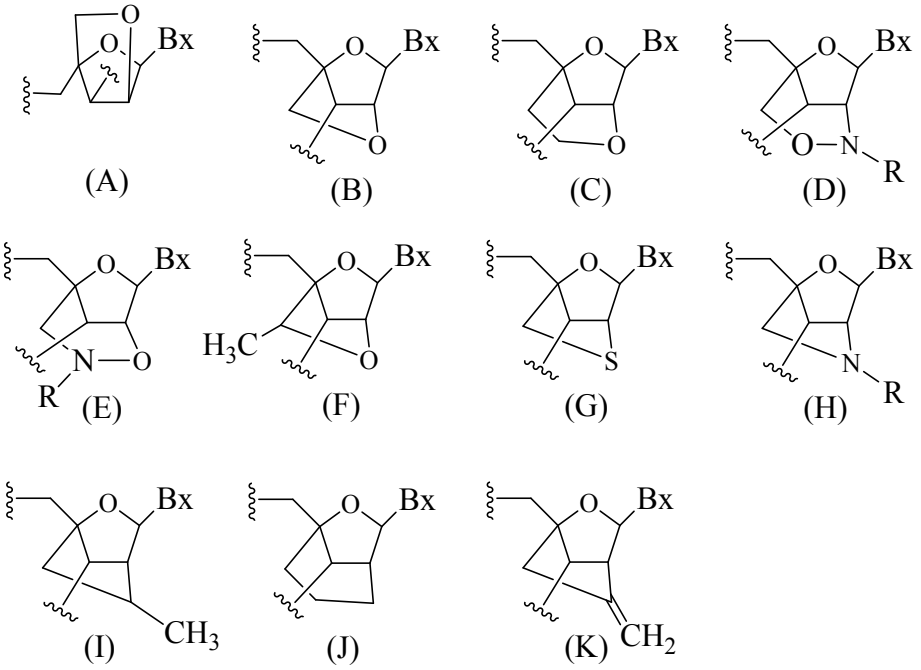
En determinadas modalidades, el puente de un resto de azúcar

bicíclico es $[C(R_a)(R_b)]_n$-, $[C(R_a)(R_b)]_n$-O-, $C(R_aR_b)$-N(R)-O- o -$C(R_aR_b)$-O-N(R)-. En determinadas modalidades, el puente es 4'-CH_2-2', 4'-$(CH_2)_2$-2', 4'-$(CH_2)_3$-2', 4'-CH_2-O-2', 4'-$(CH_2)_2$-O-2', 4'-CH_2-O-N(R)-2' y 4'-CH_2-N(R)-O-2'-, donde cada R es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C_1-C_{12}.

En determinadas modalidades, los nucleósidos bicíclicos se definen además según la configuración isomérica. Por ejemplo, un nucleósido que comprende un puente 4'-2' metilenoxi puede encontrarse en la configuración α-L o en la configuración β-D. Previamente, los BNA de α-L-metilenoxi (4'-CH_2-O-2') se habían incorporado a los oligonucleótidos antisentido que mostraban actividad antisentido (Frieden et ál., *Nucleic Acids Research*, 2003, 21, 6365-6372).

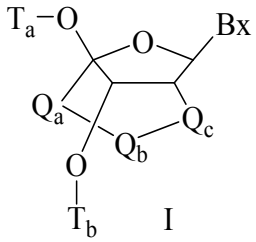
En determinadas modalidades, los nucleósidos bicíclicos incluyen, de modo no taxativo, (A) BNA de α-L-metilenoxi (4'-CH_2-O-2'), (B) BNA de β-D-metilenoxi (4'-CH_2-O-2'), (C) BNA de etilenoxi (4'-$(CH_2)_2$-O-2'), (D) BNA de aminooxi (4'-CH_2-O-N(R)-2'), (E) BNA de oxiamino (4'-CH_2-N(R)-O-2'), y (F) BNA de metil(metilenoxi) (4'-$CH(CH_3)$-O-2'), (G) BNA de metilen-tio (4'-CH_2-S-2'), (H) BNA de metilen-amino (4'-CH_2-N(R)-2'), (I) BNA metil carbocíclico (4'-CH_2-$CH(CH_3)$-2'), (J) BNA propilen carbocíclico (4'-$(CH_2)_3$-2') y (K) BNA vinílico tal

como se ilustra a continuación:



donde Bx es el resto base y R es independientemente H, un grupo protector, alquilo C_1-C_{12} o alcoxi C_1-C_{12}.

En determinadas modalidades, se proporcionan nucleósidos bicíclicos con la Fórmula I:



I

donde:

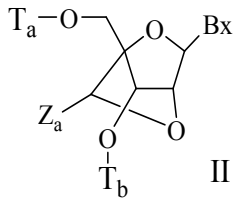
Bx es un resto de base heterocíclica;

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

R_c es alquilo C_1-C_{12} o un grupo protector amino; y

T_a y T_b es cada uno, independientemente, H, un grupo protector hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo, o un enlace covalente con respecto a un medio de soporte.

En determinadas modalidades, se proporcionan nucleósidos bicíclicos con la Fórmula II:



II

donde:

Bx es un resto de base heterocíclica;

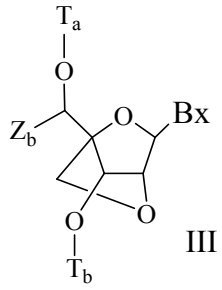
cada uno de T_a y T_b es, independientemente, H, un grupo protector hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo, o un enlace covalente con respecto a un medio de soporte;

Z_a es alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6,

alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 sustituido, acilo, acilo sustituido, amida sustituida, tiol o tiol sustituido.

En una modalidad, cada uno de los grupos sustituidos es, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, oxo, hidroxilo, OJ_c, NJ_cJ_d, SJ_c, N_3, $OC(=X)J_c$ y $NJ_eC(=X)NJ_cJ_d$, donde cada J_c, J_d y J_e es, independientemente, H, alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido y X es O o NJ_c.

En determinadas modalidades, se proporcionan nucleósidos bicíclicos con la Fórmula III:



III

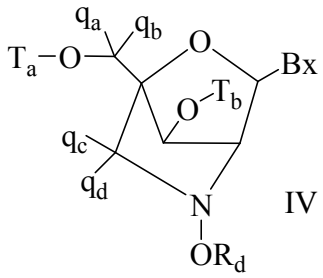
donde:

Bx es un resto de base heterocíclica;

cada uno de T_a y T_b es, independientemente, H, un grupo protector hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo, o un enlace covalente con respecto a un medio de soporte;

Z_b es alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6 sustituido o acilo (C(=O)-) sustituido.

En determinadas modalidades, se proporcionan nucleósidos bicíclicos con la Fórmula IV:



donde:

Bx es un resto de base heterocíclica;

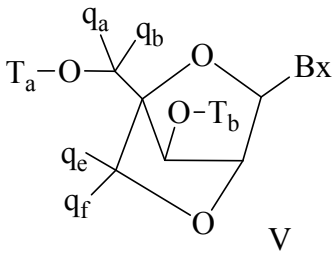
cada uno de T_a y T_b es, independientemente, H, un grupo protector hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo, o un enlace covalente con respecto a un medio de soporte;

R_d es alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6, o alquinilo C_2-C_6 sustituido;

cada q_a, q_b, q_c y q_d es, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6, o alquinilo C_2-C_6 sustituido, alcoxilo C_1-C_6, alcoxilo C_1-C_6 sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_1-C_6, o aminoalquilo C_1-C_6

sustituido;

En determinadas modalidades, se proporcionan nucleósidos



V

donde:

Bx es un resto de base heterocíclica;

cada uno de T_a y T_b es, independientemente, H, un grupo protector hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo, o un enlace covalente con respecto a un medio de soporte;

q_a, q_b, q_e y q_f son cada uno, independientemente, hidrógeno, halógeno, alquilo C_1-C_{12}, alquilo C_1-C_{12} sustituido, alquenilo C_2-C_{12}, alquenilo C_2-C_{12} sustituido, alquinilo C_2-C_{12}, alquinilo C_2-C_{12} sustituido, alcoxi C_1-C_{12}, alcoxi C_1-C_{12} sustituido, OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO_2J_j, NJ_jJ_k, N_3, CN, $C(=O)OJ_j$, $C(=O)NJ_jJ_k$, $C(=O)J_j$, $O-C(=O)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ o $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$;

o q_e y q_f en conjunto son $=C(q_g)(q_h)$;

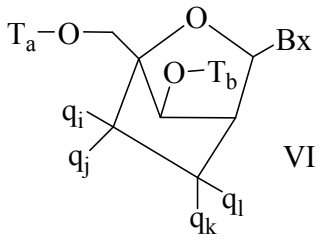
q_g y q_h es cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_{12} o alquilo C_1-C_{12} sustituido.

Se describieron la síntesis y preparación de los monómeros de BNA de metilenoxi (4'-CH_2-O-2') adenina, citosina, guanina, 5-metil-citosina, timina y uracilo, junto con su oligomerización y propiedades de reconocimiento de ácidos nucleicos (Koshkin et ál., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630). También se describen los ABN y su preparación en los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226.

También se prepararon análogos de BNA de metilenoxi (4'-CH_2-O-2') y 2'-tio-BNA (Kumar et ál., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, *8*, 2219-2222). También se describió la preparación de análogos de nucleósidos bloqueados que comprenden estructuras dobles de oligodesoxirribonucleótidos como sustratos para las polimerasas de ácido nucleico (Wengel et ál., WO 99/14226). Además, en la técnica se describió la síntesis de 2'-amino-BNA, un análogo novedoso de oligonucleótido de alta afinidad limitado de manera conformacional (Singh et ál., *J. Org. Chem.*, 1998, *63*, 10035-10039). Además, previamente se prepararon BNA de 2'-amino y 2'-metilamino y se indicó la estabilidad térmica de sus dúplex con cadenas complementarias de ARN y ADN.

En determinadas modalidades, se proporcionan nucleósidos

bicíclicos con la Fórmula VI:



VI

donde:

Bx es un resto de base heterocíclica;

cada uno de T_a y T_b es, independientemente, H, un grupo protector hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo de fósforo reactivo, un resto de fósforo, o un enlace covalente con respecto a un medio de soporte;

cada q_i, q_j, q_k y q_l es, independientemente, H, halógeno, alquilo C_1-C_{12}, alquilo C_1-C_{12} sustituido, alquenilo C_2-C_{12}, alquenilo C_2-C_{12} sustituido, alquinilo C_2-C_{12}, alquinilo C_2-C_{12} sustituido, alcoxilo C_1-C_{12}, alcoxilo C_1-C_{12} sustituido, OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO_2J_j, NJ_jJ_k, N_3, CN, $C(=O)OJ_j$, $C(=O)NJ_jJ_k$, $C(=O)J_j$, $O-C(=O)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ o $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$; y

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

Se ha descrito un nucleósido bicíclico carbocíclico que tiene un puente 4'-$(CH_2)_3$-2' y el puente análogo alquenilo 4'-CH=CH-CH_2-2' (Freier et ál., *Nucleic Acids Research*, 1997, *25*(*22*), 4429-4443 y Albaek et ál., *J. Org. Chem.*, 2006, *71*, 7731-7740). También se describieron la síntesis y preparación de nucleósidos bicíclicos carbocíclicos junto con su oligomerización y estudios bioquímicos (Srivastava et ál., *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, *129(26)*, 8362-8379).

Como se usa en la presente, "nucleósido bicíclico 4'-2'" o "nucleósido bicíclico de 4' a 2'" se refiere a un nucleósido bicíclico que comprende un anillo de furanosa que comprende un puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de furanosa que conecta el átomo de carbono en la posición 2' y el átomo de carbono en la posiciób 4' del anillo de azúcar.

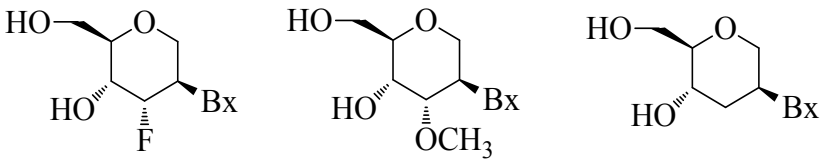
Tal como se usa en la presente, "nucleósidos monocíclicos" se refiere a nucleósidos que comprenden restos azúcar modificados que no son restos azúcar bicíclicos. En determinadas modalidades, el resto azúcar o análogo del resto azúcar de un nucleósido puede ser modificado o sustituido en cualquier posición.

Tal como se usa en la presente "azúcar modificada en 2'" significa un azúcar de furanosilo modificada en la posición 2'. En determinadas modalidades, tales modificadores incluyen sustituyentes seleccionados de: un haluro, incluyendo, de modo no taxativo alcoxi sustituido y no sustituido, tioalquilo sustituido y no sustituido, aminoalquilo sustituido y no sustituido, alquilo sustituido y no sustituido, alilo sustituido y no sustituido y alquinilo sustituido y no sustituido. En determinadas modalidades, las modificaciones en la posición 2' se seleccionan de sustituyentes que incluyen, de modo no taxativo: $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nF$, $O(CH_2)_nONH_2$, $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$ y $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, donde n y m son de 1 a alrededor de 10. También pueden seleccionarse otros grupos sustituyentes en la posición 2' de: alquilo C_1-C_{12}, alquilo sustituido, alquenilo, alquinilo, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas y un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un compuesto antisentido, y otros sustituyentes que tengan propiedades similares. En

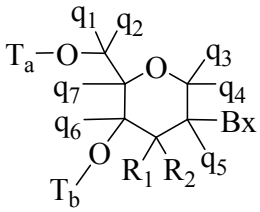
determinadas modalidades, los nucleósidos modificados comprenden una cadena lateral 2’-MOE (Baker et ál., *J. Biol. Chem.*, 1997, *272*, 11944-12000). Dicha sustitución en 2'-MOE ha sido descrita como una que mejora la afinidad de unión en comparación con nucleósidos no modificados y con otros nucleósidos modificados, como 2’-*O*-metilo, *O*-propilo y *O*-aminopropilo. También se demostró que los oligonucleótidos que tienen el sustituyente 2'-MOE son inhibidores antisentido de la expresión génica con características prometedores para su uso *in vivo (Martin, Helv. Chim. Acta*, 1995, *78*, 486-504; Altmann et ál., *Chimia*, 1996, *50*, 168-176; Altmann et ál., *Biochem. Soc. Trans.*, 1996, *24*, 630-637; y Altmann et ál., *Nucleosides Nucleotides*, 1997, *16*, 917-926).

Tal como se usa en la presente, un “nucleósido de tetrahidropirano modificado” o “nucleósido de THP modificado” se refiere a un nucleósido que tiene un “azúcar” de tetrahidropirano de seis miembros sustituido en el residuo de pentofuranosilo en nucleósidos normales (un sustituto de azúcar). Los nucleósidos de THP modificado incluyen, de modo no taxativo, lo que se denomina en la técnica como ácido nucleico de hexitol (HNA), ácido nucleico de anitol (ANA), ácido nucleico de manitol (MNA) (véase Leumann, *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, *10*, 841-854) o fluoro HNA (F-HNA) que tiene un

sistema de anillo tetrahidropirano, tal como se ilustra a continuación:



En determinadas modalidades, se seleccionan sustitutos de azúcar que tienen la fórmula VII:



VII

donde independientemente para cada uno del al menos un análogo de nucleósido de tetrahidropirano referido de la Fórmula VII:

Bx es un resto de base heterocíclica;

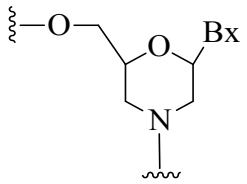
T_a y T_b son cada uno, independientemente, un grupo de unión internucleósido que une el análogo nucleósido de tetrahidropirano al compuesto antisentido o uno de T_a y T_b es un grupo de unión internucleósido que une el análogo nucleósido de tetrahidropirano al compuesto antisentido y el otro de T_a y T_b es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado enlazado o un grupo de extremo 5' o 3';

q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6 y q_7 son cada uno independientemente, H, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6, o alquinilo C_2-C_6 sustituido; y cada uno de R_1 y R_2 se selecciona de hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alcoxi sustituido o no sustituido, NJ_1J_2, SJ_1, N_3, $OC(=X)J_1$, $OC(=X)NJ_1J_2$, $NJ_3C(=X)NJ_1J_2$ y CN, donde X es O, S o NJ_1 y cada J_1, J_2 y J_3 es, independientemente, H o alquilo C_1-C_6.

En determinadas modalidades, se proporcionan los nucleósidos THP modificados de Fórmula VII donde q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6 y q_7 son cada uno H. En determinadas modalidades, al menos uno de q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6 y q_7 es distinto a H. En determinadas modalidades, al menos uno de q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6 y q_7 es metilo. En determinadas modalidades, se proporcionan los nucleósidos de THP de Fórmula VII donde uno de R_1 y R_2 es fluoro. En determinadas modalidades, R_1 es fluoro y R_2 es H; R_1 es metoxi y R_2 es H, y R_1 es metoxietoxi y R_2 es H.

En determinadas modalidades, los sustitutos de azúcar comprenden anillos que tienen más de 5 átomos y más de un heteroátomo. Por ejemplo, se han descrito nucleósidos que comprenden restos de azúcar morfolino y se ha informado su uso en compuestos oligoméricos (véase, por ejemplo: Braasch

et ál., *Biochemistry*, 2002, *41*, 4503-4510; y las patentes estadounidenses 5,698,685; 5,166,315; 5,185,444; y 5,034,506). Tal como se usa en la presente, el término "morfolino" significa un sustituto de azúcar que tiene la siguiente fórmula:



.

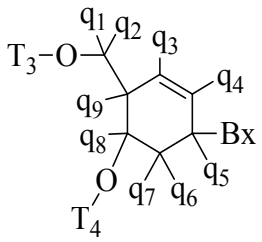
En determinadas modalidades, los morfolinos pueden estar modificados, por ejemplo, mediante adición o alteración de diversos grupos sustituyentes de la estructura de morfolino que antecede. Dichos sustitutos de azúcar se denominan en la presente "morfolinos modificados".

También se proporcionan, de modo no taxativo, combinaciones o modificaciones, tales como nucleósidos sustituidos 2'-F-5'-metilo (ver la solicitud internacional PCT (WO 2008/101157, publicado el 21/ago/08 para otros nucleósidos sustituidos 5', 2'-bis descritos) y el reemplazo del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S y una sustitución adicional en la posición 2' (ver la solicitud de patente estadounidense US2005-0130923, publicada el 16 de junio de 2005) o, de manera alternativa, sustitución en la posición 5' de un ácido

nucleico bicíclico (ver la solicitud internacional PCT WO 2007/134181, publicado el 22/nov/07, donde se sustituye adicionalmente un nucleósido bicíclico 4'-CH_2-O-2' en la posición 5' con un grupo 5'-vinilo o 5'-metilo). También se han descrito la síntesis y preparación de nucleósidos bicíclicos carbocíclicos junto con su oligomerización y estudios bioquímicos (ver, por ejemplo, Srivastava et ál., *J. Am. Chem. Soc.* 2007, *129(26)*, 8362-8379).

En determinadas modalidades, los compuestos antisentido comprenden uno o más nucleósidos ciclohexenilo modificados, que son nucleósidos con un ciclohexenilo de seis miembros en lugar del residuo de pentafuranosilo en los nucleósidos de origen natural. Los nucleósidos de ciclohexenilo modificados incluyen, de modo no taxativo, los descritos en la técnica (por ejemplo, de la solicitud PCT publicada WO 2010/036696, de titularidad común, publicada el 10 de abril de 2010, Robeyns et ál., *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, *130(6)*, 1979-1984; Horváth et ál., *Tetrahedron Letters*, 2007, 48, 3621-3623; Nauwelaerts et ál., *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, *129(30)*, 9340-9348; Gu et ál., *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2005, *24(5-7)*, 993-998; Nauwelaerts et ál., *Nucleic Acids Research*, 2005, *33(8)*, 2452-2463; Robeyns et ál., *Acta*

Crystallographica, Sección F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2005, *F61(6)*, 585-586; Gu et ál., *Tetrahedron*, 2004, *60(9)*, 2111-2123; Gu et ál., *Oligonucleotides*, 2003, *13(6)*, 479-489; Wang et ál., *J. Org. Chem.*, 2003, 68, 4499-4505; Verbeure et ál., *Nucleic Acids Research*, 2001, *29(24)*, 4941-4947; Wang et ál., *J. Org. Chem.*, 2001, 66, 8478-82; Wang et ál., *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2001, *20(4-7)*, 785-788; Wang et ál., *J. Am. Chem.*, 2000, 122, 8595-8602; solicitud PCT publicada, WO 06/047842; y la solicitud PCT publicada WO 01/049687; el texto de cada una se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad). Determinados nucleósidos de ciclohexenilo modificado tiene la Fórmula X.



X

donde, independientemente, para cada uno de dicho al menos un análogo nucleósido de ciclohexenilo de la Fórmula X:

Bx es un resto base heterocíclico;

T_3 y T_4 es cada uno, independientemente, un grupo de unión a internucleósido que une el análogo nucleósido de ciclohexenilo a un compuesto antisentido o uno de T_3 y T_4 es

un grupo de unión internucleósido que une el análogo nucleósido de tetrahidropirano a un compuesto antisentido y el otro deT_3 y T_4 es H, un grupo protector hidroxilo, un grupo conjugado enlazado o un grupo del extremo, 5’ o 3'; y

q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6, q_7, q_8 y q_9 es cada uno, independientemente, H, alquilo C_1-C_6, alquilo C_1-C_6 sustituido, alquenilo C_2-C_6, alquenilo C_2-C_6 sustituido, alquinilo C_2-C_6, o alquinilo C_2-C_6 sustituido u otro grupo sustituyente de azúcar,

Como se utiliza en la presente, "modificado en 2'" o "sustituido en 2'" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un sustituyente en la posición 2' que no es H u OH. Los nucleósidos modificados en 2’incluyen, de modo no taxativo, nucleósidos bicíclicos donde el puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de azúcar sugar conecta el carbono 2’ y otro carbono del anillo de azúcar; y los nucleósidos con sustituyentes en 2' que no forman puentes, tal como alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C_1-C_{10}, $-OCF_3$, $O-(CH_2)_2-O-CH_3$, $2'-O(CH_2)_2SCH_3$, $O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$, o $O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$, donde cada R_m y R_n es, independientemente, H o alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido. Los nucleósidos modificados en 2' pueden comprender adicionalmente otras modificaciones, por ejemplo,

en otras posiciones del azúcar y/o en la nucleobase.

Tal como se usa en la presente, "2'-F" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo fluoro en la posición 2' del anillo de azúcar.

Tal como se usa en la presente, cada uno de "2'-OMe" o "2'-OCH_3" o "2'-O-metilo" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo -OCH_3 en la posición 2' del anillo de azúcar.

Tal como se usa en la presente, cada uno de "MOE" o "2'-MOE" o "2'-$OCH_2CH_2OCH_3$" o "2'-O-metoxietilo" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo -$OCH_2CH_2OCH_3$ en la posición 2' del anillo de azúcar.

Como se usa en la presente, "oligonucleótido" se refiere a un compuesto que comprende múltiples nucleósidos enlazados. En determinadas modalidades, uno o más de los múltiples nucleósidos está modificado. En determinadas modalidades, un oligonucleótido comprende uno o más ribonucleósidos (ARN) y/o desoxirribonucleósidos (ADN).

En la técnica se conocen muchos otros sistemas de anillos

sustitutos de azúcar bicíclico y tricíclico que se pueden utilizar para modificar nucleósidos para su incorporación en los compuestos antisentido (véase, por ejemplo, el artículo de reseña: Leumann, *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, *10*, 841-854). Estos sistemas de anillos pueden someterse a diversas sustituciones adicionales para mejorar la actividad.

Los expertos en la técnica conocen métodos para la preparación de azúcares modificados. Algunas patentes estadounidenses representativas que describen la preparación de dichos azúcares modificados incluyen, de modo no taxativo, Estados Unidos: 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,670,633; 5,700,920; 5,792,847 y 6,600,032 y solicitud internacional PCT/US2005/019219, presentada el 2 de junio de 2005 y publicada como WO 2005/121371 el 22 de diciembre de 2005, y donde cada una de ellas se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

En los nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados, los restos de nucleobases (naturales, modificados o una combinación de estos) se mantienen para la hibridación con un

ácido nucleico objetivo adecuado.

En determinadas modalidades, los compuestos antisentido comprenden uno o más nucleósidos con restos azúcar modificados. En determinadas modalidades, el resto azúcar modificado es 2'-MOE. En determinadas modalidades, los nucleósidos modificados con 2'-MOE se disponen en un motivo de gapmer. En determinadas modalidades, el resto azúcar modificado es un nucleósido bicíclico con un grupo formador de puentes (4'-CH(CH_3)-O-2'). En determinadas modalidades, los nucleósidos modificados (4'-CH(CH_3)-O-2') están dispuestos en las alas de un motivo gapmer.

Nucleobases modificadas

Las modificaciones o sustituciones de nucleobases (o bases) se pueden diferenciar estructuralmente de nucleobases de origen natural o sintéticas sin modificar, si bien funcionalmente son intercambiables con estas. Tanto las nucleobases naturales como modificadas pueden participar en la unión de hidrógeno. Tales modificaciones de nucleobases pueden impartirle estabilidad de nucleasas, afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa a los compuestos antisentido. Las nucleobases modificadas incluyen

nucleobases sintéticas y naturales como, por ejemplo, 5-metilcitosina (5-me-C). Determinadas sustituciones de nucleobases, que incluyen las sustituciones de 5-metilcitosina, son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de un compuesto antisentido a un ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Ratón, 1993, pp. 276-278).

Las nuecleobases modificadas adicionales incluyen 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinilo (-C≡C-CH3) uracilo y citosina y otros derivados alquinílicos de bases de pirimidina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras guaninas y adeninas 8-sustituidas, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometil y otras citosinas y uracilos 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina, 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

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

En determinadas modalidades, los compuestos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de CFB comprenden una o más nucleobases modificadas. En determinadas modalidades, los oligonucleótidos antisentido acortados o de segmento intermedio más amplio dirigidos a un ácido nucleico de CFB comprenden una o más nucleobases modificadas. En determinadas modalidades, la nucleobase modificada es 5-metilcitosina. En determinadas modalidades, cada citosina es una 5-metilcitosina.

Compuestos antisentido conjugados

En determinadas modalidades, la presente descripción

proporciona compuestos conjugados antisentido. En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona compuestos conjugados antisentido que comprenden un oligonucleótido antisentido complementario a un transcripto de ácido nucleico. En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona métodos que comprenden poner en contacto a una célula con un compuesto conjugado antisentido que comprende un oligonucleótido antisentido complementario a un transcripto de ácido nucleico. En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona métodos que comprenden poner en contacto a una célula con un compuesto conjugado antisentido que comprende un oligonucleótido antisentido y reducir la cantidad o actividad de un transcripto de ácido nucleico en una célula.

El receptor de asialoglicoproteína (ASGP-R) se ha descrito anteriormente. Ver, por ejemplo, Park et ál., PNAS vol. 102, n.° 47, pp. 17125-17129 (2005). Dichos receptores se expresan en células hepáticas, particularmente hepatocitos. Además, se ha demostrado que los compuestos que comprenden conglomerados de tres ligandos de N-acetilgalactosamina (GalNAc) son capaces de unirse al ASGP-R, lo que da como resultado una absorción del compuesto hacia la célula. Ver, por ejemplo, Khorev et ál., Bioorganic and Medicinal Chemistry, 16, 9, pp.

5216-5231 (mayo de 2008). Por consiguiente, los conjugados que comprenden dichos conglomerados GalNAc se han utilizado para facilitar la absorción de ciertos compuestos en células hepáticas, específicamente hepatocitos. Por ejemplo, se ha demostrado que determinados conjugados que contienen GalNAc aumentan la actividad de los compuestos de dúplex de ARNip en células hepáticas in vivo. En dichas instancias, el conjugado que contiene GalNAc está típicamente unido a la cadena con sentido del dúplex de ARNip. Dado que la cadena con sentido se descarta antes de que la cadena antisentido se hibride finalmente con el ácido nucleico objetivo, no es de importancia que el conjugado interfiera con la actividad. Típicamente, el conjugado está unido al extremo 3' de la cadena con sentido del ARNip. Ver, por ejemplo, la patente estadounidense n.° 8,106,022. Determinados grupos conjugados descritos en la presente son más activos y/o más fáciles de sintetizar que los grupos conjugados descritos anteriormente. En determinadas modalidades de la presente invención, los conjugados están unidos a compuestos antisentido de cadena simple, inclusive, de modo no taxativo compuestos antisentido basados en la RNasa H y compuestos antisentido que alteran el corte y empalme de un ácido nucleico objetivo pre-ARNm. En dichas modalidades, el conjugado debería permanecer unido al compuesto antisentido durante el tiempo suficiente para

otorgar beneficios (mejora de la absorción en las células) pero luego debería escindirse o dejar de interferir con los pasos posteriores necesarios para la actividad, tales como hibridación a un ácido nucleico objetivo e interacción con la RNasa H o enzimas asociadas con el corte y empalme o la modulación del corte y empalme. Este balance de propiedades es más importante en el ámbito de los compuestos antisentido de cadena simple que en los compuestos de ARNip, donde el conjugado puede simplemente estar unido a la cadena con sentido. Se describen en la presente compuestos conjugados antisentido de cadena simple con un aumento de potencia en células hepáticas in vivo en comparación con el mismo compuesto antisentido carente del conjugado. Dado el balance de propiedades necesario para este compuesto, dicho aumento de potencia es sorprendente.

En determinadas modalidades, los grupos conjugados de la presente comprenden un resto escindible. Tal como se observó, sin pretender limitarse a ningún mecanismo, es lógico que el conjugado permanezca en el compuesto durante el tiempo suficiente para proporcionar el aumento de la absorción, pero luego de esto, es deseable que se escinda alguna parte o, idealmente, todo el conjugado, liberando el compuesto original (por ejemplo, el compuesto antisentido) en su forma

más activa. En determinadas modalidades, el resto escindible es un nucleósido escindible. Dichas modalidades aprovechan las nucleasas endógenas en la célula al unir el resto del conjugado (el conglomerado) al oligonucleótido antisentido mediante un nucleósido a través de uno o más enlaces escindibles, tales como aquellos de una unión fosfodiéster. En determinadas modalidades, el conglomerado está unido al nucleósido escindible mediante una unión fosfodiéster. En determinadas modalidades, el nucleósido escindible está unido al oligonucleótido antisentido (compuesto antisentido) mediante una unión fosfodiéster. En determinadas modalidades, el grupo conjugado puede comprender dos o tres nucleósidos escindibles. En dichas modalidades, dichos nucleósidos escindibles están unidos entre sí, al compuesto antisentido y/o al conglomerado mediante enlaces escindibles (como los de una unión fosfodiéster). Determinados conjugados de la presente no comprenden un nucleósido escindible y, en cambio, comprenden un enlace escindible. Se muestra que la suficiente escisión del conjugado desde el oligonucleótido es proporcionada por al menos un enlace que es vulnerable a la escisión en la célula (un enlace escindible).

En determinadas modalidades, los compuestos conjugados antisentido son profármacos. Dichos profármacos se

administran a un animal y finalmente se metabolizan a una forma más activa. Por ejemplo, los compuestos conjugados antisentido se escinden para quitar el conjugado completo o parte de este, lo que da como resultado la forma activa (o más activa) del compuesto antisentido carente del conjugado completo o parte de este.

En determinadas modalidades, los conjugados se unen al extremo 5' de un oligonucleótido. Determinados de dichos conjugados en la posición 5' se escinden de manera más eficaz que sus equivalentes con un grupo conjugado similar unido al extremo 3'. En determinadas modalidades, la mejora de la actividad puede correlacionarse con la mejora de la escisión. En determinadas modalidades, los oligonucleótidos que comprenden un conjugado en el extremo 5' tienen mayor eficacia que los oligonucleótidos con un conjugado en el extremo 3' (ver, por ejemplo, los Ejemplos 56, 81, 83 y 84). Adicionalmente, la unión en la posición 5' permite una síntesis de oligonucleótido más simple. Típicamente, los oligonucleótidos se sintetizan en un soporte sólido en la dirección de 3' a 5'. Para hacer un oligonucleótido conjugado en la posición 3', típicamente, se une un nucleósido preconjugado en la posición 3' al soporte sólido y luego se construye el oligonucleótido de la manera convencional. No

obstante, unir ese nucleósido conjugado al soporte sólido aumenta la complicación de la síntesis. Adicionalmente, con este enfoque, el conjugado luego está presente a lo largo de la síntesis del oligonucleótido y puede degradarse durante las etapas posteriores, o puede limitar los tipos de reacciones y reactivos que pueden utilizarse. Utilizando las estructuras y técnicas descritas en la presente para oligonucleótidos conjugados en la posición 5', se puede sintetizar el oligonucleótido con técnicas estándar automatizadas e introducir el conjugado con el nucleósido final (más cercano al extremo 5') o luego de que se haya escindido el oligonucleótido del soporte sólido.

En vista de la técnica y la presente descripción, el experto podrá realizar cualquiera de los conjugados y oligonucleótidos conjugados de la presente. Adicionalmente, la síntesis de determinados de los conjugados y oligonucleótidos conjugados descritos en la presente es más fácil y/o requiere pocas etapas y es, por lo tanto, más económica que la de los conjugados descritos anteriormente, lo que proporciona ventajas en la fabricación. Por ejemplo, la síntesis de determinados grupos conjugados consiste en menos etapas sintéticas, lo que da como resultado un aumento del rendimiento en relación con grupos conjugados previamente

descritos. Los grupos conjugados tales como GalNAc3-10 en el Ejemplo 46 y GalNAc3-7 en el Ejemplo 48 son mucho más simples que los conjugados descritos anteriormente, tales como los descritos en U.S. 8,106,022 o U.S. 7,262,177 que requieren el ensamblaje de más intermedios químicos. Por consiguiente, estos y otros conjugados descritos en la presente tienen ventajas sobre compuestos descritos anteriormente para su uso con cualquier oligonucleótido, inclusive oligonucleótidos de cadena simple y cualquier cadena de oligonucleótidos de cadena doble (por ejemplo, ARNip).

De manera similar, se describen en la presente grupos de conjugados con únicamente uno o dos ligandos de GalNAc. Tal como se demostró, dichos grupos de conjugados mejoran la actividad de compuestos antisentido. Dichos compuestos son mucho más fáciles de preparar que los conjugados que comprenden tres ligandos de GalNAc. Los grupos de conjugados que comprenden uno o dos ligandos de GalNAc pueden unirse a cualquier compuesto antisentido, inclusive oligonucleótidos de cadena simple y cualquier cadena de oligonucleótidos de cadena doble (por ejemplo, ARNip).

En determinadas modalidades, los conjugados de la presente no alteran de manera sustancial determinadas medidas de

tolerabilidad. Por ejemplo, se demuestra en la presente que los compuestos conjugados antisentido no son más inmunogénicos que los compuestos originales no conjugados. Dado que se mejora la potencia, las modalidades en las que la tolerabilidad permanece igual (o incluso si la tolerabilidad empeora sólo ligeramente en comparación con el aumento de la potencia) tienen propiedades mejoradas para la terapia.

En determinadas modalidades, la conjugación permite que se alteren los compuestos antisentido en formas que tienen consecuencias menos atractivas en ausencia de conjugación. Por ejemplo, en determinadas modalidades, reemplazar uno o más uniones fosforotioato de un compuesto antisentido completamente fosforotioato con uniones fosfodiéster da como resultado una mejora en algunas medidas de tolerabilidad. Por ejemplo, en determinadas instancias, dichos compuestos antisentido con uno o más fosfodiésteres son menos inmunogénicos que el mismo compuesto en el cual cada unión es un fosforotioato. No obstante, en determinadas instancias, tal como se muestra en el Ejemplo 26, ese mismo reemplazo de una o más uniones fosforotioato con uniones fosfodiéster también da como resultado una reducción de la absorción celular y/o pérdida de la potencia. En determinadas modalidades, los compuestos conjugados antisentido descritos

en la presente toleran dicho cambio en las uniones con muy poca pérdida o ninguna en la absorción y potencia en comparación con su equivalente conjugado completamente fosforotioato. De hecho, en determinadas modalidades, por ejemplo, en los Ejemplos 44, 57, 59 y 86, los oligonucleótidos que comprenden un conjugado y al menos una unión internucleósido fosfodiéster presentan un aumento de la potencia in vivo, incluso en relación con un equivalente completamente fosforotioato que también comprende el mismo conjugado. Además, dado que la conjugación da como resultado aumentos sustanciales de la absorción/potencia, puede ser aceptable una pequeña pérdida en esa ganancia sustancial para alcanzar un aumento de la tolerabilidad. Por consiguiente, en determinadas modalidades, los compuestos conjugados antisentido comprenden al menos una unión fosfodiéster.

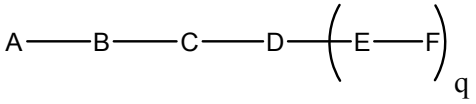
En determinadas modalidades, la conjugación de los compuestos antisentido de la presente da como resultado un aumento en la administración, absorción y actividad de los hepatocitos. Por lo tanto, se administra más compuesto al tejido hepático. No obstante, en determinadas modalidades, ese aumento en la administración por sí solo no explica todo el aumento en la actividad. En determinadas modalidades, más compuesto entra a los hepatocitos. En determinadas modalidades, ni siquiera ese

aumento en la absorción de hepatocitos no explica todo el aumento en la actividad. En dichas modalidades, aumenta la absorción productiva del compuesto conjugado. Por ejemplo, tal como se muestra en el Ejemplo 102, determinadas modalidades de conjugados que contienen GalNAc aumentan el enriquecimiento de oligonucleótidos antisentido en los hepatocitos, en comparación con células no parenquimales. Este enriquecimiento es beneficioso para los oligonucleótidos como genes objetivo que se expresan en hepatocitos.

En determinadas modalidades, los compuestos conjugados antisentido de la presente dan como resultado una reducción de la exposición hepática. Por ejemplo, tal como se muestra en el Ejemplo 20, las concentraciones de los oligonucleótidos antisentido que comprenden determinadas modalidades de conjugados que contienen GalNAc son menores en el riñón que las de los oligonucleótidos antisentido carentes de conjugados que contienen GalNAc. Esto tiene varias implicaciones terapéuticas beneficiosas. Para las indicaciones terapéuticas donde no se busca la actividad en el riñón, la exposición al riñón pone en riesgo la toxicidad del riñón sin un beneficio correspondiente. Además, una alta concentración en el riñón típicamente da como resultado la pérdida del compuesto en la orina, lo que resulta en una

eliminación más rápida. Por consiguiente, para los objetivos que no son del riñón, no se desea la acumulación hepática.

En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona compuestos conjugados antisentido representados por la fórmula:



donde

A es el oligonucleótido antisentido;

B es el resto escindible

C es el enlazador conjugado

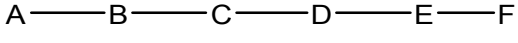
D es el grupo ramificado

cada E es una ligadura (tether);

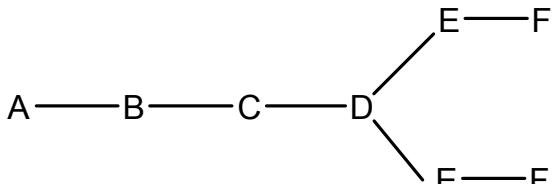
cada F es un ligando; y

q es un entero entre 1 y 5.

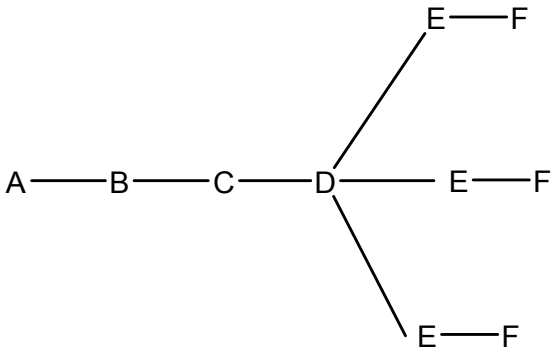
En el diagrama que antecede y en diagramas similares de la presente, el grupo ramificado "D" se ramifica tantas veces como sea necesario para alojar la cantidad de grupos (E-F), tal como lo indica "q". Por lo tanto, cuando q = 1, la fórmula es:



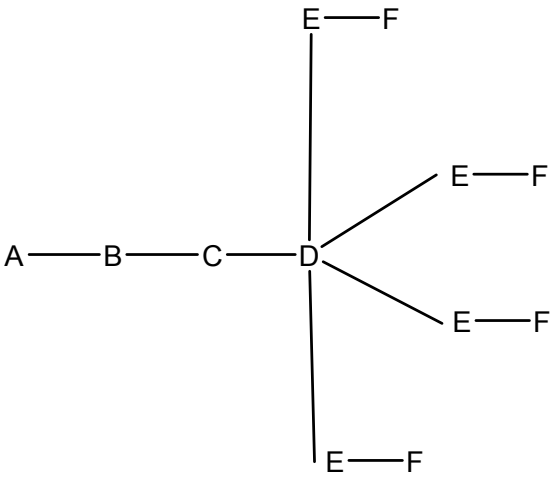
cuando q = 2, la fórmula es:



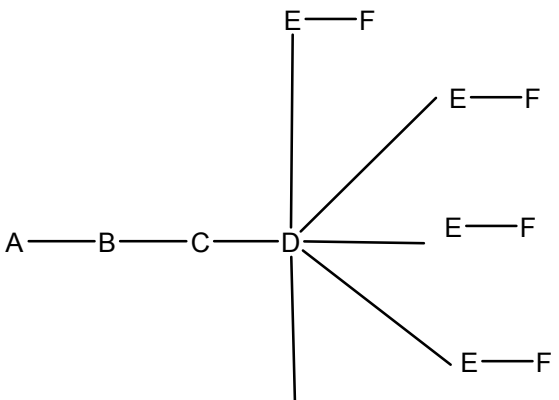
cuando q = 3, la fórmula es:



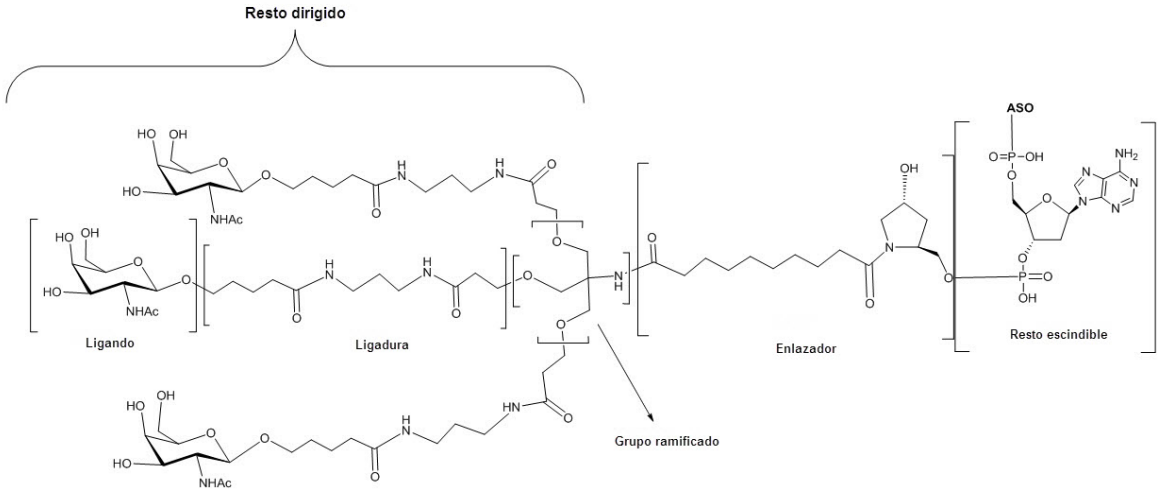
cuando q = 4, la fórmula es:



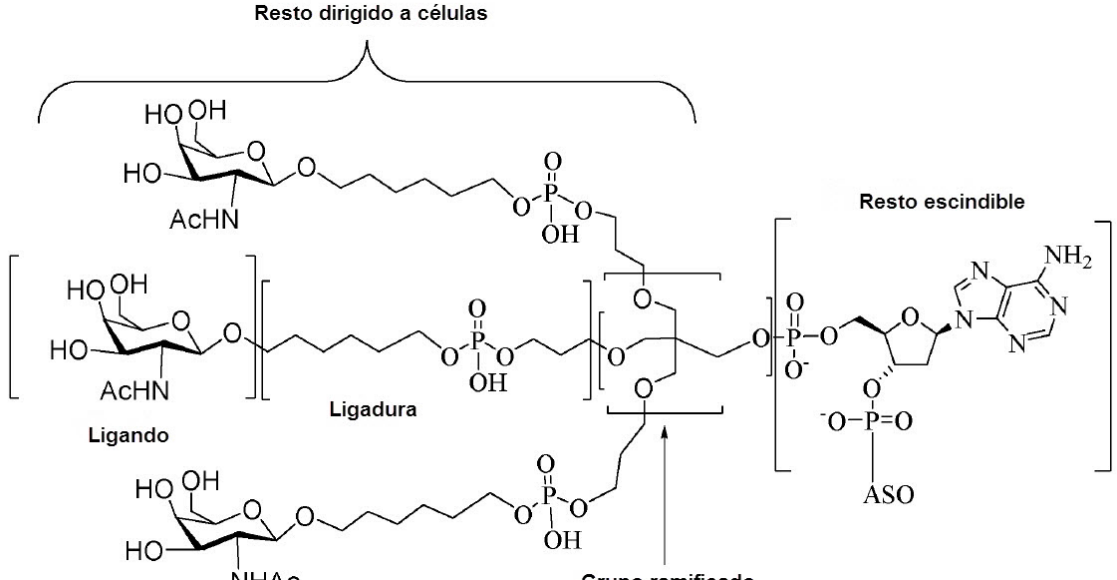
cuando q = 5, la fórmula es:



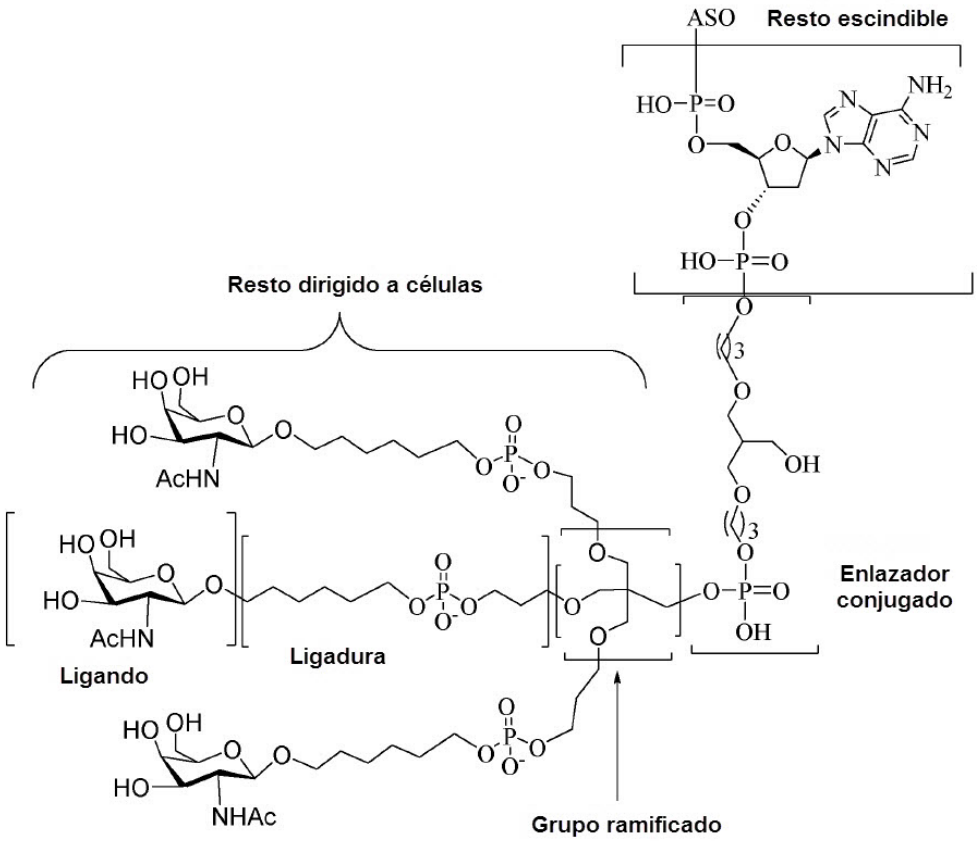
En determinadas modalidades, se proporcionan compuestos conjugados antisentido que tienen la estructura:



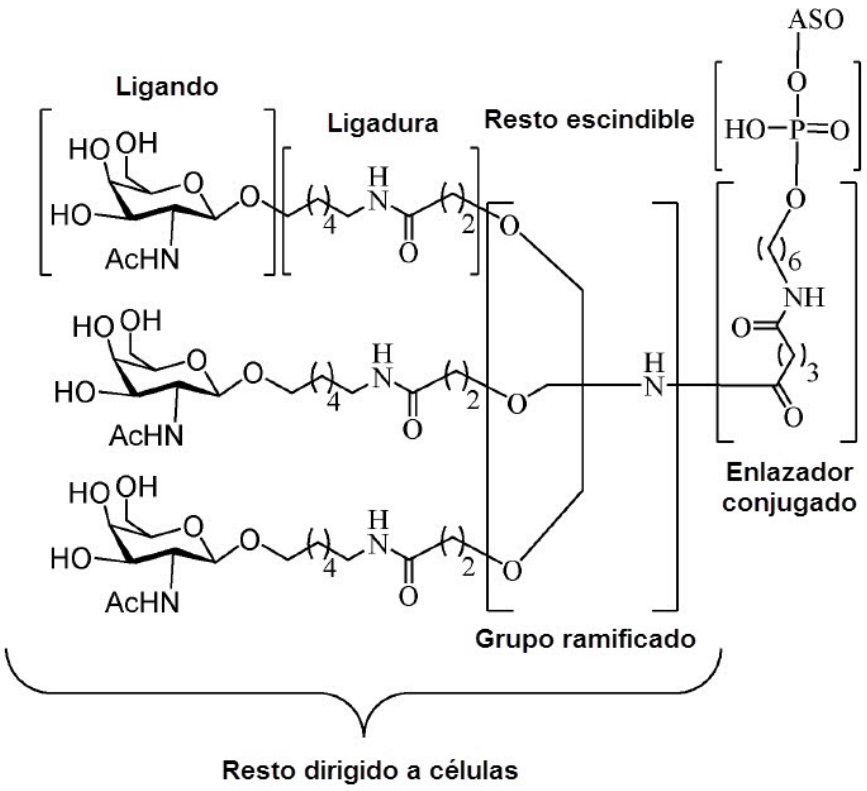
En determinadas modalidades, se proporcionan compuestos conjugados antisentido que tienen la estructura:



En determinadas modalidades, se proporcionan compuestos conjugados antisentido que tienen la estructura:

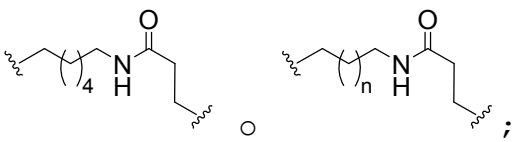


En determinadas modalidades, se proporcionan compuestos conjugados antisentido que tienen la estructura:



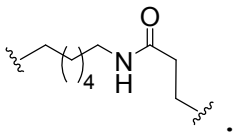
La presente descripción proporciona las siguientes modalidades numeradas no taxativas:

Modalidad 1. El compuesto conjugado antisentido de cualquiera de las modalidades 1179 a 1182, donde la ligadura tiene una estructura que se selecciona de entre:

 o ;

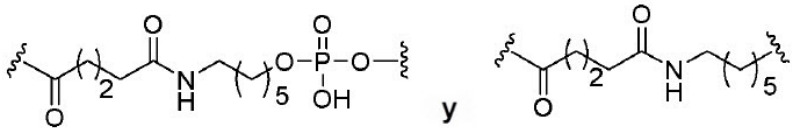
donde cada n es, independientemente, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

Modalidad 2. El compuesto conjugado antisentido de cualquiera de las modalidades 1179 a 1182, donde la ligadura tiene la estructura:

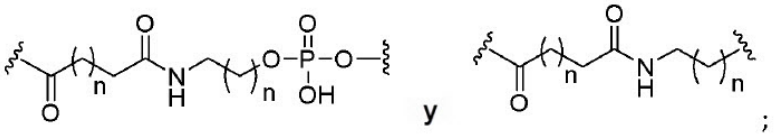


.

Modalidad 3. El compuesto conjugado antisentido de cualquiera de las modalidades 1179 a 1182 o 1688 a 1689, donde el enlazador tiene una estructura que se selecciona de entre:



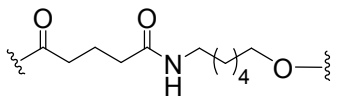
Modalidad 4. El compuesto conjugado antisentido de cualquiera de las modalidades 1179 a 1182 o 1688 a 1689, donde el enlazador tiene una estructura que se selecciona de entre:



;

donde cada n es, independientemente, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

Modalidad 5. El compuesto conjugado antisentido de cualquiera de las modalidades 1179 a 1182 o 1688 a 1689, donde el enlazador tiene la estructura:



.

En las modalidades que tienen más de una variable particular (por ejemplo, más de una "m" o "n"), a menos que se indique lo contrario, cada una de dichas variables particulares se selecciona independientemente. Por lo tanto, para una estructura que tenga más de una n, cada n se selecciona independientemente, de manera que puedan o no ser iguales entre sí.

i. <u>Algunos restos escindibles</u>

En determinadas modalidades, un resto escindible es un enlace escindible. En determinadas modalidades, un resto escindible comprende un enlace escindible. En determinadas modalidades, el grupo conjugado comprende un resto escindible. En determinadas de dichas modalidades, el resto escindible se acopla al oligonucleótido antisentido. En determinadas de dichas modalidades, el resto escindible se acopla

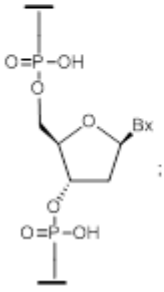
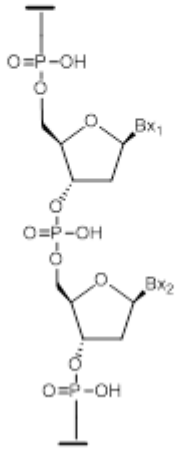
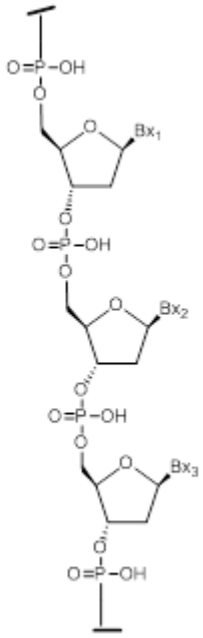
directamente al resto dirigido a células. En determinadas de dichas modalidades, el resto escindible se acopla al enlazador conjugado. En determinadas modalidades, el resto escindible comprende un fosfato o fosfodiéster. En determinadas modalidades, el resto escindible es un análogo de nucleósido o nucleósido escindible. En determinadas modalidades, el nucleósido o análogo de nucleósido comprende una base heterocíclica opcionalmente protegida seleccionada de purina, purina sustituida, pirimidina o pirimidina sustituida. En determinadas modalidades, el resto escindible es un nucleósido que comprende una base heterocíclica opcionalmente protegida seleccionada de uracilo, timina, citosina, 4-N-benzoilcitosina, 5-metilcitosina, 4-N-benzoil-5-metilcitosina, adenina, 6-N-benzoiladenina, guanina y 2-N-isobutirilguanina. En determinadas modalidades, el resto escindible es un nucleósido 2'-desoxi que está acoplado a la posición 3' del oligonucleótido antisentido mediante una unión fosfodiéster y está acoplado al enlazador mediante una unión fosfodiéster o fosforotioato. En determinadas modalidades, el resto escindible es una adenosina 2'-desoxi que está acoplada a la posición 3' del oligonucleótido antisentido mediante una unión fosfodiéster y está acoplada al enlazador mediante una unión fosfodiéster o fosforotioato. En determinadas modalidades, el resto escindible es una

adenosina 2'-desoxi que está acoplada a la posición 3' del oligonucleótido antisentido mediante una unión fosfodiéster y está acoplada al enlazador mediante una unión fosfodiéster.

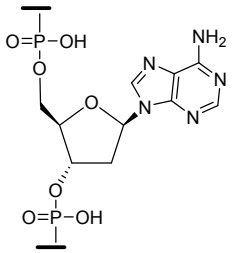
En determinadas modalidades, el resto escindible está acoplado a la posición 3' del oligonucleótido antisentido. En determinadas modalidades, el resto escindible está acoplado a la posición 5' del oligonucleótido antisentido. En determinadas modalidades, el resto escindible está acoplado a una posición 2' del oligonucleótido antisentido. En determinadas modalidades, el resto escindible está acoplado al oligonucleótido antisentido mediante una unión fosfodiéster. En determinadas modalidades, el resto escindible está acoplado al enlazador ya sea por una unión fosfodiéster como una unión fosforotioato. En determinadas modalidades, el resto escindible está acoplado al enlazador mediante una unión fosfodiéster. En determinadas modalidades, el grupo conjugado no incluye un resto escindible.

En determinadas modalidades, el resto escindible se escinde después de que se administró el complejo a un animal únicamente después de que fue internalizado por una célula objetivo. Dentro de la célula, el resto escindible se escinde y de esta manera libera el oligonucleótido antisentido

activo. Sin pretender limitarse por la teoría, se cree que el resto escindible se escinde mediante una o más nucleasas dentro de la célula. En determinadas modalidades, la una o m sfodiéster entre el resto e erminadas modalidades, el r ura seleccionada de entre l

donde cada uno de Bx, Bx_1, Bx_2, y Bx_3 es, independientemente, un resto de base heterocíclica. En determinadas modalidades, el resto escindible tiene una estructura seleccionada de entre las siguientes:



ii. <u>Algunos enlazadores</u>

En determinadas modalidades, los grupos conjugados comprenden un enlazador. En determinadas de dichas modalidades, el enlazador está unido de manera covalente al resto escindible. En determinadas de dichas modalidades, el enlazador está unido de manera covalente al oligonucleótido antisentido. En determinadas de dichas modalidades, el enlazador está unido de manera covalente a un resto dirigido a células. En determinadas modalidades, el enlazador comprende además un acoplamiento covalente a un soporte sólido. En determinadas modalidades, el enlazador comprende además un acoplamiento covalente al resto de unión a proteínas. En determinadas modalidades, el enlazador comprende además un acoplamiento covalente a un soporte sólido y comprende adicionalmente un acoplamiento covalente a un resto de unión a proteínas. En determinadas modalidades, el enlazador incluye múltiples posiciones para el acoplamiento de ligandos ligados. En determinadas modalidades, el enlazador incluye múltiples posiciones para el acople de ligandos ligados y no está acoplado a un grupo ramificado. En determinadas modalidades, el enlazador comprende además uno o más enlaces escindibles. En determinadas modalidades, el grupo conjugado no incluye un

enlazador.

En determinadas modalidades, el etilenglicol incluye al menos un grupo lineal que comprende grupos seleccionados de grupos alquilo, amida, disulfuro, polietilenglicol, éter, tioéter (-S-) e hidroxilamino (-O-N(H)-). En determinadas modalidades, el grupo lineal comprende grupos seleccionados de grupos alquilo, amida y éter. En determinadas modalidades, el grupo lineal comprende grupos seleccionados de grupos alquilo y éter. En determinadas modalidades, el grupo lineal comprende al menos un grupo de unión a fósforo. En determinadas modalidades, el grupo lineal comprende al menos un grupo fosfodiéster. En determinadas modalidades, el grupo lineal comprende al menos un grupo de unión neutra. En determinadas modalidades, el grupo lineal está acoplado de manera covalente al resto dirigido a células y al resto escindible. En determinadas modalidades, el grupo lineal está acoplado de manera covalente al resto dirigido a células y al oligonucleótido antisentido. En determinadas modalidades, el grupo lineal está acoplado de manera covalente al resto dirigido a células, al resto escindible y al soporte sólido. En determinadas modalidades, el grupo lineal está acoplado de manera covalente al resto dirigido a células, al resto escindible, al soporte sólido y a un resto de unión a

proteínas. En determinadas modalidades, el grupo lineal incluye uno o más enlaces escindibles.

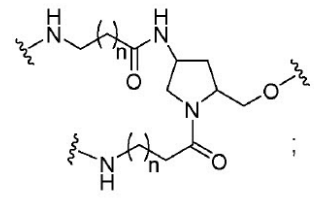
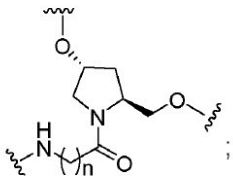
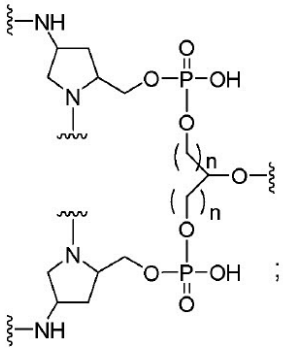
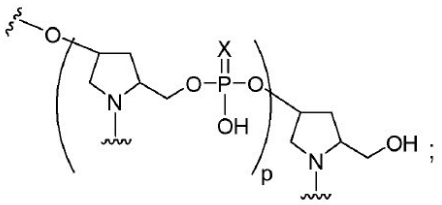
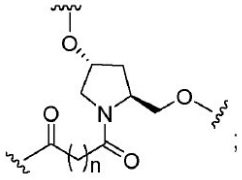
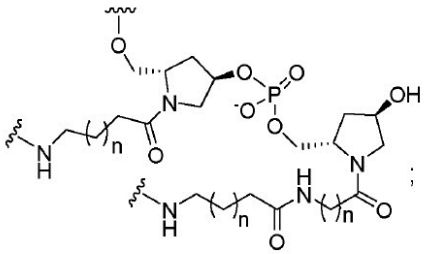
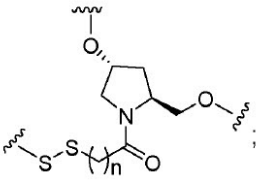
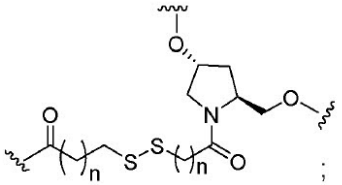
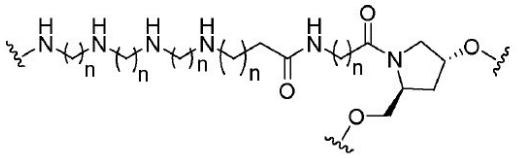
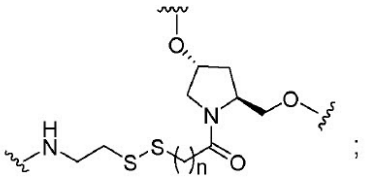
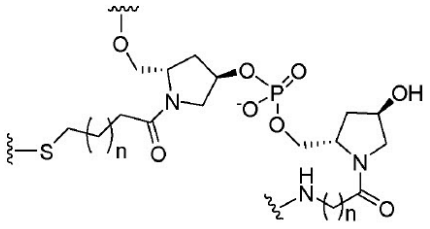
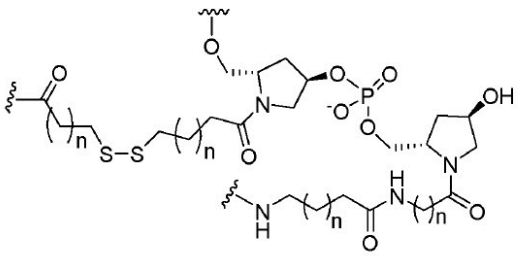
En determinadas modalidades, el enlazador incluye el grupo lineal acoplado de manera covalente a un grupo estructural. En determinadas modalidades, el grupo estructural incluye un grupo alifático ramificado que comprende grupos seleccionados de grupos alquilo, amida, disulfuro, polietilenglicol, éter, tioéter e hidroxilamino. En determinadas modalidades, el grupo estructural incluye un grupo alifático ramificado que comprende grupos seleccionados de grupos alquilo, amida, y éter. En determinadas modalidades, el grupo estructural incluye un sistema de anillo mono o policíclico. En determinadas modalidades, el grupo estructural incluye al menos dos sistemas de anillos mono o policíclicos. En determinadas modalidades, el grupo lineal está acoplado covalentemente al grupo estructural y el grupo estructural está acoplado covalentemente al resto escindible y al enlazador. En determinadas modalidades, el grupo lineal está acoplado covalentemente al grupo estructural y el grupo estructural está acoplado covalentemente al resto escindible, al enlazador y a un soporte sólido. En determinadas modalidades, el grupo lineal está acoplado covalentemente al grupo estructural y el grupo estructural está acoplado

covalentemente al resto escindible, al enlazador y a un resto de unión a proteínas. En determinadas modalidades, el grupo lineal está acoplado covalentemente al grupo estructural y el grupo estructural está acoplado covalentemente al resto escindible, al enlazador, a un resto de unión a proteínas y a un soporte sólido. En determinadas modalidades, el grupo estructural incluye uno o más enlaces escindibles.

En determinadas modalidades, el enlazador incluye un resto de unión a proteínas. En determinadas modalidades, el resto de unión a proteínas es un lípido tal como, por ejemplo, incluido, de modo no taxativo, colesterol, ácido cólico, ácido adamantano acético, ácido 1-pireno butírico, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritil o fenoxazina), una vitamina (por ejemplo, folato, vitamina A, vitamina E, biotina, piridoxal), un péptido, un carbohidrato (por ejemplo, monosacárido, disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido, polisacárido), un componente endosomolítico, un esteroide (por ejemplo, uvaol, hecigenina, diosgenina), un terpeno (por ejemplo, triterpeno, por ejemplo,

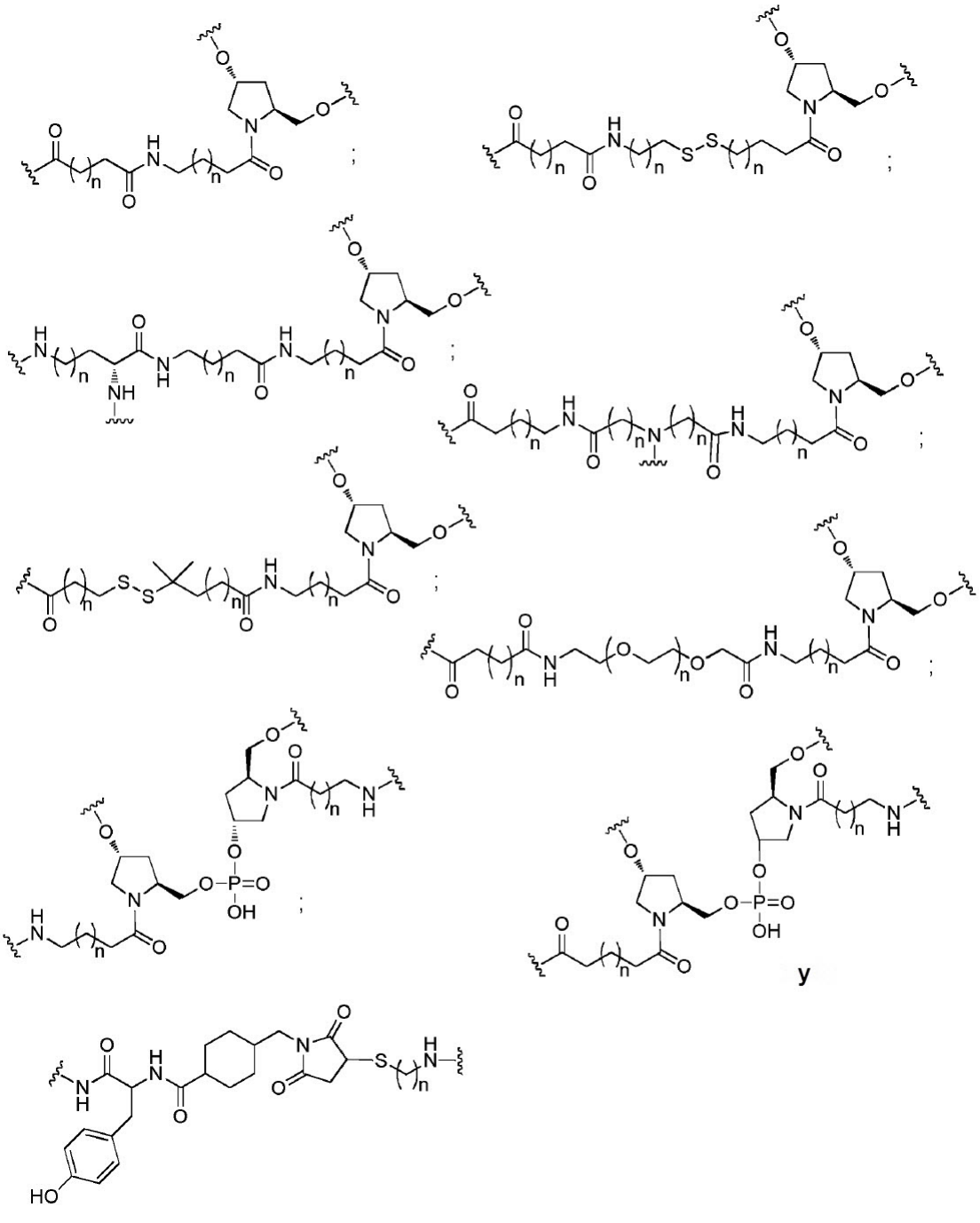
sarsasapogenina, friedelina, ácido litocólico derivado de epifriedelanol) o un lípido catiónico. En determinadas modalidades, el resto de unión a proteínas es un colesterol, ácido cólico, vitamina E, adamantano, 1-pentafluoropropilo o ácido graso saturado o insaturado de cadena larga C16 a C22.

En determinadas modalidades, un enlazador tiene una estructura seleccionada de entre:


;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

y


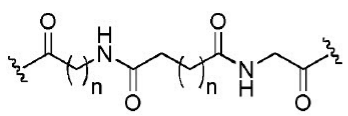
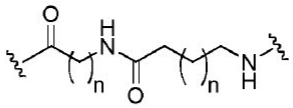
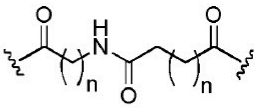
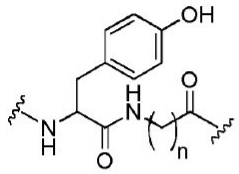
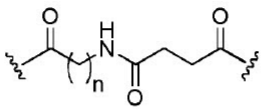
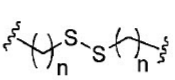
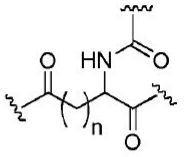
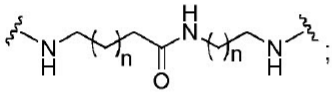
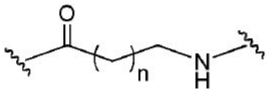
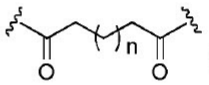
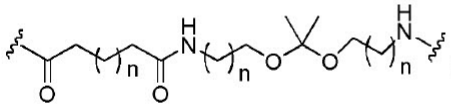
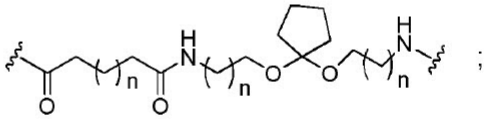
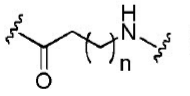
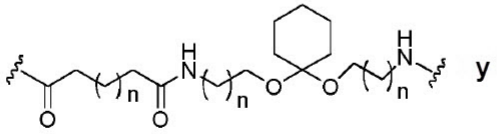
donde cada n es independientemente 1 a 20; y p es de 1 a 6.

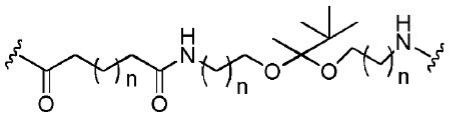
En determinadas modalidades, un enlazador tiene una estructura seleccionada de entre:



donde cada n es, independientemente, de 1 a 20.

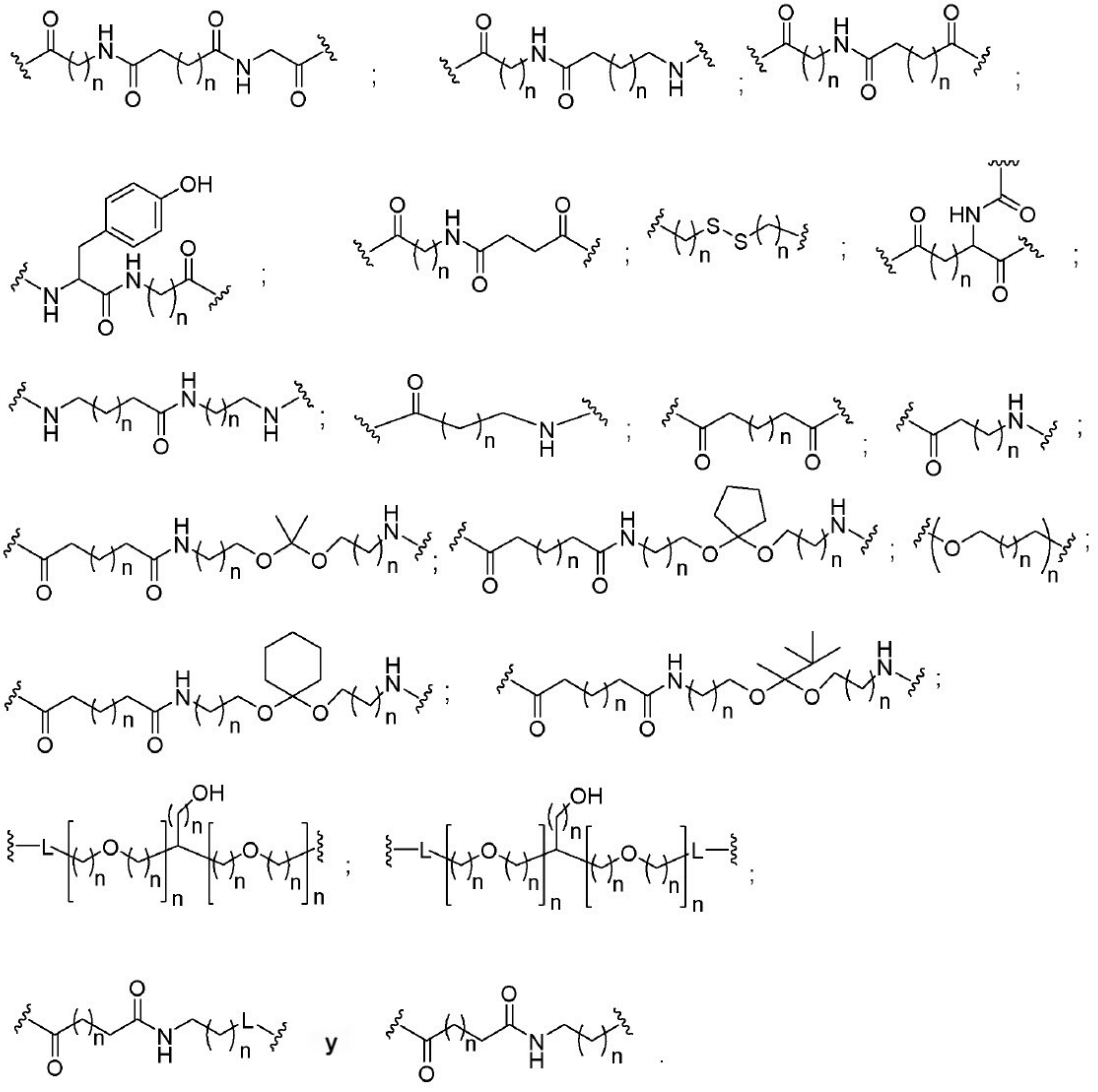
En determinadas modalidades, un enlazador tiene una estructura seleccionada de entre:


;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

y



donde n es de 1 a 20.

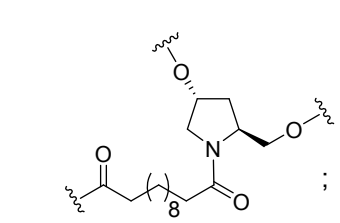
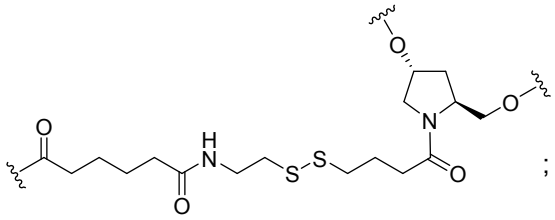
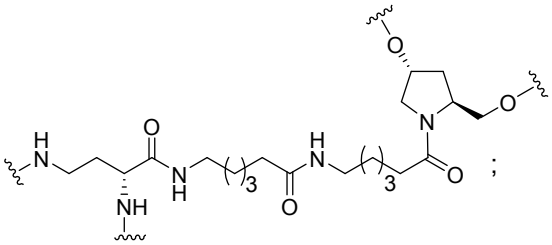
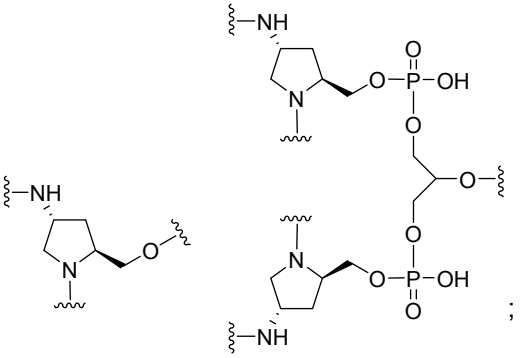
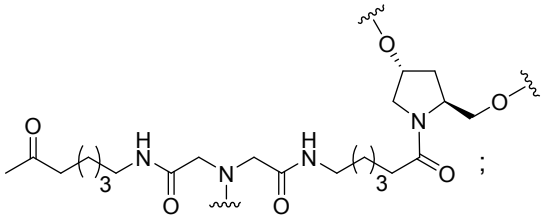
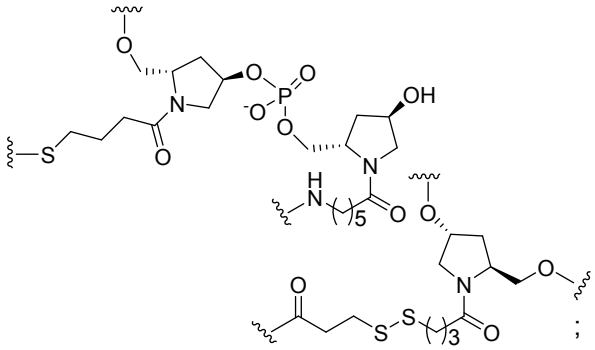
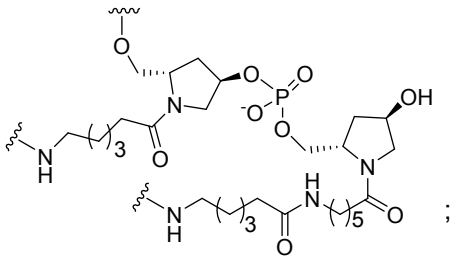
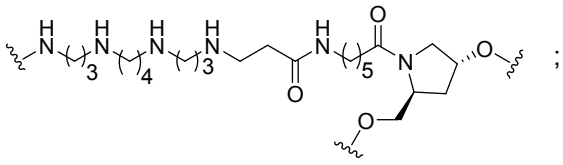
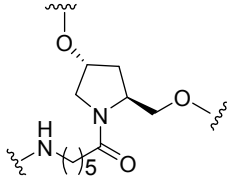
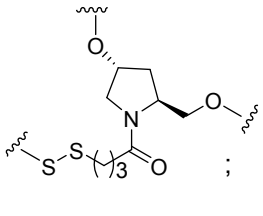
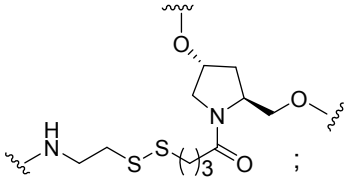
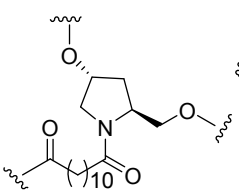
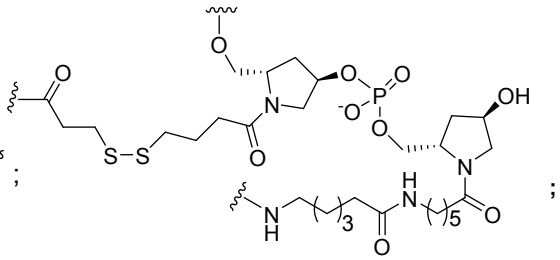
En determinadas modalidades, un enlazador tiene una estructura seleccionada de entre:

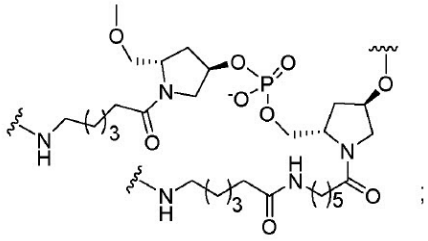
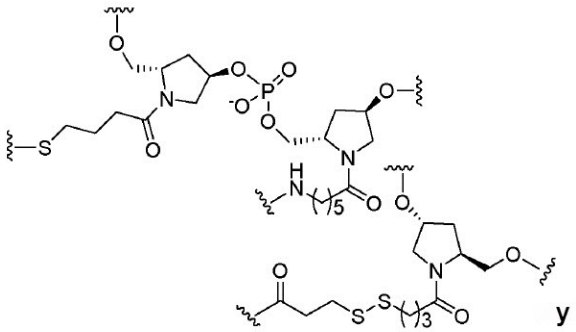
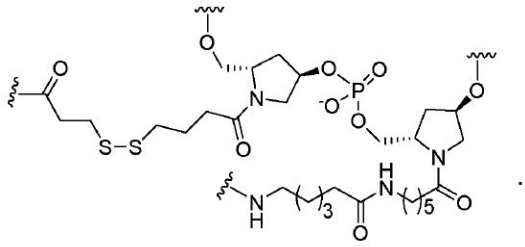


donde cada L es, independientemente, un grupo de unión a fósforo o un grupo de unión neutro; y

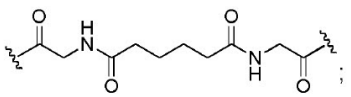
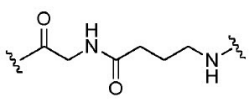
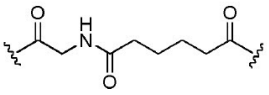
cada n es, independientemente, de 1 a 20.

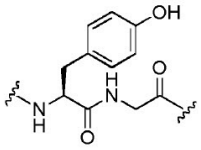
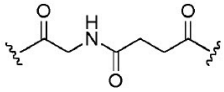
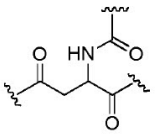
En determinadas modalidades, un enlazador tiene una estructura seleccionada de entre:

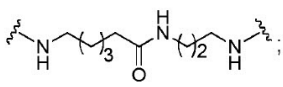
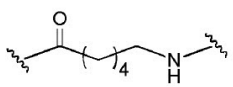
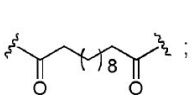

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

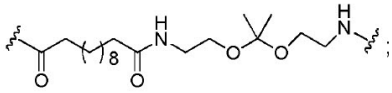
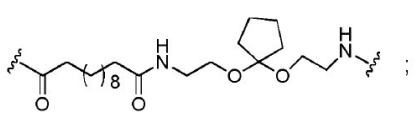

;

y

.

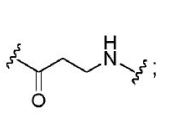
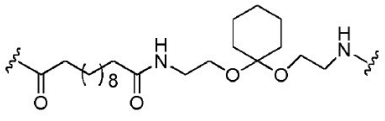
En determinadas modalidades, un enlazador tiene una estructura seleccionada de entre:


;

;

;

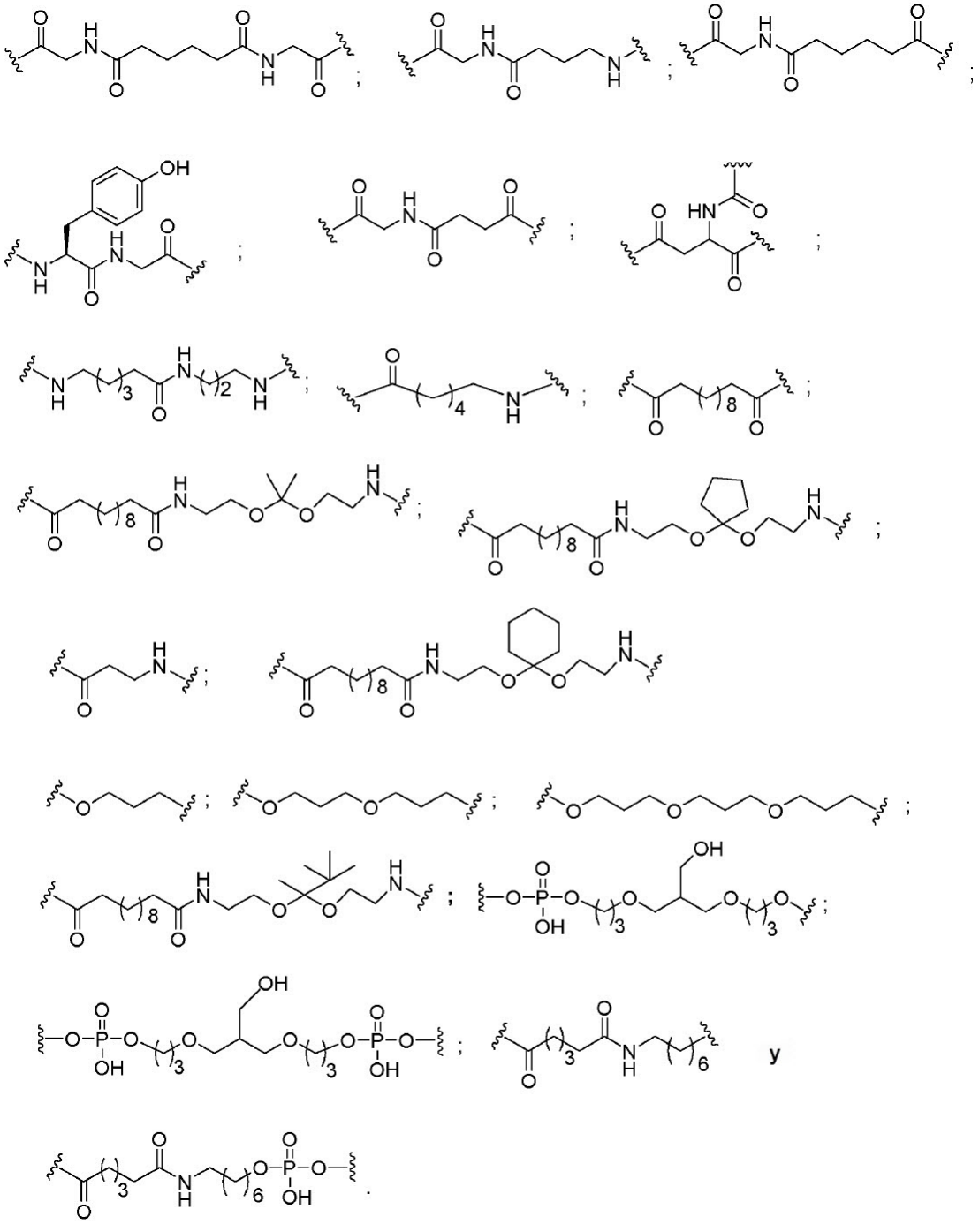

;

;

;


;

;

;

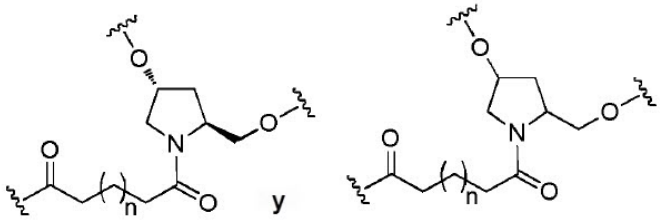

;

;


;

y

En determinadas modalidades, un enlazador tiene una estructura seleccionada de entre:

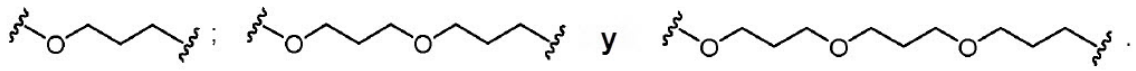


En determinadas modalidades, un enlazador tiene una estructura seleccionada de entre:

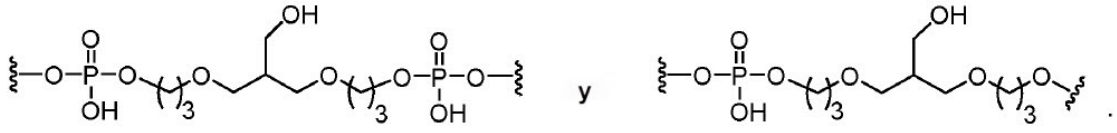


donde n es de 1 a 20.

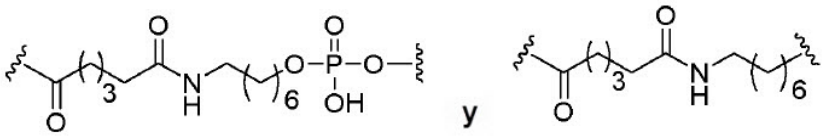
En determinadas modalidades, un enlazador tiene una estructura seleccionada de entre:



En determinadas modalidades, un enlazador tiene una estructura seleccionada de entre:

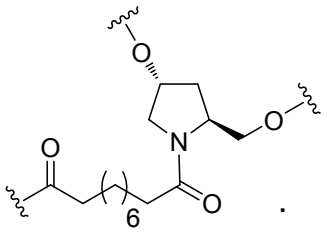


En determinadas modalidades, un enlazador tiene una estructura seleccionada de entre:



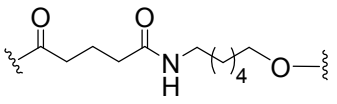
En determinadas modalidades, el enlazador conjugado tienen la

estructura:



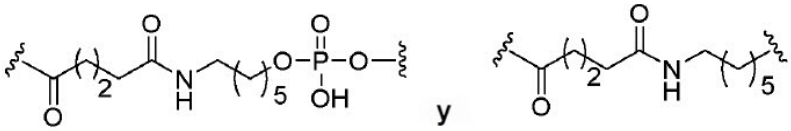
.

En determinadas modalidades, el enlazador conjugado tienen la estructura:

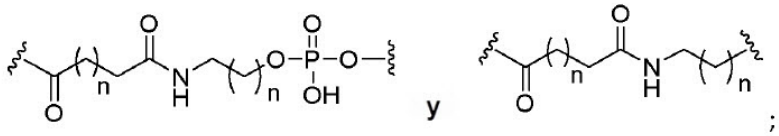


.

En determinadas modalidades, un enlazador tiene una estructura seleccionada de entre:



En determinadas modalidades, un enlazador tiene una estructura seleccionada de entre:



donde cada n es, independientemente, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

iii. <u>Algunos restos dirigidos a células</u>

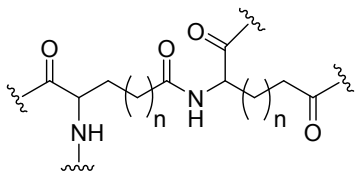
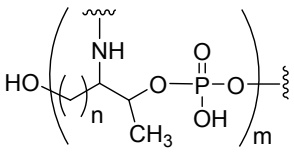
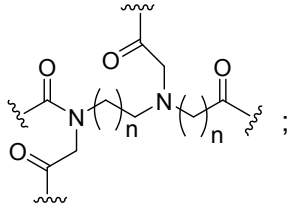
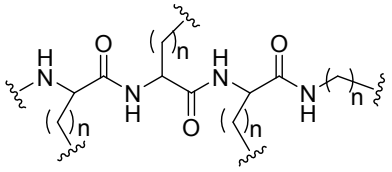
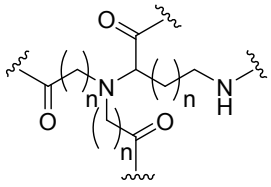
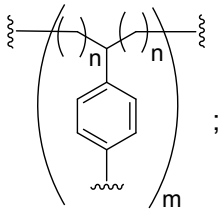
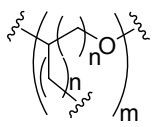
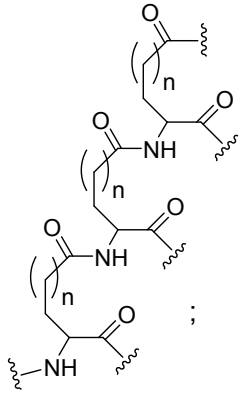
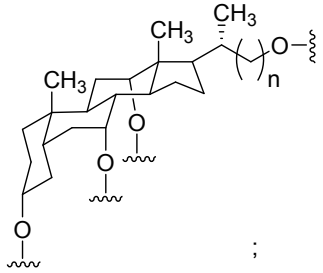
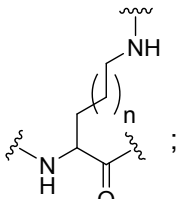
En determinadas modalidades, los grupos conjugados comprenden restos dirigidos a células. Determinados de dichos restos dirigidos a células aumentan la absorción celular de compuestos antisentido. En determinadas modalidades, los restos dirigidos a células comprenden un grupo ramificado, una o más ligaduras y uno o más ligandos. En determinadas modalidades, los restos dirigidos a células comprenden un grupo ramificado, una o más ligaduras, uno o más ligandos y uno o más enlaces escindibles.

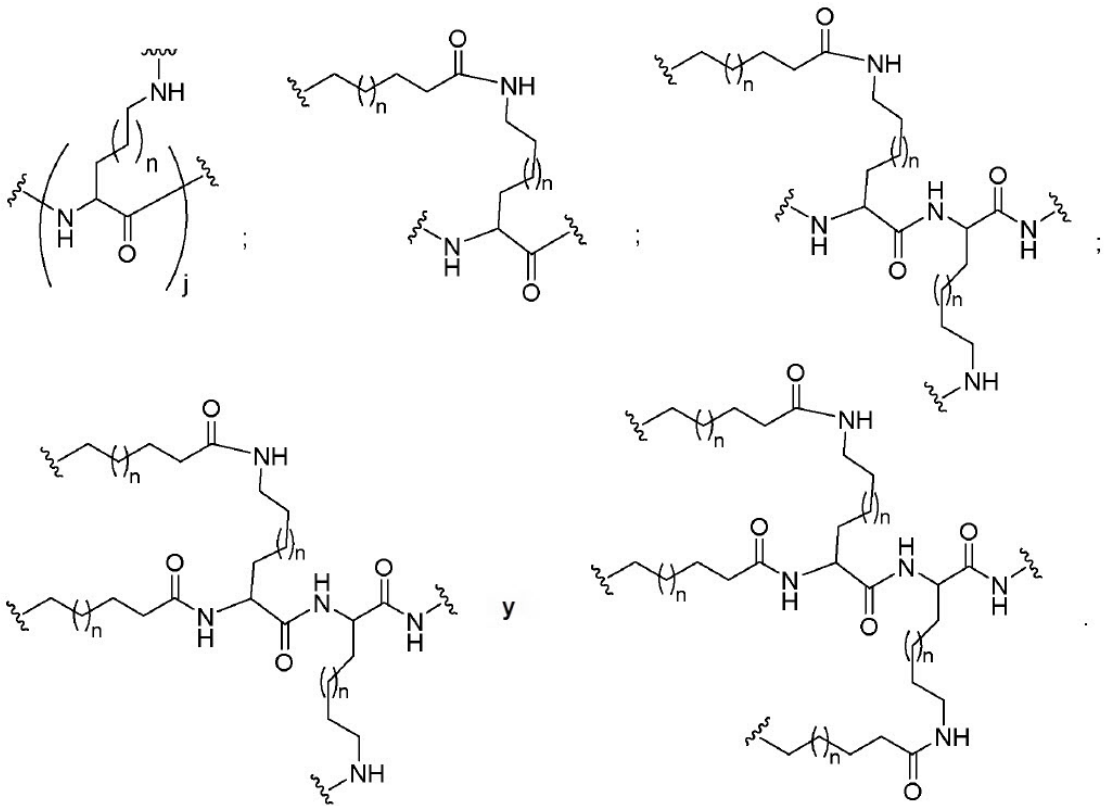
1. **Algunos grupos ramificados**

En determinadas modalidades, los grupos conjugados comprenden un resto dirigido que comprende un grupo ramificado y al menos dos ligandos ligados. En determinadas de dichas modalidades, el grupo ramificado se acopla al enlazador conjugado. En determinadas de dichas modalidades, el grupo ramificado se acopla al resto escindible. En determinadas de dichas modalidades, el grupo ramificado se acopla al oligonucleótido antisentido. En determinadas modalidades, el grupo ramificado está acoplado de manera covalente al enlazador y cada uno de los ligandos ligados. En determinadas modalidades, el grupo ramificado comprende un grupo alifático ramificado que comprende grupos seleccionados de grupos

alquilo, amida, disulfuro, polietilenglicol, éter, tioéter e hidroxilamino. En determinadas modalidades, el grupo ramificado comprende grupos seleccionados de grupos alquilo, amida y éter. En determinadas modalidades, el grupo ramificado comprende grupos seleccionados de grupos alquilo y éter. En determinadas modalidades, el grupo ramificado comprende un sistema de anillo mono o policíclico. En determinadas modalidades, el grupo ramificado comprende uno o más enlaces escindibles. En determinadas modalidades, el grupo conjugado no incluye un grupo ramificado.

En determinadas modalidades, un grupo ramificado tiene una estructura seleccionada de entre:


;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

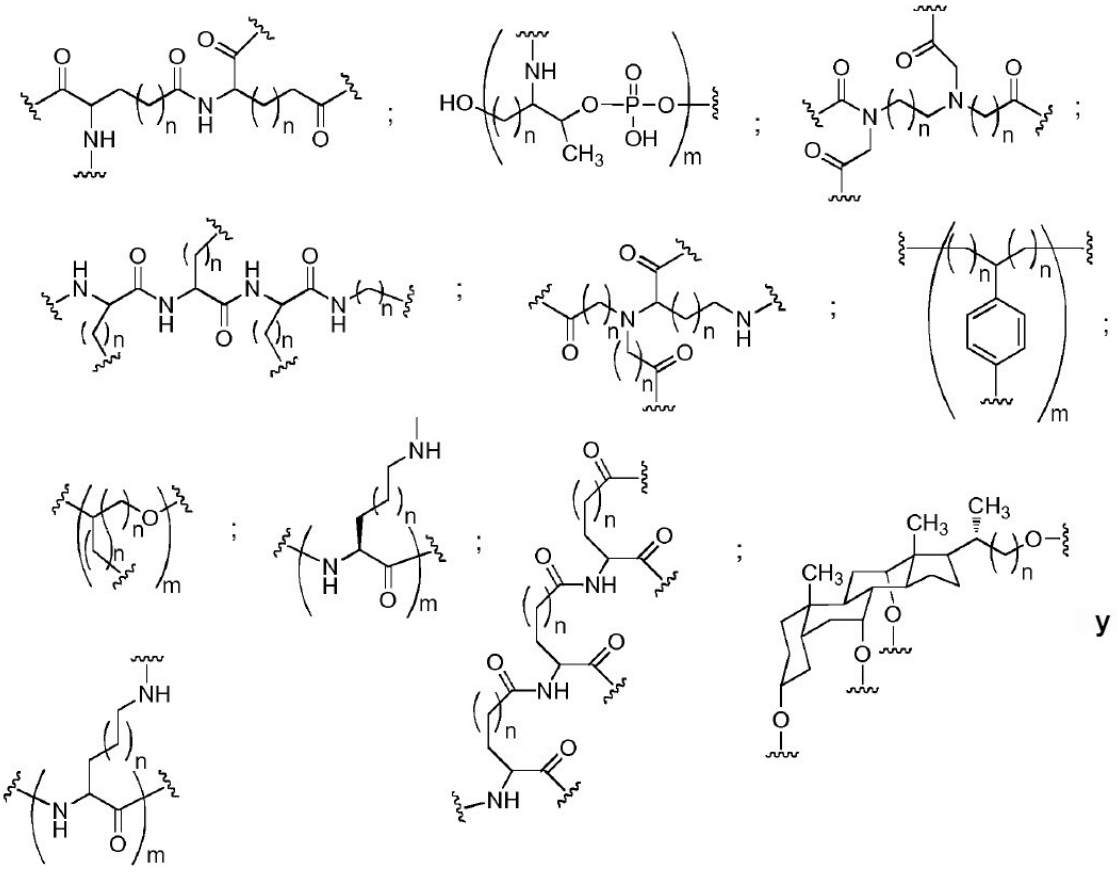


donde cada n es, independientemente, de 1 a 20;

j es de 1 a 3; y

m es de 2 a 6.

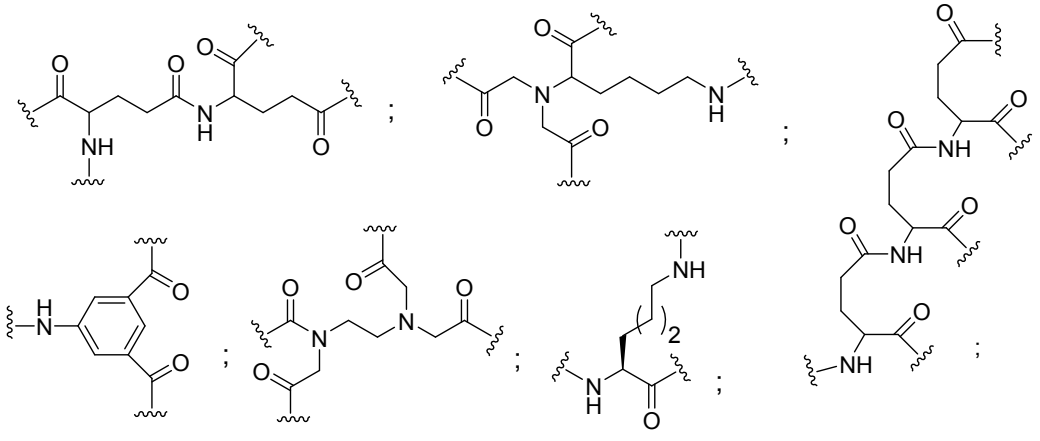
En determinadas modalidades, un grupo ramificado tiene una estructura seleccionada de entre:

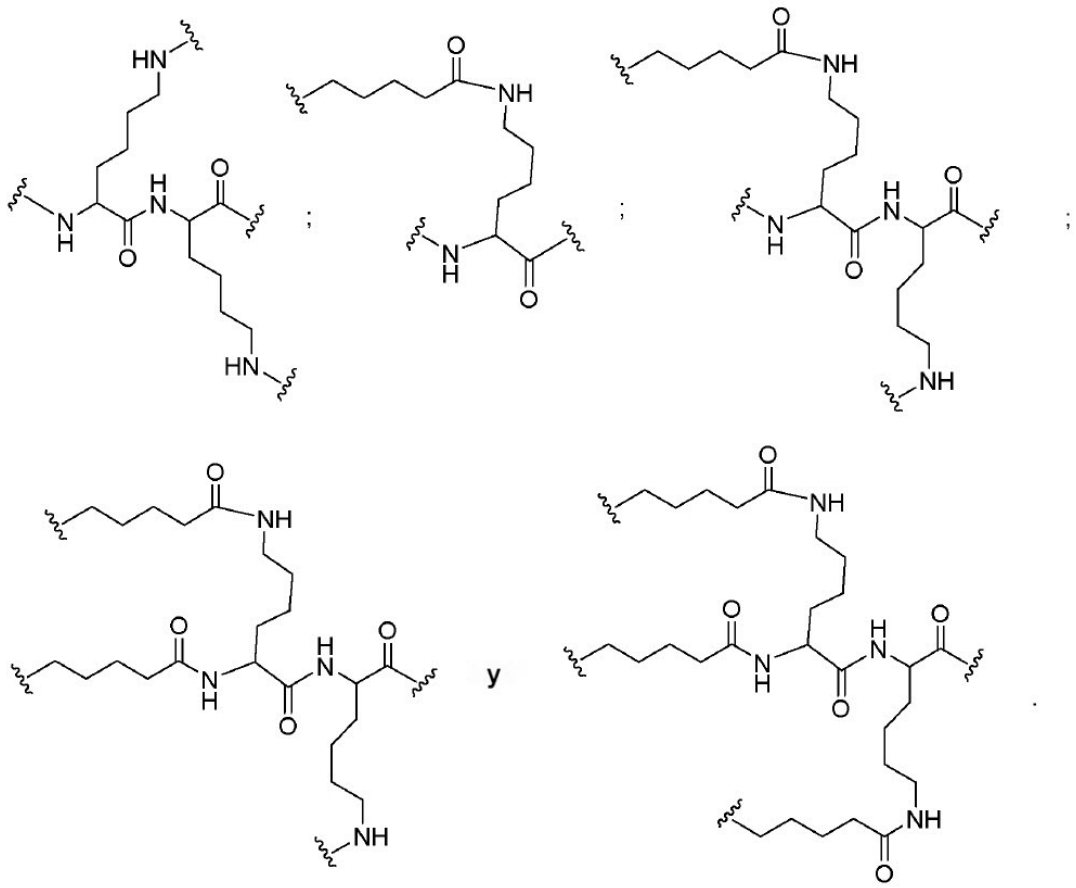


donde cada n es, independientemente, de 1 a 20; y

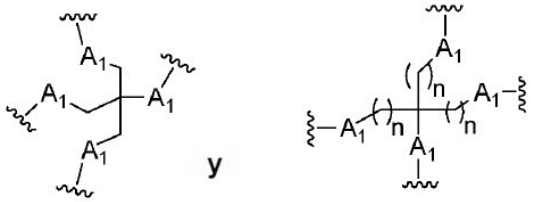
m es de 2 a 6.

En determinadas modalidades, un grupo ramificado tiene una estructura seleccionada de entre:



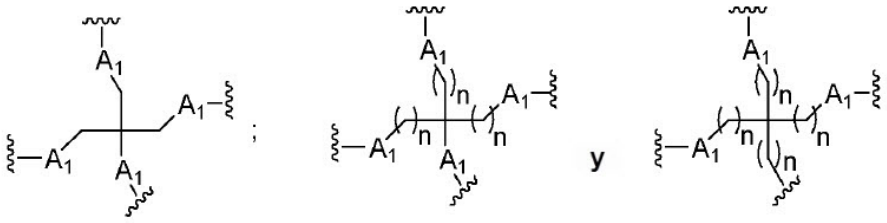


En determinadas modalidades, un grupo ramificado tiene una estructura seleccionada de entre:



donde cada A_1 es, independientemente, O, S, C=O o NH; y cada n es, independientemente, de 1 a 20.

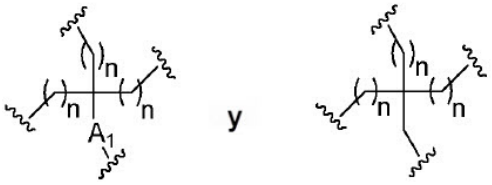
En determinadas modalidades, un grupo ramificado tiene una estructura seleccionada de entre:



donde cada A_1 es, independientemente, O, S, C=O o NH; y

cada n es, independientemente, de 1 a 20.

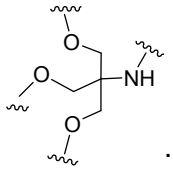
En determinadas modalidades, un grupo ramificado tiene una estructura seleccionada de entre:



donde A_1 es O, S, C=O o NH; y

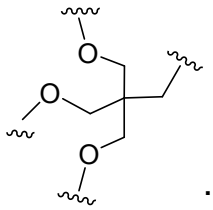
cada n es, independientemente, de 1 a 20.

En determinadas modalidades, un grupo ramificado tiene una estructura seleccionada de entre:

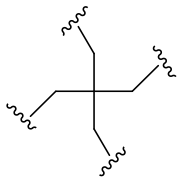


.

En determinadas modalidades, un grupo ramificado tiene una estructura seleccionada de entre:



En determinadas modalidades, un grupo ramificado tiene una estructura seleccionada de entre:



2. <u>Algunas ligaduras</u>

En determinadas modalidades, los grupos conjugados comprenden una o más ligaduras acopladas de manera covalente al grupo ramificado. En determinadas modalidades, los grupos conjugados comprenden una o más ligaduras acopladas de manera covalente al grupo de unión. En determinadas modalidades, cada ligadura es un grupo alifático lineal que comprende uno o más grupos seleccionados de grupos alquilo, éter, tioéter, disulfuro, amida y polietilenglicol en cualquier combinación. En determinadas modalidades, cada ligadura es un grupo alifático lineal que comprende uno o más grupos seleccionados de grupos alquilo, alquilo sustituido, éter, tioéter, disulfuro, amida, fosfodiéster y polietilenglicol en

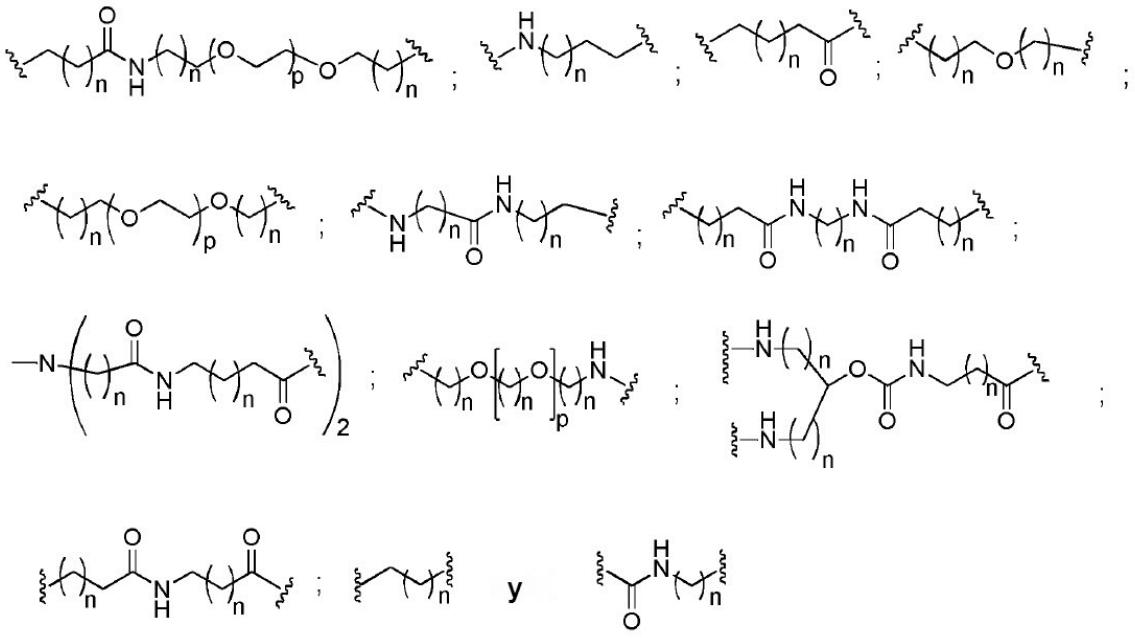
cualquier combinación. En determinadas modalidades, cada ligadura es un grupo alifático lineal que comprende uno o más grupos seleccionados de grupos alquilo, éter y amida en cualquier combinación. En determinadas modalidades, cada ligadura es un grupo alifático lineal que comprende uno o más grupos seleccionados de grupos alquilo, alquilo sustituido, fosfodiéster, éter y amida en cualquier combinación. En determinadas modalidades, cada ligadura es un grupo alifático lineal que comprende uno o más grupos seleccionados de grupos alquilo y fosfodiéster en cualquier combinación. En determinadas modalidades, cada ligadura comprende al menos un grupo de unión a fósforo o grupo de unión neutro.

En determinadas modalidades, el ligadura incluye uno o más enlaces escindibles. En determinadas modalidades, la ligadura está acoplada al grupo ramificado a través ya sea de un grupo amida o un grupo éter. En determinadas modalidades, la ligadura está acoplada al grupo ramificado a través de un grupo fosfodiéster. En determinadas modalidades, la ligadura está acoplada al grupo ramificado a través de un grupo de unión a fósforo o un grupo de unión neutro. En determinadas modalidades, la ligadura está acoplada al grupo ramificado a través de un grupo éter. En determinadas modalidades, la ligadura está acoplada al ligando a través ya sea de un grupo

amida o un grupo éter. En determinadas modalidades, la ligadura está acoplada al ligando a través de un grupo éter. En determinadas modalidades, la ligadura está acoplada al ligando a través ya sea de un grupo amida o un grupo éter. En determinadas modalidades, la ligadura está acoplada al ligando a través de un grupo éter.

En determinadas modalidades, cada ligadura comprende de alrededor de 8 a alrededor de 20 átomos de longitud de cadena entre el ligando y el grupo ramificado. En determinadas modalidades, cada grupo de ligadura comprende de alrededor de 10 a alrededor de 18 átomos de longitud de cadena entre el ligando y el grupo ramificado. En determinadas modalidades, cada grupo de ligadura comprende alrededor de 13 átomos de longitud de cadena.

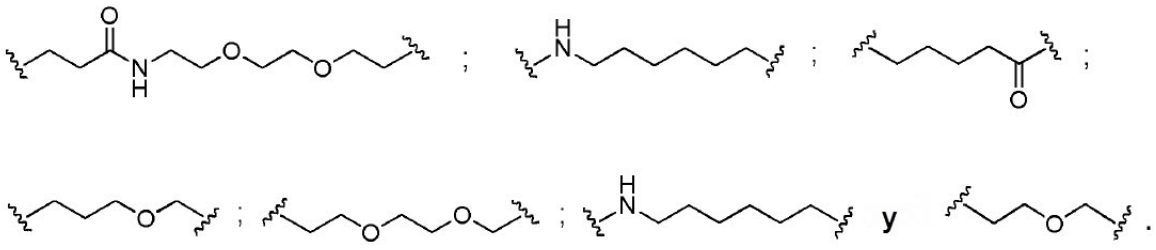
En determinadas modalidades, una ligadura tiene una estructura seleccionada de entre:



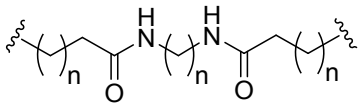
donde cada n es, independientemente, de 1 a 20; y

cada p es de 1 a alrededor de 6.

En determinadas modalidades, una ligadura tiene una estructura seleccionada de entre:

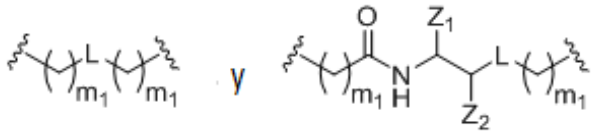


En determinadas modalidades, una ligadura tiene una estructura seleccionada de entre:



donde cada n es, independientemente, de 1 a 20.

En determinadas modalidades, una ligadura tiene una estructura seleccionada de entre:



donde L es ya sea un grupo de unión a fósforo o un grupo de unión neutro;

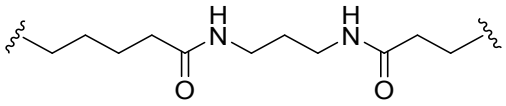
Z_1 es C(=O)O-R_2;

Z_2 es H, alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido;

R_2 es H, alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido; y

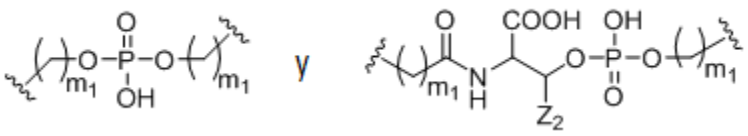
cada m_1 es independientemente entre 0 y 20 donde al menos un m_1 es mayor que 0 para cada ligadura.

En determinadas modalidades, una ligadura tiene una estructura seleccionada de entre:



.

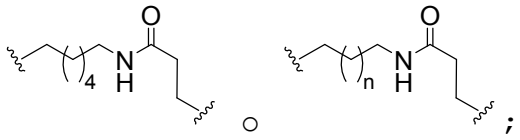
En determinadas modalidades, una ligadura tiene una estructura seleccionada de entre:



donde Z_2 es H o CH_3; y

cada m_1 es independientemente entre 0 y 20 donde al menos un m_1 es mayor que 0 para cada ligadura.

En determinadas modalidades, una ligadura tiene una estructura seleccionada de entre:



donde cada n es, independientemente, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

En determinadas modalidades, una ligadura comprende un grupo de unión a fósforo. En determinadas modalidades, una ligadura no comprende ningún enlace a amida. En determinadas modalidades, una ligadura comprende un grupo de unión a fósforo y no comprende ningún enlace a amida.

3. Algunos ligandos

En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona ligandos donde cada ligando está acoplado de manera covalente a una ligadura. En determinadas modalidades, se selecciona cada ligando que tiene una afinidad para al menos un tipo de receptor en una célula objetivo. En determinadas modalidades, se seleccionan los ligandos que

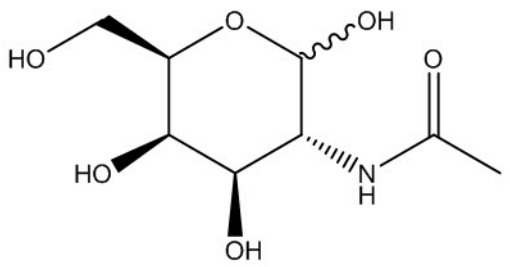
tienen una afinidad para al menos un tipo de receptor en la superficie de una célula hepática de mamífero. En determinadas modalidades, se seleccionan los ligandos que tienen una afinidad por el receptor de asialoglicoproteína hepática (ASGP-R). En determinadas modalidades, cada ligando es un carbohidrato. En determinadas modalidades, cada ligando se selecciona independientemente de galactosa, N-acetil galactosamina, manosa, glucosa, glucosamona y fucosa. En determinadas modalidades, cada ligando es una N-acetilgalactosamina (GalNAc). En determinadas modalidades, el resto de direccionamiento comprende de 2 a 6 ligandos. En determinadas modalidades, el resto de direccionamiento comprende 3 ligandos. En determinadas modalidades, el resto de direccionamiento comprende 3 ligandos de N-acetilgalactosamina.

En determinadas modalidades, el ligando es un carbohidrato, derivado de carbohidratos, carbohidrato modificado, conglomerado multivalente de carbohidratos, polisacárido, polisacárido modificado o derivado de polisacárido. En determinadas modalidades, el ligando es un azúcar de amino o un azúcar de tio. Por ejemplo, los azúcares de amino se seleccionan del cualquier cantidad de compuestos conocidos en la técnica, por ejemplo, glucosamina, ácido siálico, α-D-

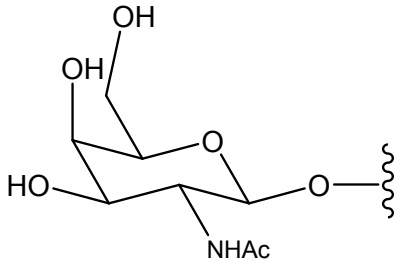
galactosamina, N-Acetilgalactosamina, 2-acetamido-2-desoxi-D-galactopiranosa (GalNAc), 2-Amino-3-*O*-[(*R*)-1-carboxietil]-2-desoxi-β-D-glucopiranosa (ácido β-murámico), 2-Desoxi-2-metilamino-L-glucopiranosa, 4,6-Didesoxi-4-formamido-2,3-di-*O*-metil-D-manopiranosa, 2-Desoxi-2-sulfoamino-D-glucopiranosa y *N*-sulfo-D-glucosamina, y ácido *N*-Glicoloil-α-neuramínico. Por ejemplo, los azúcares de tio pueden seleccionarse del grupo que consiste en 5-Tio-β-D-glucopiranosa, Metil 2,3,4-tri-*O*-acetil-1-tio-6-*O*-tritil-α-D-glucopiranósido, 4-Tio-β-D-galactopiranosa y etil 3,4,6,7-tetra-*O*-acetil-2-desoxi-1,5-ditio-α-D-*gluco*-heptopiranósido.

En determinadas modalidades, "GalNac" o "Gal-NAc" se refiere a 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranosa, comúnmente mencionado comúnmente en la bibliografía como N-acetilgalactosamina. En determinadas modalidades, "N-acetilgalactosamina" se refiere a 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranosa. En determinadas modalidades, "GalNac" o "Gal-NAc" se refiere a 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranosa. En determinadas modalidades, "GalNac" o "Gal-NAc" se refiere a 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranosa, que incluye tanto la forma β: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosa como la forma α: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranosa. En determinadas

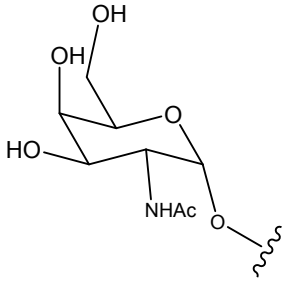
modalidades tanto la forma β: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosa como la forma α: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranosa pueden usarse de manera intercambiable. Por consiguiente, en las estructuras en las cuales se representa una forma, se pretende que estas estructuras incluyan también la otra forma. Por ejemplo, cuando se muestra la estructura para la forma α: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranosa, se pretende que esta estructura incluya también la otra forma. En determinadas modalidades, la forma β 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranosa es la modalidad preferida.



2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranosa

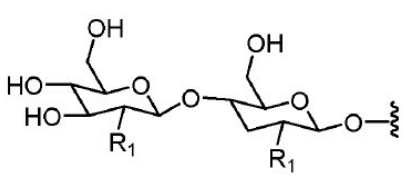


2-(Acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosa

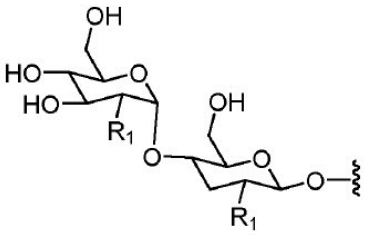


2-(Acetilamino)-2-desoxi-α-D-galactopiranosa

En determinadas modalidades, uno o más ligandos tienen una estructura seleccionada de entre:

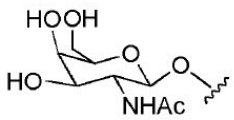


y

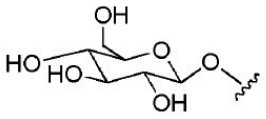


donde cada R_1 se selecciona de OH y NHCOOH.

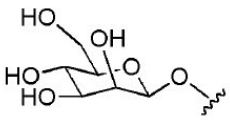
En determinadas modalidades, uno o más ligandos tienen una estructura seleccionada de entre:



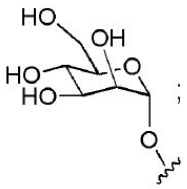
;



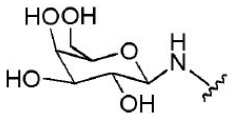
;



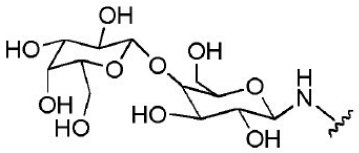
;



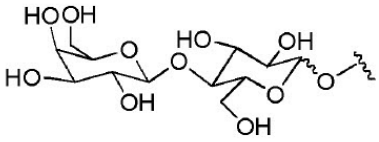
;



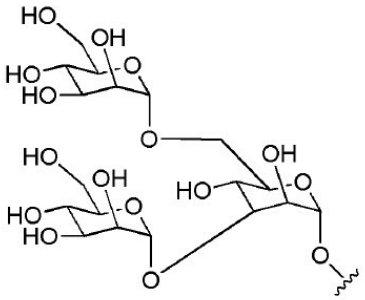
;



;

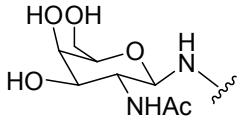


y



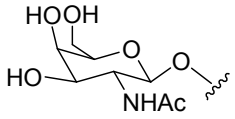
.

En determinadas modalidades, uno o más ligandos tienen una estructura seleccionada de entre:



.

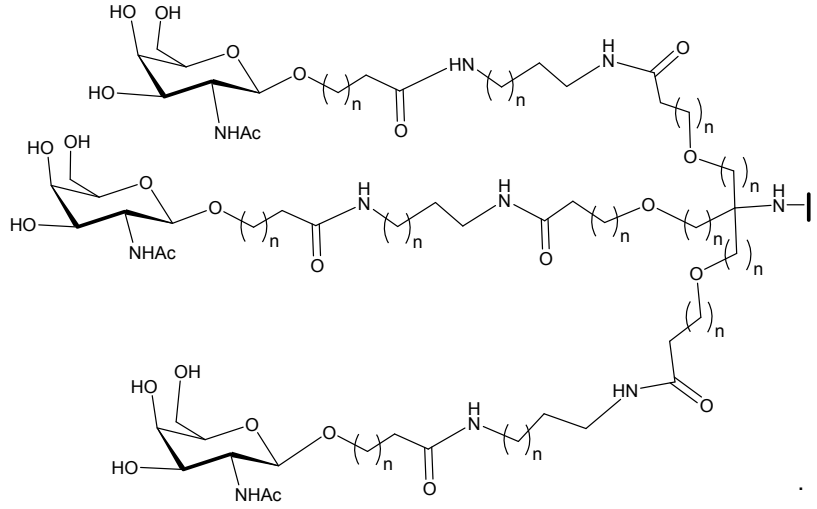
En determinadas modalidades, uno o más ligandos tienen una estructura seleccionada de entre:



.

i. <u>Algunos conjugados</u>

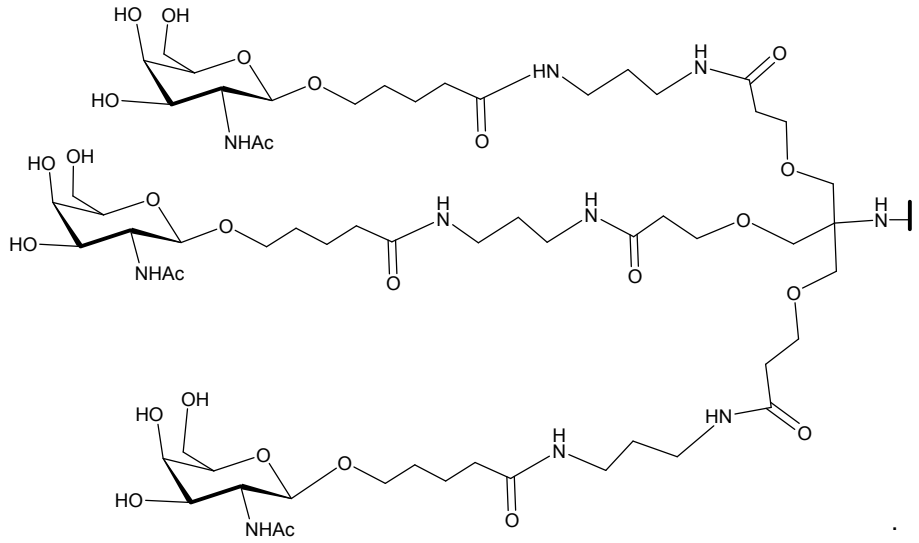
En determinadas modalidades, los grupos conjugados comprenden las características estructurales antemencionadas. En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:



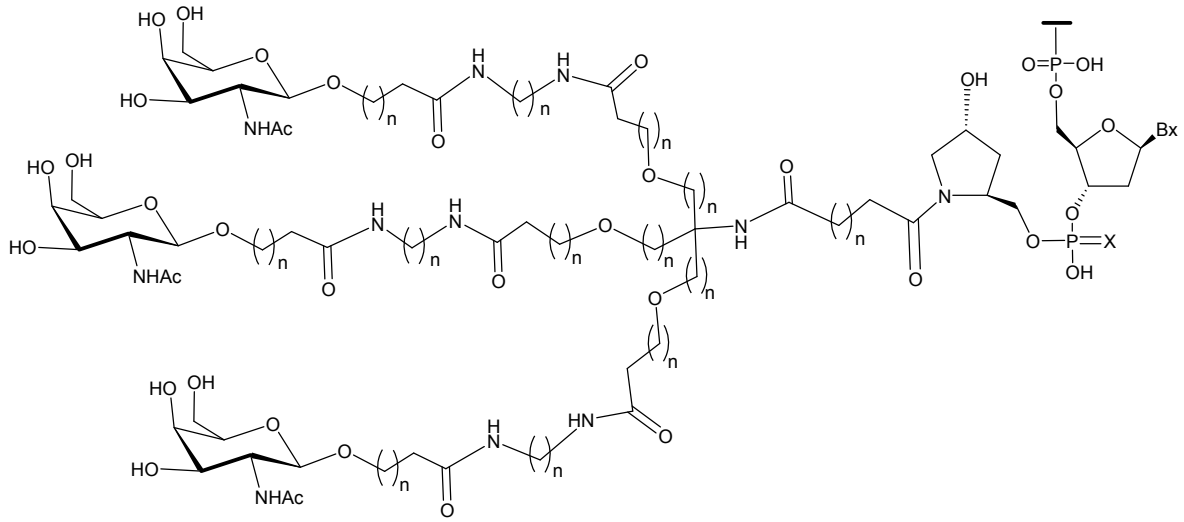
.

donde cada n es, independientemente, de 1 a 20.

En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:



En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:



donde cada n es, independientemente, de 1 a 20;

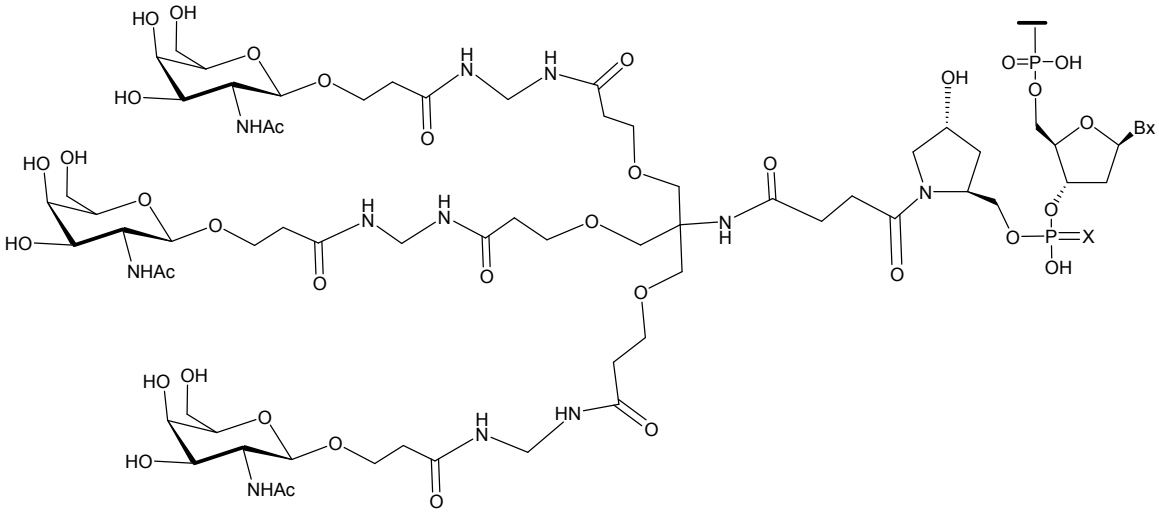
Z es H o un soporte sólido unido;

Q es un compuesto antisentido;

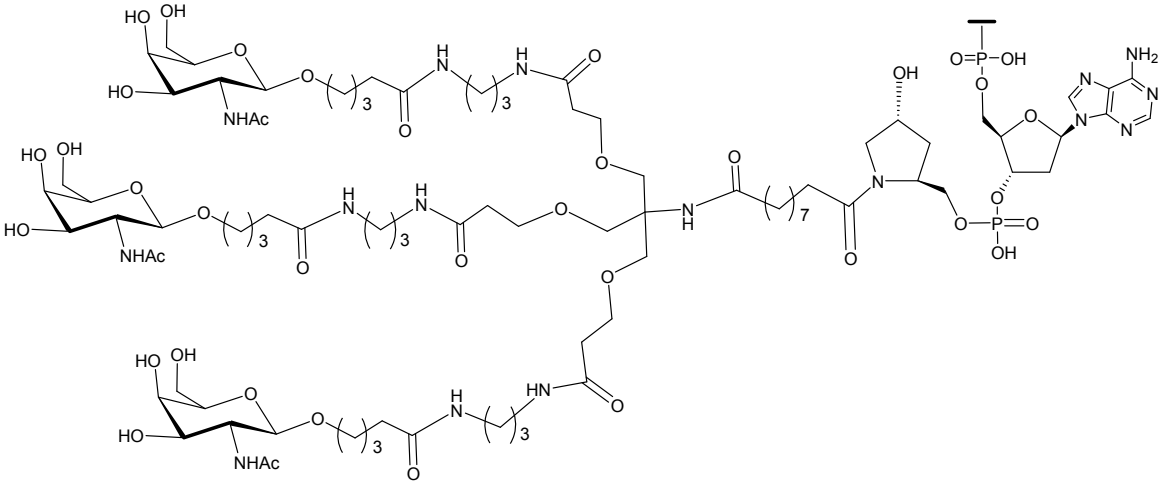
X es O o S; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

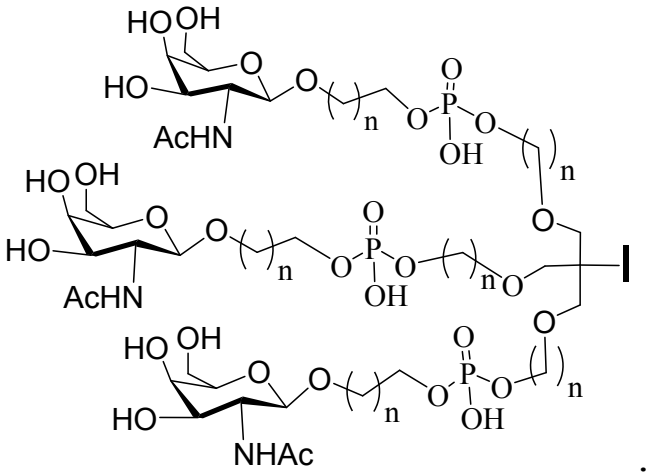
En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:



En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:

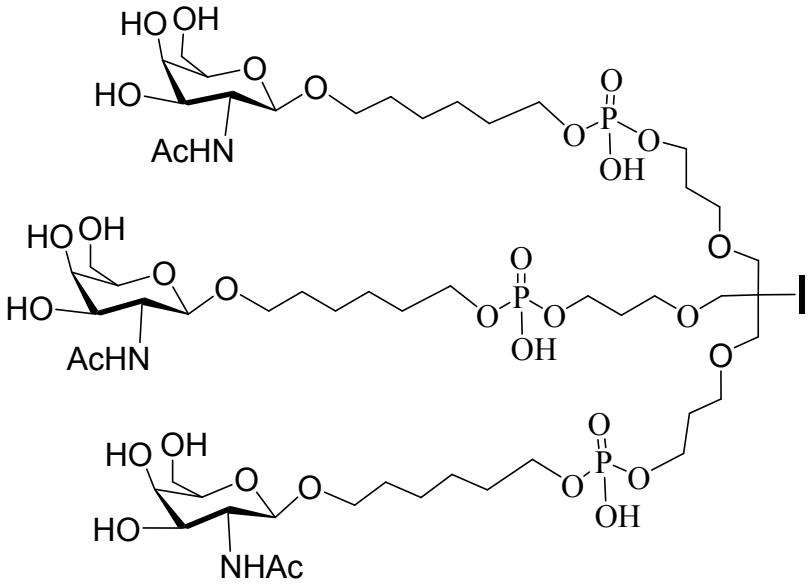


En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:



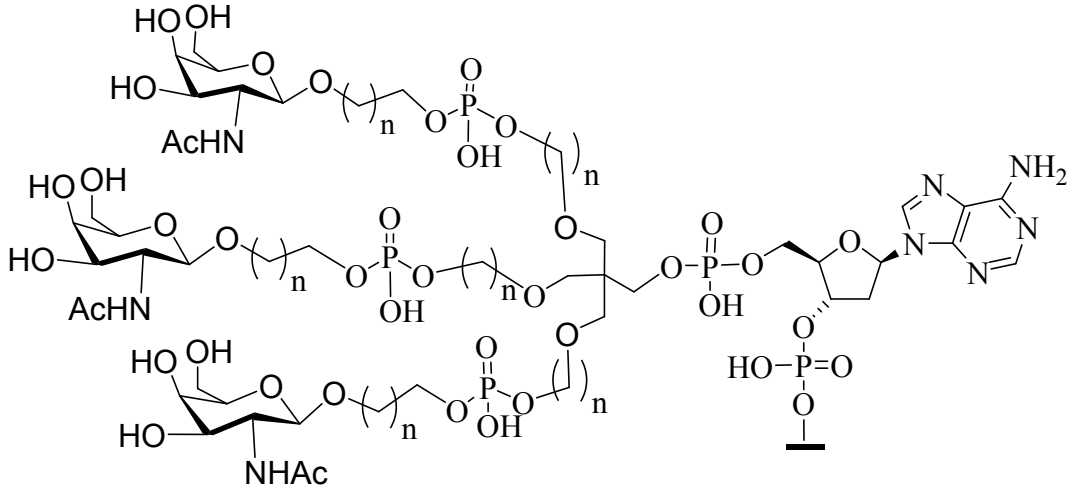
.

En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:



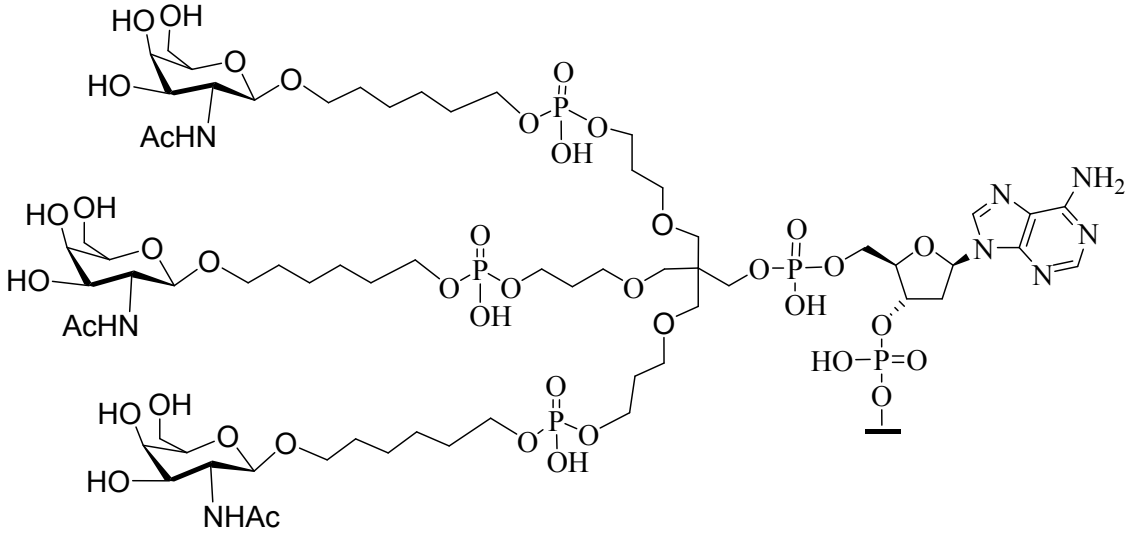
.

En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:



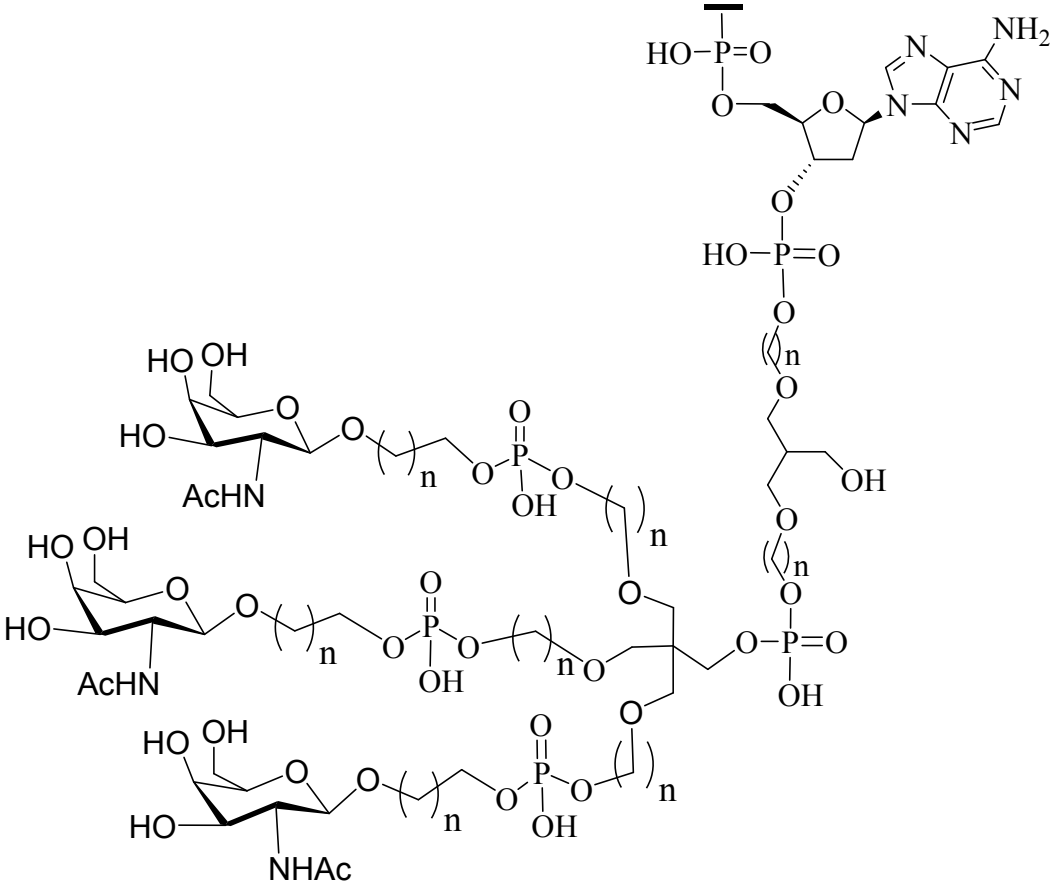
.

En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:

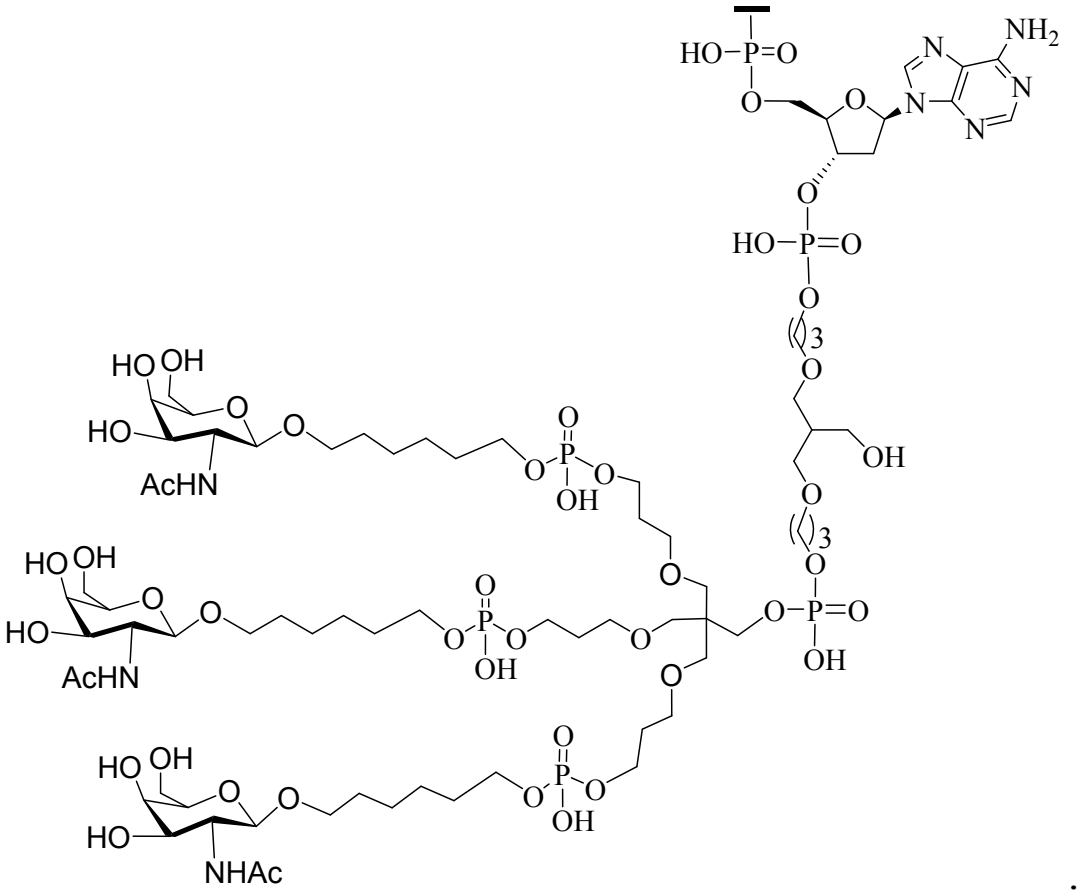


.

En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:

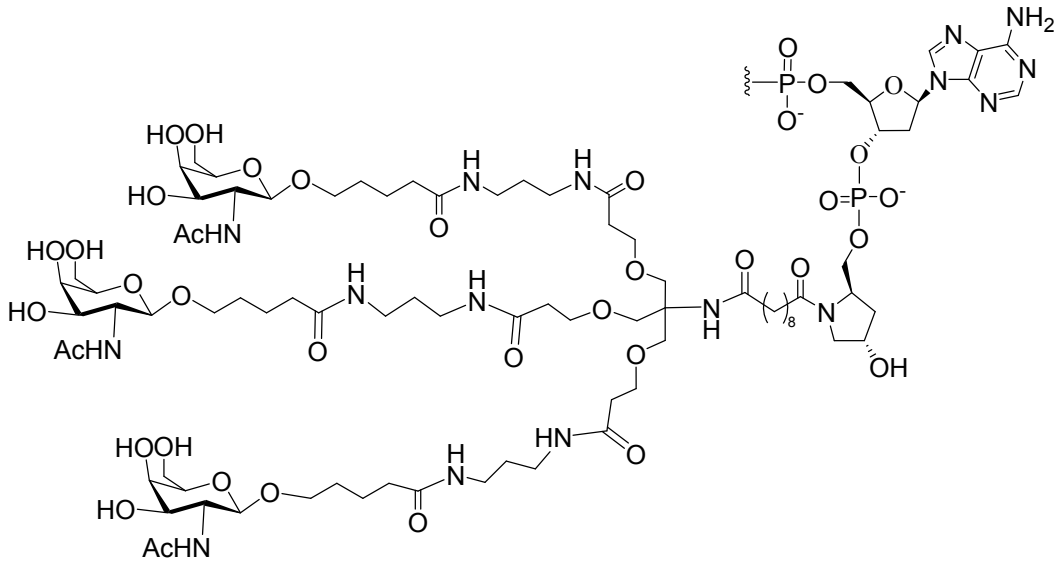


En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:

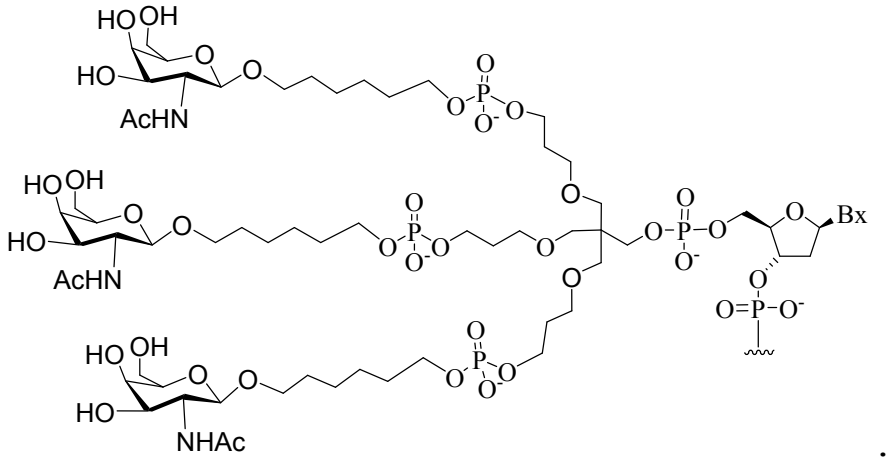


En determinadas modalidades, los conjugados no comprenden una pirrolidina.

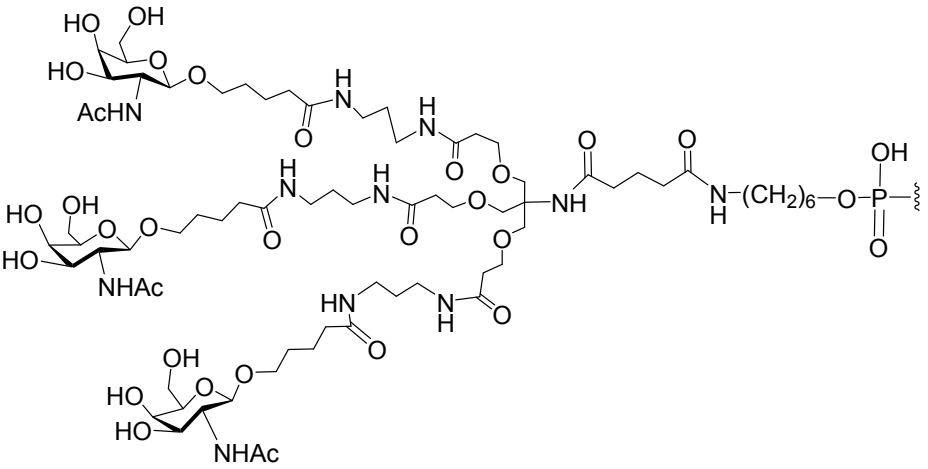
En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:



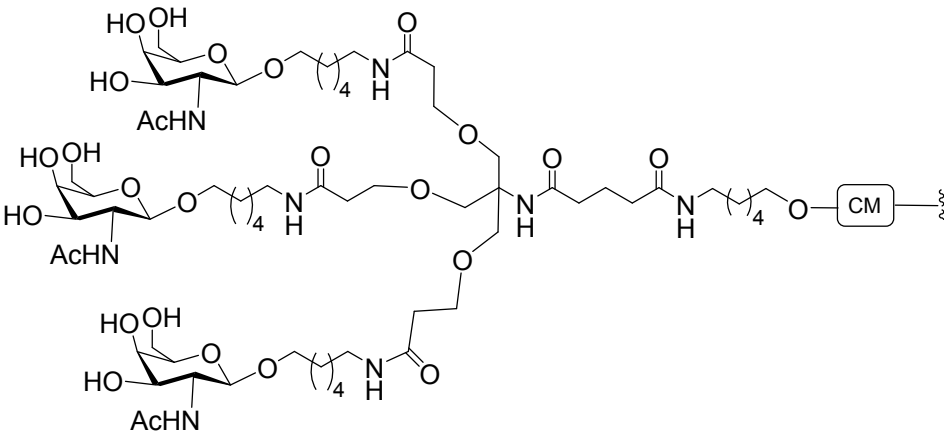
En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:



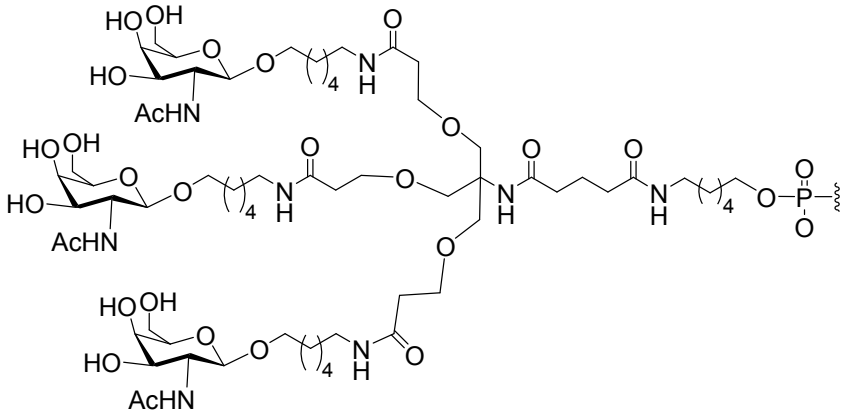
En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:



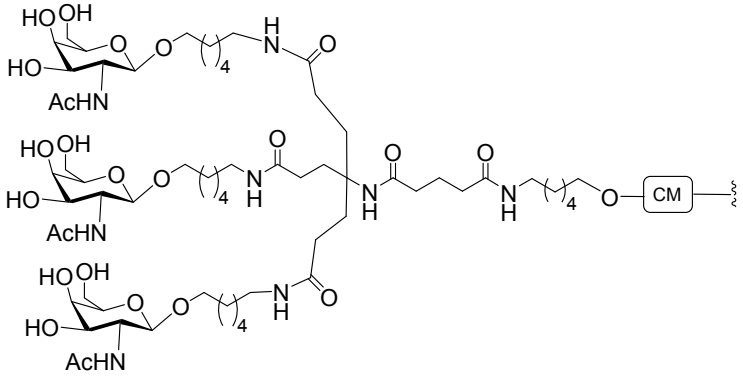
En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:



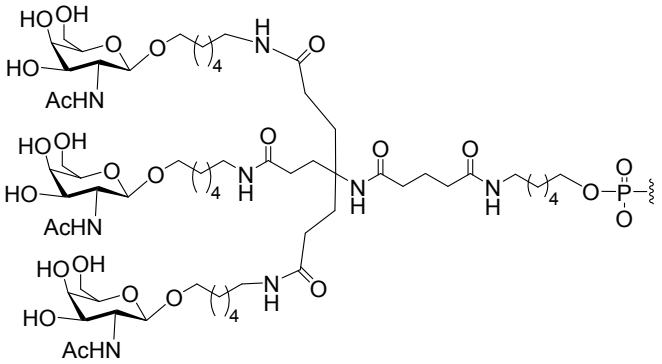
En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:



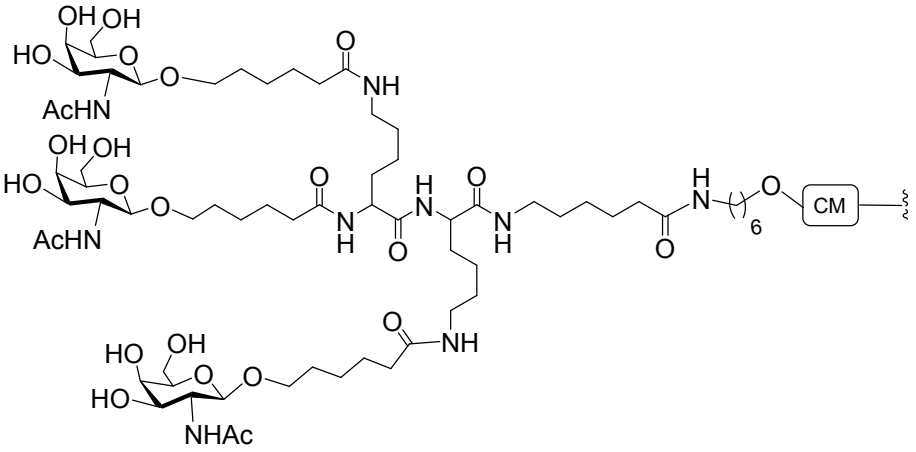
En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:



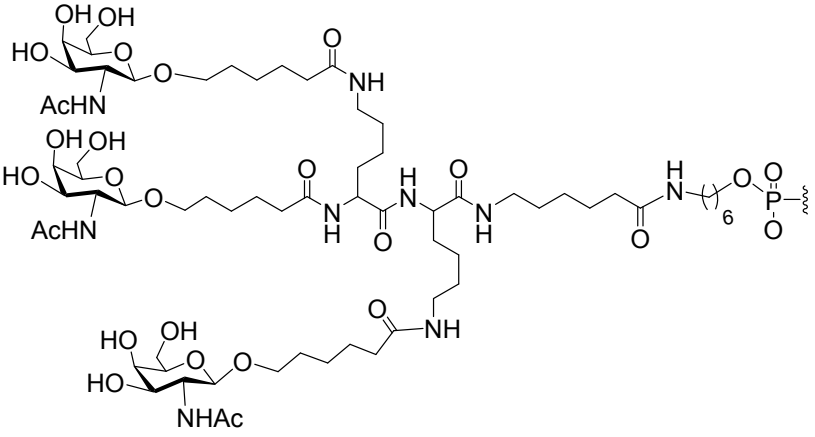
En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:



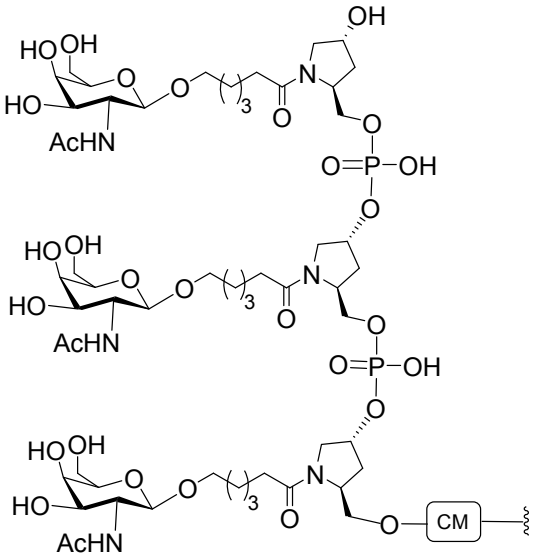
En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:



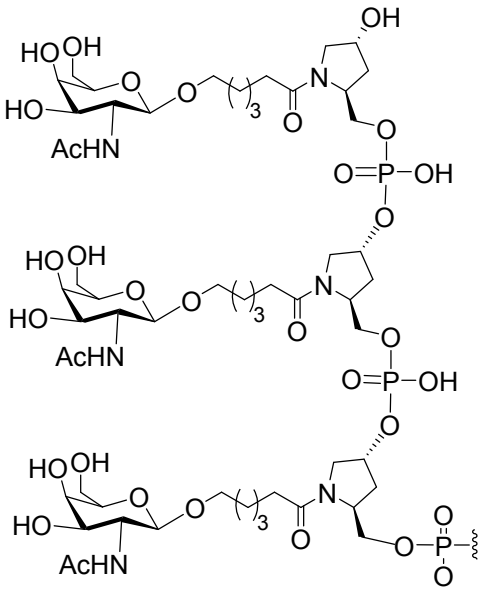
En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:



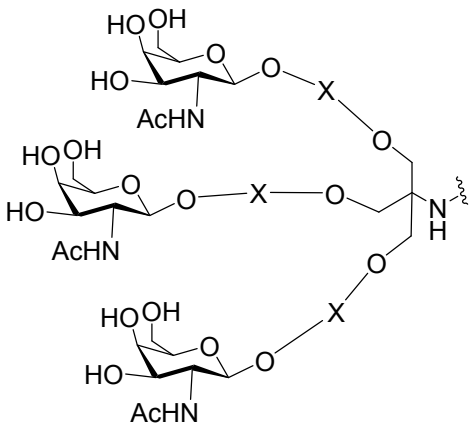
En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:



En determinadas modalidades, los grupos conjugados tienen la siguiente estructura:

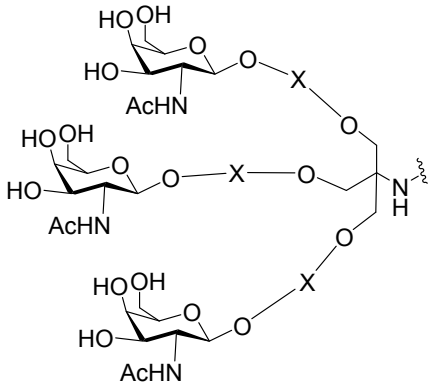


En determinadas modalidades, el resto dirigido a células del grupo conjugado tiene la siguiente estructura:



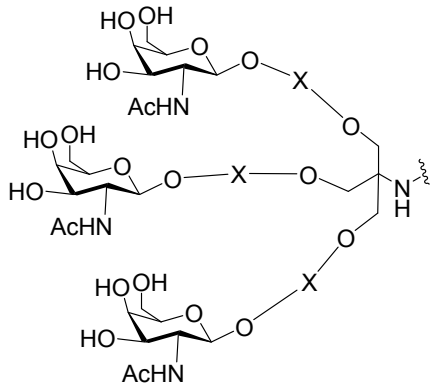
donde X es una ligadura sustituida o no sustituida de seis a once átomos unidos de manera consecutiva.

En determinadas modalidades, el resto dirigido a células del grupo conjugado tiene la siguiente estructura:



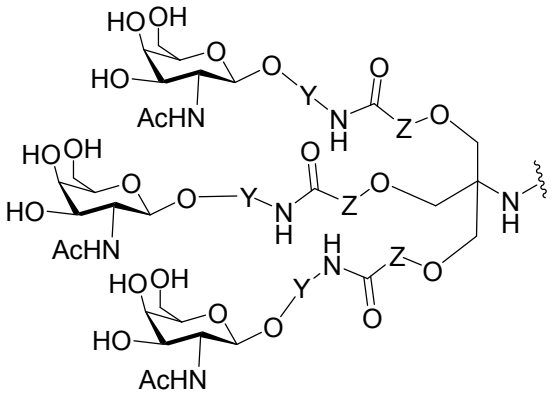
donde X es una ligadura sustituida o no sustituida de diez átomos unidos de manera consecutiva.

En determinadas modalidades, el resto dirigido a células del grupo conjugado tiene la siguiente estructura:



donde X es una ligadura sustituida o no sustituida de cuatro a once átomos unidos de manera consecutiva y donde la ligadura comprende exactamente un enlace de amida.

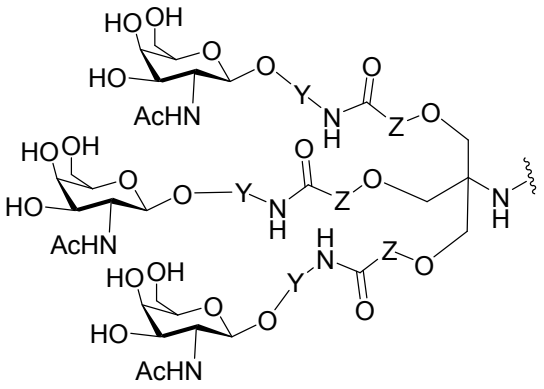
En determinadas modalidades, el resto dirigido a células del grupo conjugado tiene la siguiente estructura:



donde Y y Z se seleccionan independientemente de un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido, o un grupo que comprende un éter, una cetona, una amida, un éster, un carbamato, una amina, una piperidina, un fosfato, un fosfodiéster, un fosforotioato, un triazol, una

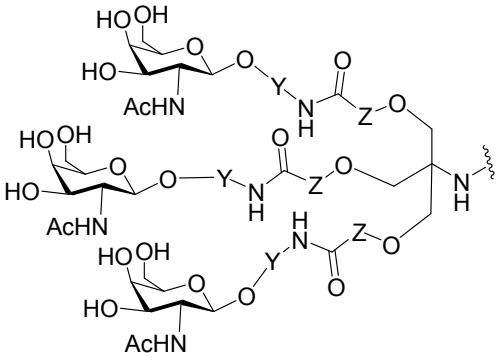
pirrolidina, un disulfuro o un tioéter.

En determinadas de dichas modalidades, el resto dirigido a células del grupo conjugado tiene la siguiente estructura:



donde Y y Z se seleccionan independientemente de un grupo alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido, o un grupo que comprende exactamente un éter o exactamente dos éteres, una amida, una amina, una piperidina, un fosfato, un fosfodiéster o un fosforotioato.

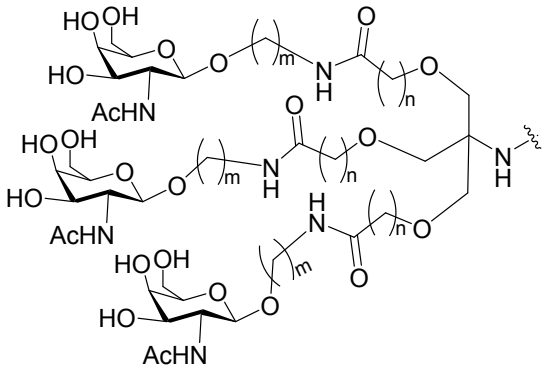
En determinadas de dichas modalidades, el resto dirigido a células del grupo conjugado tiene la siguiente estructura:



donde Y y Z se seleccionan independientemente de un grupo

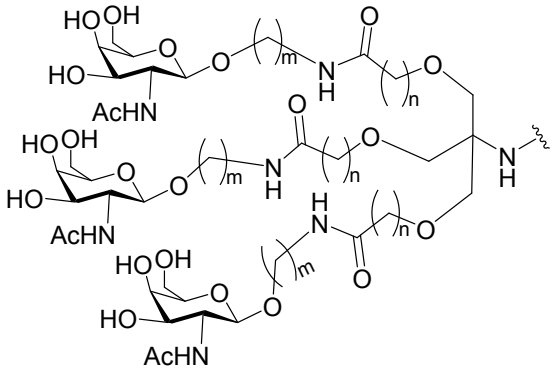
alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido.

En determinadas de dichas modalidades, el resto dirigido a células del grupo conjugado tiene la siguiente estructura:



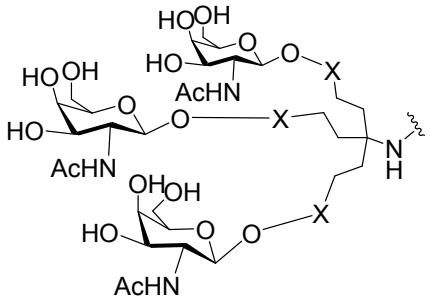
donde m y n se seleccionan independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

En determinadas de dichas modalidades, el resto dirigido a células del grupo conjugado tiene la siguiente estructura:



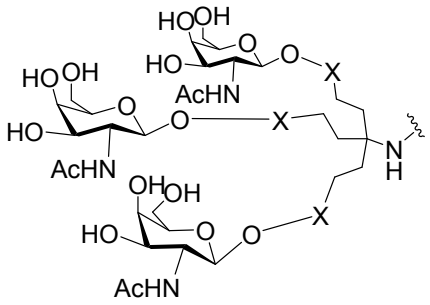
donde m es 4, 5, 6, 7 u 8, y n es 1, 2, 3 o 4.

En determinadas modalidades, el resto dirigido a células del grupo conjugado tiene la siguiente estructura:



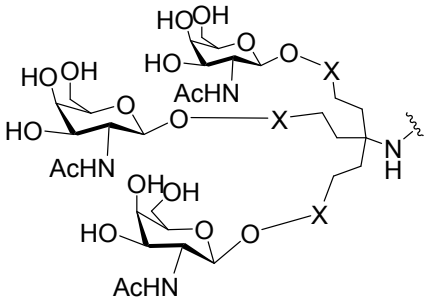
donde X es una ligadura sustituida o no sustituida de cuatro a trece átomos unidos de manera consecutiva y donde la X no comprende un grupo éter.

En determinadas modalidades, el resto dirigido a células del grupo conjugado tiene la siguiente estructura:



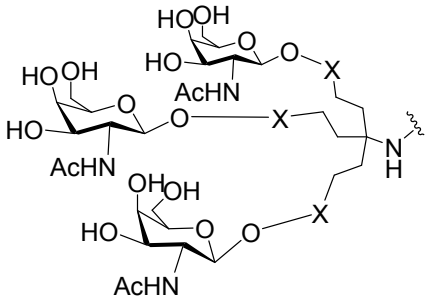
donde X es una ligadura sustituida o no sustituida de ocho átomos unidos de manera consecutiva y donde la X no comprende un grupo éter.

En determinadas modalidades, el resto dirigido a células del grupo conjugado tiene la siguiente estructura:



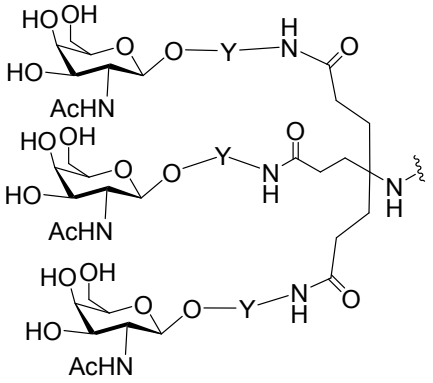
donde X es una ligadura sustituida o no sustituida de cuatro a trece átomos unidos de manera consecutiva, y donde la ligadura comprende exactamente un enlace de amida y donde la X no comprende un grupo éter.

En determinadas modalidades, el resto dirigido a células del grupo conjugado tiene la siguiente estructura:



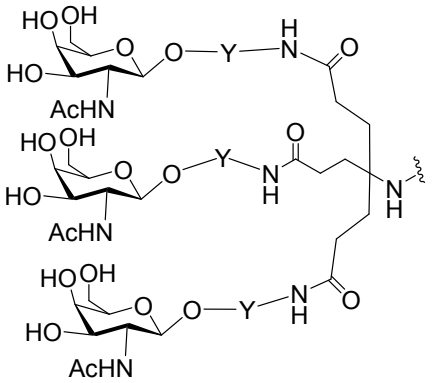
donde X es una ligadura sustituida o no sustituida de cuatro a trece átomos unidos de manera consecutiva, y donde la ligadura consiste en un enlace de amida y un grupo alquilo C_2-C_{11} sustituido o no sustituido.

En determinadas modalidades, el resto dirigido a células del grupo conjugado tiene la siguiente estructura:



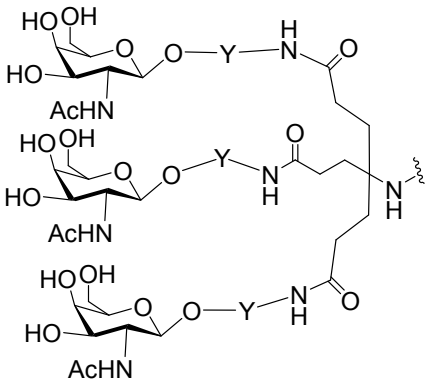
donde Y se selecciona de un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido, o un grupo que comprende un éter, una cetona, una amida, un éster, un carbamato, una amina, una piperidina, un fosfato, un fosfodiéster, un fosforotioato, un triazol, una pirrolidina, un disulfuro o un tioéter.

En determinadas de dichas modalidades, el resto dirigido a células del grupo conjugado tiene la siguiente estructura:



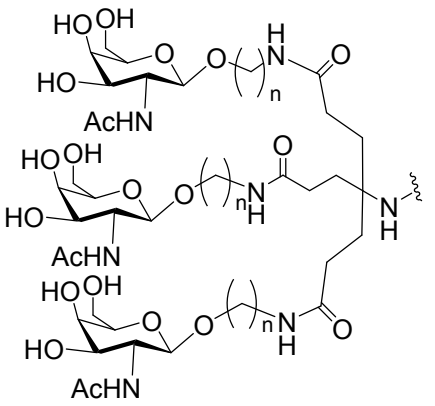
donde Y se selecciona de un grupo alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido, o un grupo que comprende un éter, una amina, una piperidina, un fosfato, un fosfodiéster o un fosforotioato.

En determinadas de dichas modalidades, el resto dirigido a células del grupo conjugado tiene la siguiente estructura:



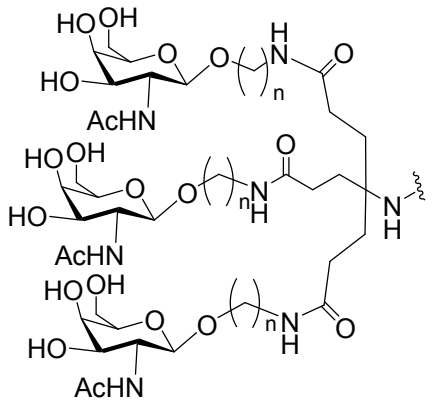
donde Y se selecciona de un grupo alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido.

En determinadas de dichas modalidades, el resto dirigido a células del grupo conjugado tiene la siguiente estructura:



donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12.

En determinadas de dichas modalidades, el resto dirigido a células del grupo conjugado tiene la siguiente estructura:

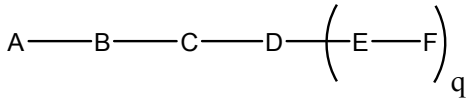


donde n es 4, 5, 6, 7 u 8.

En determinadas modalidades, los conjugados no comprenden una pirrolidina.

a. <u>Algunos compuestos antisentido conjugados</u>

En determinadas modalidades, los conjugados están unidos a un nucleósido del oligonucleótido antisentido en la posición 2', 3' de 5' del nucleósido. En determinadas modalidades, un compuesto conjugado antisentido tiene la siguiente estructura:



donde

A es el oligonucleótido antisentido;

B es el resto escindible

C es el enlazador conjugado

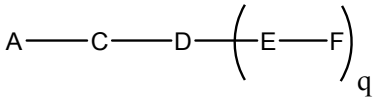
D es el grupo ramificado

cada E es una ligadura;

cada F es un ligando; y

q es un entero entre 1 y 5.

En determinadas modalidades, un compuesto conjugado antisentido tiene la siguiente estructura:



donde

A es el oligonucleótido antisentido;

C es el enlazador conjugado

D es el grupo ramificado

cada E es una ligadura;

cada F es un ligando; y

q es un entero entre 1 y 5.

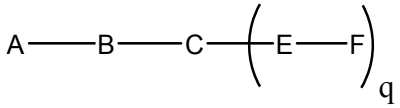
En determinadas de dichas modalidades, el enlazador conjugado comprende al menos un enlace escindible.

En determinadas de dichas modalidades, el grupo ramificado comprende al menos un enlace escindible.

En determinadas modalidades, cada ligadura comprende al menos un enlace escindible.

En determinadas modalidades, los conjugados están unidos a un nucleósido del oligonucleótido antisentido en la posición 2', 3' de 5' del nucleósido.

En determinadas modalidades, un compuesto conjugado antisentido tiene la siguiente estructura:



donde

A es el oligonucleótido antisentido;

B es el resto escindible

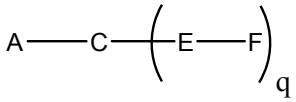
C es el enlazador conjugado

cada E es una ligadura;

cada F es un ligando; y

q es un entero entre 1 y 5.

En determinadas modalidades, los conjugados están unidos a un nucleósido del oligonucleótido antisentido en la posición 2', 3' de 5' del nucleósido. En determinadas modalidades, un compuesto conjugado antisentido tiene la siguiente estructura:



donde

A es el oligonucleótido antisentido;

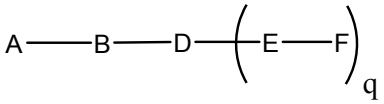
C es el enlazador conjugado

cada E es una ligadura;

cada F es un ligando; y

q es un entero entre 1 y 5.

En determinadas modalidades, un compuesto conjugado antisentido tiene la siguiente estructura:



donde

A es el oligonucleótido antisentido;

B es el resto escindible

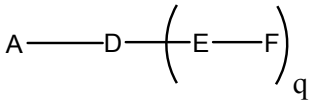
D es el grupo ramificado

cada E es una ligadura;

cada F es un ligando; y

q es un entero entre 1 y 5.

En determinadas modalidades, un compuesto conjugado antisentido tiene la siguiente estructura:



donde

A es el oligonucleótido antisentido;

D es el grupo ramificado

cada E es una ligadura;

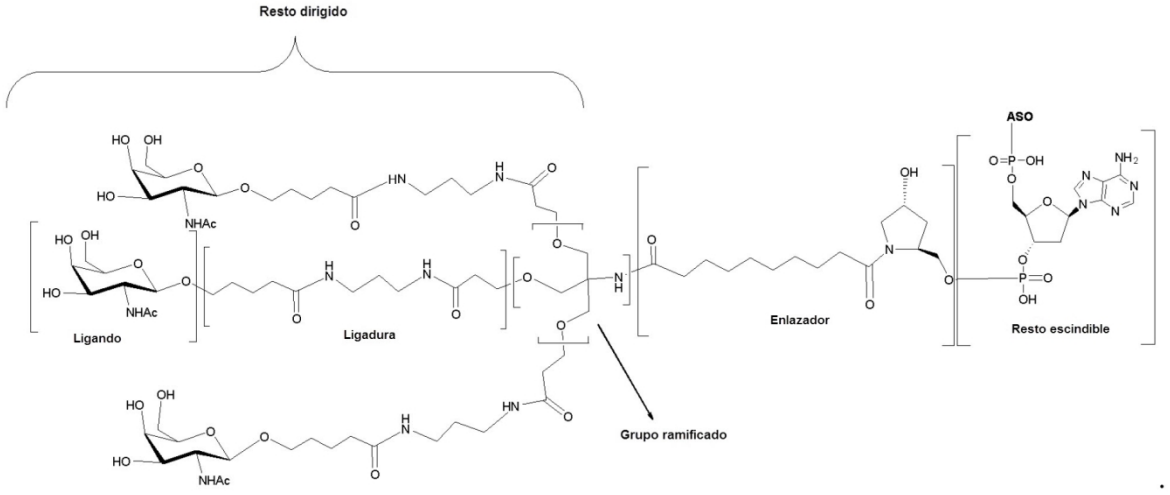
cada F es un ligando; y

q es un entero entre 1 y 5.

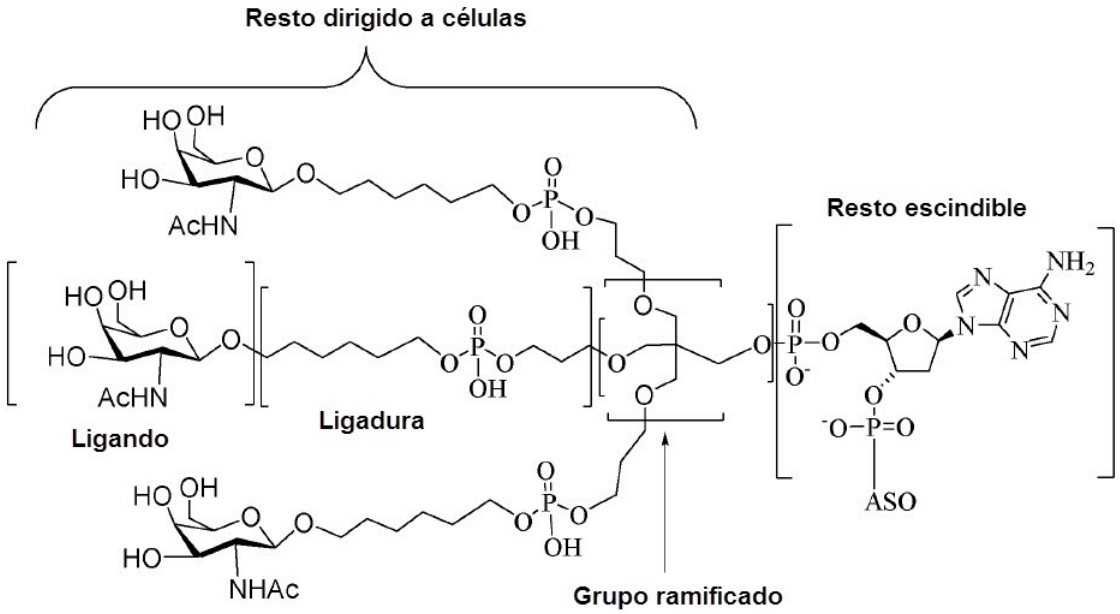
En determinadas de dichas modalidades, el enlazador conjugado comprende al menos un enlace escindible.

En determinadas modalidades, cada ligadura comprende al menos un enlace escindible.

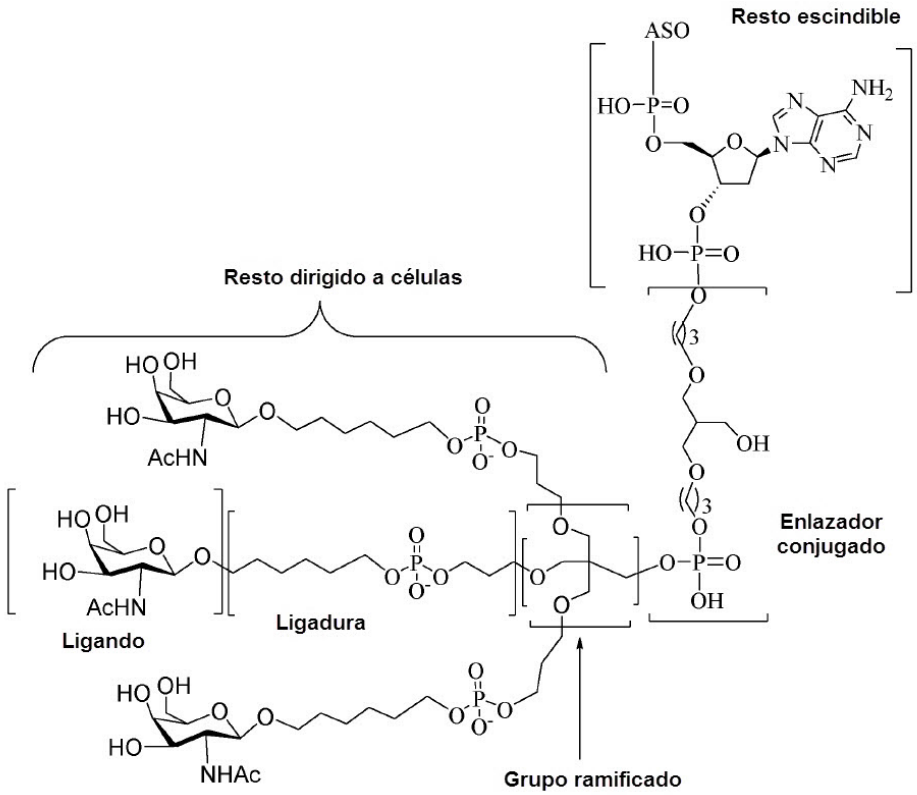
En determinadas modalidades, un compuesto conjugado antisentido tiene una estructura seleccionada de entre las siguientes:



En determinadas modalidades, un compuesto conjugado antisentido tiene una estructura seleccionada de entre las siguientes:



En determinadas modalidades, un compuesto conjugado antisentido tiene una estructura seleccionada de entre las siguientes:



Las patentes estadounidenses, publicaciones de patente estadounidense y publicaciones de solicitud internacional de patente representativas que describen la preparación de determinados de los conjugados, compuestos conjugados antisentido, ligaduras, enlazadores, grupos ramificados, ligandos, restos escindibles y otras modificaciones mencionadas anteriormente incluyen, de modo no taxativo, US 5,994,517, US 6,300,319, US 6,660,720, US 6,906,182, US 7,262,177, US 7,491,805, US 8,106,022, US 7,723,509, US

2006/0148740, US 2011/0123520, WO 2013/033230 y WO 2012/037254, las cuales se incorporan a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

Las publicaciones representativas que describen la preparación de determinados conjugados, compuestos conjugados antisentido, ligaduras, enlazadores, grupos ramificados, ligandos restos escindibles así como otras modificaciones antemencionadas incluyen, de modo no taxativo, BIESSEN et ál., "The Cholesterol Derivative of a Triantennary Galactoside with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor: a Potent Cholesterol Lowering Agent" J. Med. Chem. (1995) 38:1846-1852, BIESSEN et ál., "Synthesis of Cluster Galactosides with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (1995) 38:1538-1546, LEE et ál., "New and more efficient multivalent glyco-ligands for asialoglycoprotein receptor of mammalian hepatocytes" Bioorganic & Medicinal Chemistry (2011) 19:2494-2500, RENSEN et ál., "Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo" J. Biol. Chem. (2001) 276(40):37577-37584, RENSEN et ál., "Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the

Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (2004) 47:5798-5808, SLIEDREGT et ál., "Design and Synthesis of Novel Amphiphilic Dendritic Galactosides for Selective Targeting of Liposomes to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (1999) 42:609-618 y Valentijn et ál., "Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides with high affinity for the Asialoglycoprotein Receptor" *Tetrahedron*, 1997, *53(2)*, 759-770, cada una de las cuales se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

En determinadas modalidades, los compuestos conjugados antisentido comprenden un oligonucleótido basado en RNasa H (tal como un gapmer) o un oligonucleótido modulador del corte y empalme (tal como un oligonucleótido completamente modificado) y cualquier grupo conjugado que comprenda al menos uno, dos o tres grupos GalNAc. En determinadas modalidades, un compuesto conjugado antisentido comprende cualquier grupo conjugado que se encuentre en las siguientes referencias: Lee, *Carbohydr Res*, 1978, 67, 509-514; Connolly et ál., *J Biol Chem*, 1982, 257, 939-945; Pavia et ál., *Int J Pep Protein Res*, 1983, 22, 539-548; Lee et ál., *Biochem*, 1984, 23, 4255-4261; Lee et ál., *Glycoconjugate J*, 1987, 4, 317-328; Toyokuni et ál., *Tetrahedron Lett*, 1990, 31, 2673-

2676; Biessen et ál., *J Med Chem*, 1995, 38, 1538-1546; Valentijn et ál., *Tetrahedron*, 1997, 53, 759-770; Kim et ál., *Tetrahedron Lett*, 1997, 38, 3487-3490; Lee et ál., *Bioconjug Chem*, 1997, 8, 762-765; Kato et ál., *Glycobiol*, 2001, 11, 821-829; Rensen et ál., *J Biol Chem*, 2001, 276, 37577-37584; Lee et ál., *Methods Enzymol*, 2003, 362, 38-43; Westerlind et ál., *Glycoconj J*, 2004, 21, 227-241; Lee et ál., *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(19), 5132-5135; Maierhofer et ál., *Bioorg Med Chem*, 2007, 15, 7661-7676; Khorev et ál., *Bioorg Med Chem*, 2008, 16, 5216-5231; Lee et ál., *Bioorg Med Chem*, 2011, 19, 2494-2500; Kornilova et ál., Analyt Biochem, 2012, 425, 43-46; Pujol et ál., *Angew Chemie Int Ed Engl*, 2012, 51, 7445-7448; Biessen et ál., *J Med Chem*, 1995, 38, 1846-1852; Sliedregt et ál., *J Med Chem*, 1999, 42, 609-618; Rensen et ál., *J Med Chem*, 2004, 47, 5798-5808; Rensen et ál., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26, 169-175; van Rossenberg et ál., *Gene Ther*, 2004, 11, 457-464; Sato et ál., *J Am Chem Soc*, 2004, 126, 14013-14022; Lee et ál., *J Org Chem*, 2012, 77, 7564-7571; Biessen et ál., *FASEB J*, 2000, 14, 1784-1792; Rajur et ál., *Bioconjug Chem*, 1997, 8, 935-940; Duff et ál., *Methods Enzymol*, 2000, 313, 297-321; Maier et ál., *Bioconjug Chem*, 2003, 14, 18-29; Jayaprakash et ál., *Org Lett*, 2010, 12, 5410-5413; Manoharan, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2002, 12, 103-128; Merwin et ál., *Bioconjug Chem*,

1994, 5, 612-620; Tomiya et ál., Bioorg Med Chem, 2013, 21, 5275-5281; solicitudes internacionales WO1998/013381; WO2011/038356; WO1997/046098; WO2008/098788; WO2004/101619; WO2012/037254; WO2011/120053; WO2011/100131; WO2011/163121; WO2012/177947; WO2013/033230; WO2013/075035; WO2012/083185; WO2012/083046; WO2009/082607; WO2009/134487; WO2010/144740; WO2010/148013; WO1997/020563; WO2010/088537; WO2002/043771; WO2010/129709; WO2012/068187; WO2009/126933; WO2004/024757; WO2010/054406; WO2012/089352; WO2012/089602; WO2013/166121; WO2013/165816; patentes estadounidenses 4,751,219; 8,552,163; 6,908,903; 7,262,177; 5,994,517; 6,300,319; 8,106,022; 7,491,805; 7,491,805; 7,582,744; 8,137,695; 6,383,812; 6,525,031; 6,660,720; 7,723,509; 8,541,548; 8,344,125; 8,313,772; 8,349,308; 8,450,467; 8,501,930; 8,158,601; 7,262,177; 6,906,182; 6,620,916; 8,435,491; 8,404,862; 7,851,615; publicaciones de solicitud de patente estadounidense publicadas US2011/0097264; US2011/0097265; US2013/0004427; US2005/0164235; US2006/0148740; US2008/0281044; US2010/0240730; US2003/0119724; US2006/0183886; US2008/0206869; US2011/0269814; US2009/0286973; US2011/0207799; US2012/0136042; US2012/0165393; US2008/0281041; US2009/0203135; US2012/0035115; US2012/0095075; US2012/0101148; US2012/0128760; US2012/0157509; US2012/0230938;

US2013/0109817; US2013/0121954; US2013/0178512; US2013/0236968; US2011/0123520; US2003/0077829; US2008/0108801; y US2009/0203132, cada una de las cuales se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

Análisis in vitro de oligonucleótidos antisentido

En la presente se describen métodos para el tratamiento de células con oligonucleótidos antisentido que pueden modificarse de manera adecuada para el tratamiento con otros compuestos antisentido.

Las células pueden ser tratadas con oligonucleótidos antisentido cuando las células alcanzan aproximadamente 60-80 % de confluencia en el cultivo.

Un reactivo comúnmente utilizado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye el reactivo de transfección de lípidos catiónicos LIPOFECTIN (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los oligonucleótidos antisentido pueden mezclarse con LIPOFECTIN en OPTI-MEM 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para lograr la concentración final deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración de

LIPOFECTIN, que puede variar de 2 a 12 ug/mL por 100 nM de oligonucleótido antisentido.

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

Otra técnica que se utiliza para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye electroporación.

Aun otra técnica utilizada para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye la absorción libre de los oligonucleótidos por parte de las células.

Las células se tratan con oligonucleótidos antisentido con métodos de rutina. Las células pueden cosecharse luego de 16-24 horas del tratamiento con oligonucleótidos antisentido, momento en el cual se miden los niveles de ARN o proteínas de los ácidos nucleicos diana mediante métodos conocidos en la

técnica y descritos en la presente. En general, cuando los tratamientos se llevan a cabo en múltiples replicados, los datos se presentan como el promedio de los tratamientos replicados.

La concentración de oligonucleótido antisentido que se utiliza varía de línea celular a línea celular. Los métodos para determinar la concentración de oligonucleótido antisentido óptima para una línea celular en particular se conocen en la técnica. Los oligonucleótidos antisentido se utilizan comúnmente en concentraciones que varían de 1 nM a 300 nM cuando se transfectan con LIPOFECTAMINE. Los oligonucleótidos antisentido se utilizan en concentraciones más elevadas que varían de 625 a 20.000 nM cuando se transfectan utilizando electroporación.

Aislamiento de ARN

El análisis de ARN se puede llevar a cabo en ARN celular total o ARNm poli(A)+. Los métodos para llevar a cabo el aislamiento de ARN son conocidos en la técnica. El ARN se prepara mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando el Reactivo TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con los protocolos recomendados por el

fabricante.

Algunas indicaciones

Determinadas modalidades proporcionadas en la presente se refieren a métodos para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento en un sujeto mediante la administración de un inhibidor específico del CFB, tal como un compuesto antisentido dirigido a CFB.

Los ejemplos de enfermedades renales asociadas a la desregulación de la vía alternativa del complemento que se pueden tratar, prevenir y/o mejorar con los métodos proporcionados en la presente incluyen glomerulopatía C3, síndrome hemolítico atípico (aHUS), enfermedad de depósitos densos (EDD; también conocida como MPGN Tipo II o C3Neph) y nefropatía CFHR5.

Las enfermedades renales adicionales asociadas a la desregulación de la vía alternativa del complemento que se pueden tratar, prevenir y/o mejorar con los métodos proporcionados en la presente incluyen nefropatía IgA; glomerulonefritis mesangiocapilar (membranoproliferativa)

(MPGN); trastornos autoinmuntarios que incluyen nefritis lúpica y lupus eritematoso sistémico (LSE); glomerulonefritis inducidos por infección (también conocida como glomerulonefritis postinfecciosa); y lesión por isquemia reperfusión renal, por ejemplo, lesión por isquemia reperfusión de trasplante renal.

Los ejemplos de trastornos no renales asociados a la desregulación de la vía alternativa del complemento que se pueden tratar y/o prevenir con los métodos proporcionados en la presente incluyen enfermedades oculares tal como degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), que incluye DMAE húmeda y DMAE seca, tal como atrofia geográfica; neuromielitis óptica; enfermedad de la córnea, tal como inflamación de la córnea; uveítis autoinmuntaria; y retinopatía diabética. Se ha indicado que el sistema del complemento participa en enfermedades oculares. Jha P, et ál., *Mol Immunol* (2007) 44(16): 3901-3908. Los ejemplos de trastornos no renales asociados a la desregulación de la vía alternativa del complemento que se pueden tratar y/o prevenir con los métodos proporcionados en la presente incluyen vasculitis asociada a ANCA, síndrome antifosfolípidos (también conocido como síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (APS, por sus siglas

en inglés)), asma, artritis reumatoide, Miastenia Gravis y esclerosis múltiple

Determinadas modalidades proporcionadas en la presente se refieren a métodos para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad renal asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento en un sujeto mediante la administración de un inhibidor específico del CFB, tal como un compuesto antisentido dirigido a CFB. En determinados aspectos, la enfermedad renal es nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad de depósitos densos (EDD), glomerulonefritis C3 (C3GN), nefropatía CFHR5, o síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS) o cualquier combinación de estos.

Determinadas modalidades proporcionadas en la presente se refieren a métodos para tratar, prevenir o mejorar la degeneración macular, tal como degeneración macular asociada a la edad (DMAE) en un sujeto mediante la administración de un inhibidor específico del CFB, tal como un compuesto antisentido dirigido a CFB. En determinados aspectos, la DMAE es DMAE húmeda o DMAE seca. En determinados aspectos, la DMAE seca puede ser atrofia geográfica. Los estudios han demostrado la asociación de la desregulación de la vía

alternativa del complemento y la DMAE. Los componentes actuales son constituyentes comunes de drusas del nervio óptico, el material extracelular que se acumula en la mácula de los pacientes con DMAE. Además, se ha informado que las variantes de CFH y CFB representan casi el 75 % de los casos de DMAE en Europa del Norte y América del Norte. También se ha descubierto que un polimorfismo de CFB específico confiere protección contra la DMAE. Patel, N. et ál., *Eye* (2008) 22(6):768-76. De manera adicional, los ratones con deficiencia homocigota de CFB tienen una menor actividad de la vía del complemento, presentan lesiones oculares menores y neovascularización coroidea (CNV, por sus siglas en inglés) después de la fotocoagulación con láser. Rohrer, B. et ál., *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2009) 50(7):3056-64. Además, el tratamiento con ARNip de CFB protege a los ratones de la CNV inducida por láser. Bora, NS et ál., *J Immunol.* (2006) 177(3):1872-8. Los estudios han demostrado que el riñón y el ojo comparten vías de desarrollo y características estructurales que incluyen la vascularidad y composición del protómero IV de colágeno de membrana basal. Savige et ál., *J Am Soc Nephrol.* (2011), 22(8):1403-15). Existen pruebas de que la vía del complemento participa en las enfermedades renales y oculares. Por ejemplo, la deficiencia de la proteína reguladora del complemento heredada provoca

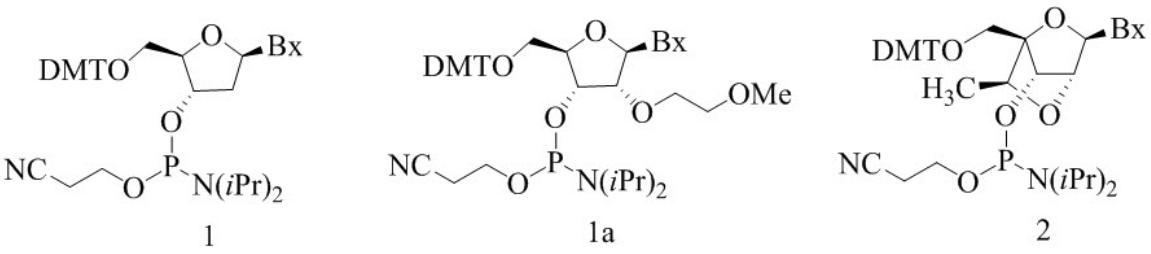
predisposición al síndrome urémico hemolítico atípico y DMAE. Richards A et ál., *Adv Immunol.* (2007) 96:141-77. De manera adicional, la enfermedad renal crónica se ha asociado a la DMAE. Nitsch, D. et ál., *Ophthalmic Epidemiol.* (2009) 16(3):181-6; Choi, J. et ál, *Ophthalmic Epidemiol.* (2011) 18(6):259-63. La enfermedad de depósitos densos (EDD), una enfermedad del riñón asociasa a la vía alternativa del complemento desregulada, se caracteriza por síndrome nefrítico agudo y drusas del nervio óptico. Cruz y Smith, *GeneReviews* (2007) Jul 20. Además, los ratones que presentan eliminación genética de un componente de la vía alternativa del complemento tienen fenotipos de enfermedades oculares y renales coexistentes. Se ha informado que los ratones ratones con deficiencia homocigota de CFH desarrollan la EDD y presentan anomalías retinianas y disfunción visual. Pickering et ál., *Nat Genet.* (2002) 31(4):424-8). Los modelos de ratón de enfermedades renales asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento también se aceptan como modelos de DMAE. Pennesi ME et ál., *Mol Aspects Med* (2012) 33:487-509. Los ratones con deficiencia de CFH, por ejemplo, son un modelo aceptado para enfermedades renales, tal como EDD y DMAE. Además, se ha informado que la DMAE está asociada a la fuente sistémica de factores del complemento, que se acumulan localmente en el ojo para provocar la activación de la vía

alternativa del complemento. Loyet et ál., *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2012) 53(10):6628-37.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran determinadas modalidades de la presente descripción y no son taxativos. Adicionalmente, donde se proporcionan modalidades específicas, se ha contemplado la aplicación genérica de esas modalidades específicas. Por ejemplo, la descripción de un oligonucleótido con un motivo particular proporciona un soporte razonable para otros oligonucleótidos con el mismo motivo o uno similar. Y, por ejemplo, donde aparece una modificación particular de afinidad alta en una posición particular, se consideran adecuadas otras modificaciones de afinidad alta en la misma posición, a menos que se indique lo contrario.

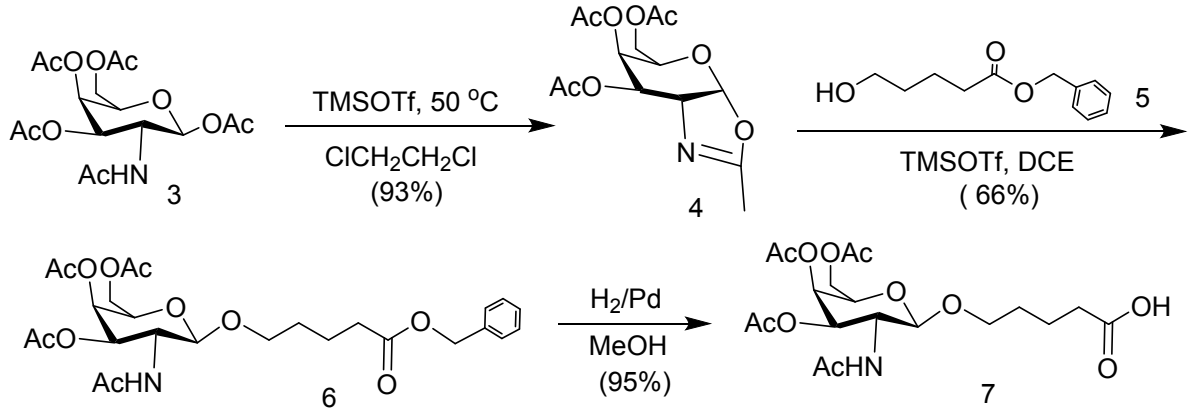
Ejemplo 1: Método general para la preparación de fosforamiditas, Compuestos 1, 1a y 2



Bx es una base heterocíclica;

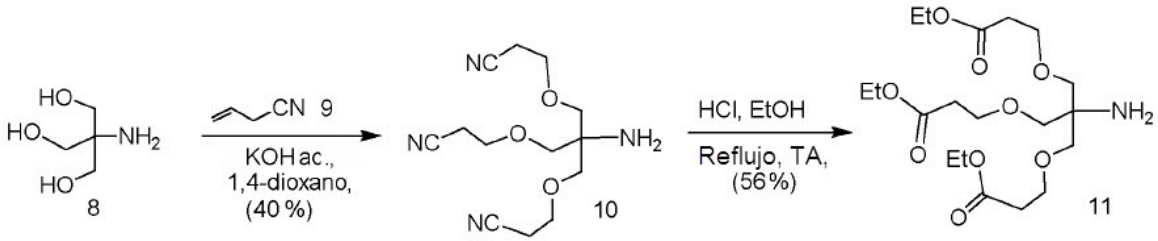
Los Compuestos 1, 1a y 2 se prepararon a través de los procedimientos conocidos en la técnica y descritos en la memoria descriptiva de la presente (ver Seth et ál., Bioorg. Med. Chem., 2011, 21(4), 1122-1125, J. Org. Chem., 2010, 75(5), 1569-1581, Nucleic Acids Symposium Series, 2008, 52(1), 553-554); y también ver las solicitudes internacionales PCT publicadas (WO 2011/115818, WO 2010/077578, WO2010/036698, WO2009/143369, WO 2009/006478 y WO 2007/090071) y la patente estadounidense 7,569,686).

Ejemplo 2: Preparación del compuesto 7



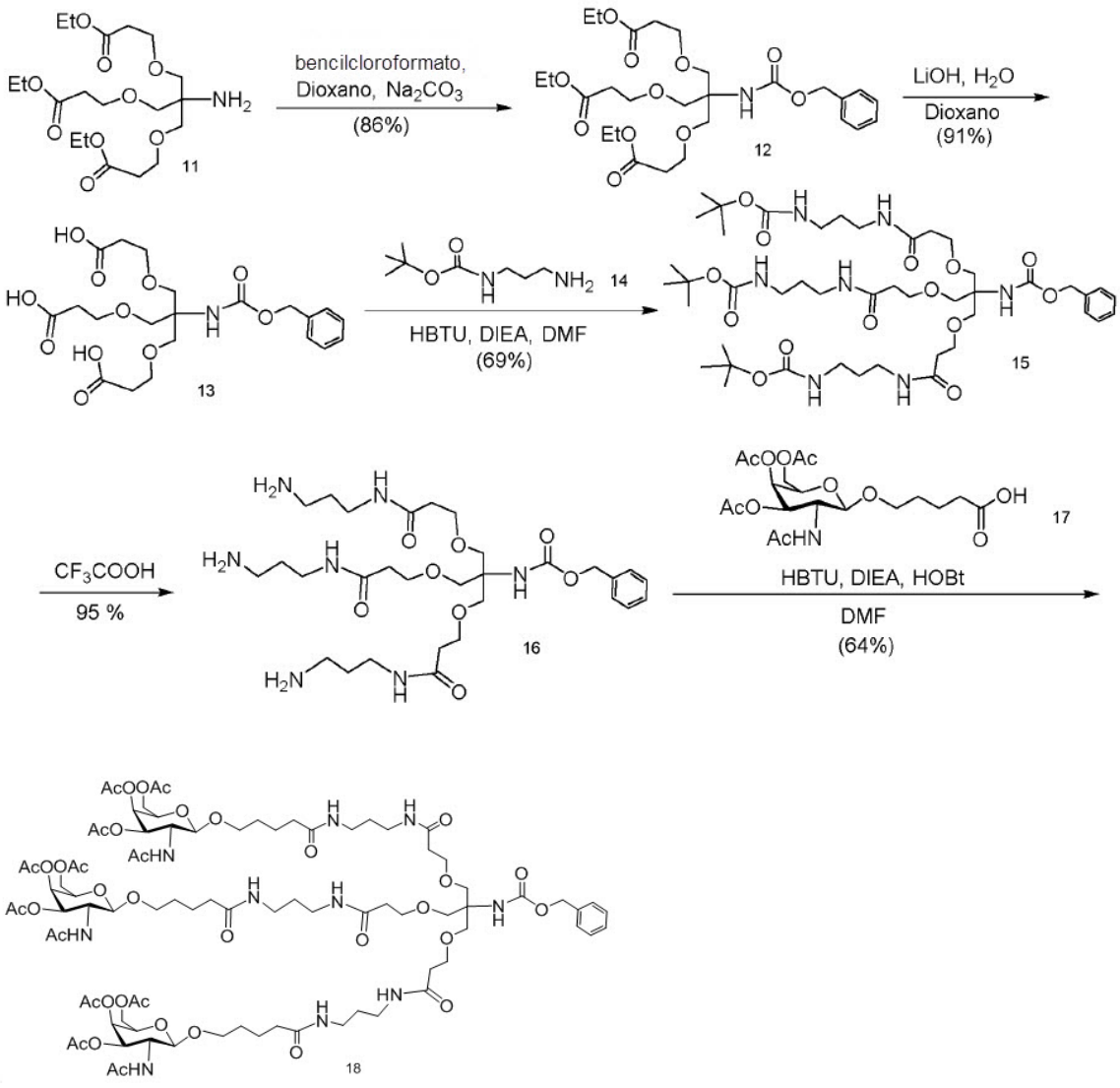
El Compuesto 3 (2-acetamido-1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi-β-Dgalactopiranosa o pentaacetato de galactosamina) se encuentra disponible en el mercado. El Compuesto 5 se preparó de acuerdo con procedimientos publicados (Weber et ál., *J. Med. Chem.*, 1991, *34*, 2692).

Ejemplo 3: Preparación del Compuesto 11



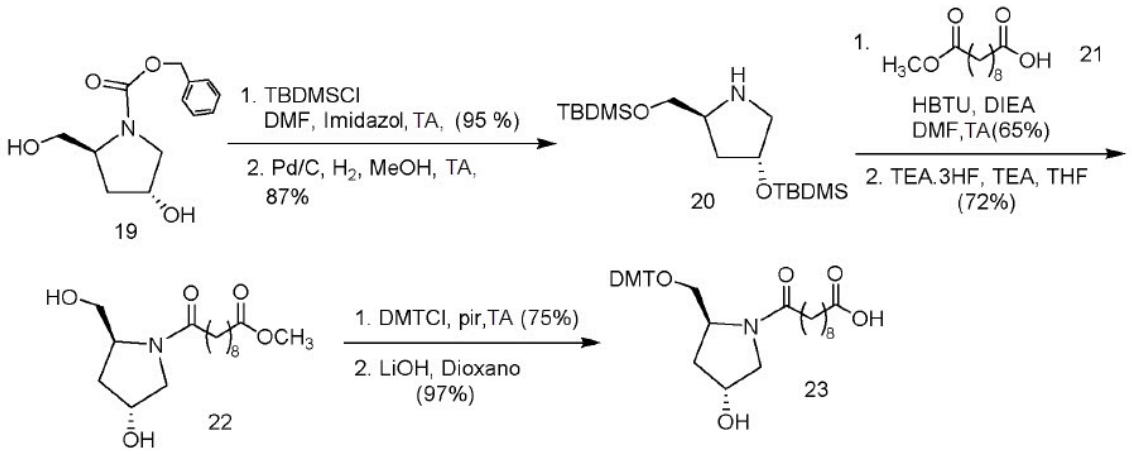
Los Compuestos 8 y 9 están disponibles en el mercado.

Ejemplo 4: Preparación del Compuesto 18



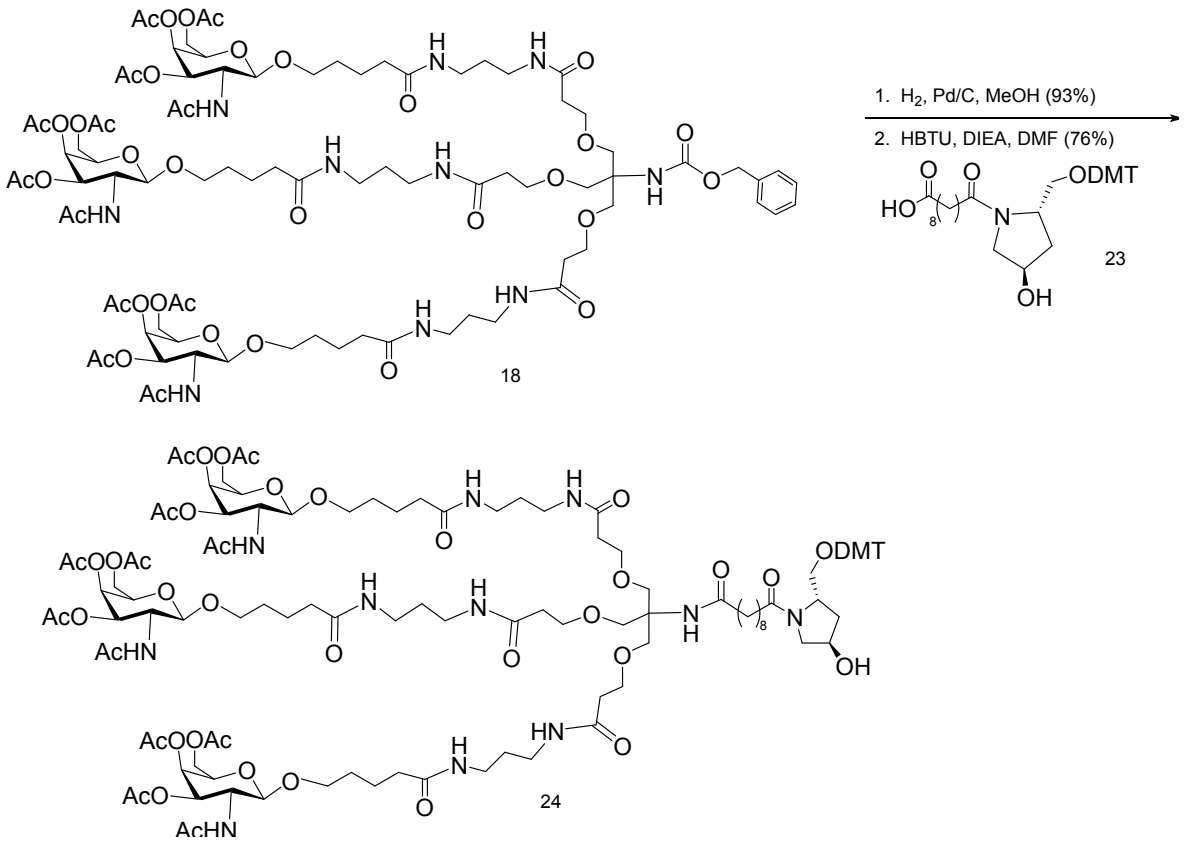
El Compuesto 11 se preparó según los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 3. El Compuesto 14 está disponible en el mercado. El Compuesto 17 se preparó mediante procedimientos publicados por Rensen et ál., *J. Med. Chem.*, 2004, *47*, 5798-5808.

Ejemplo 5: Preparación del Compuesto 23



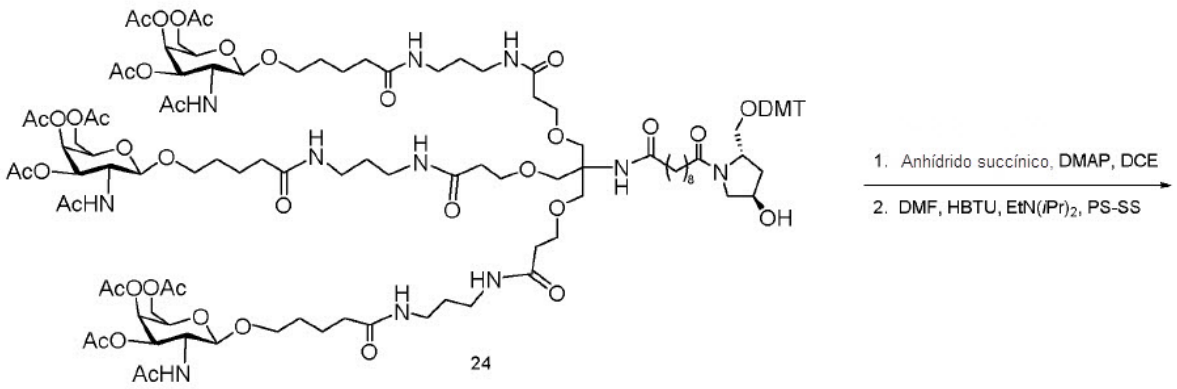
Los Compuestos 19 y 21 están disponibles en el mercado.

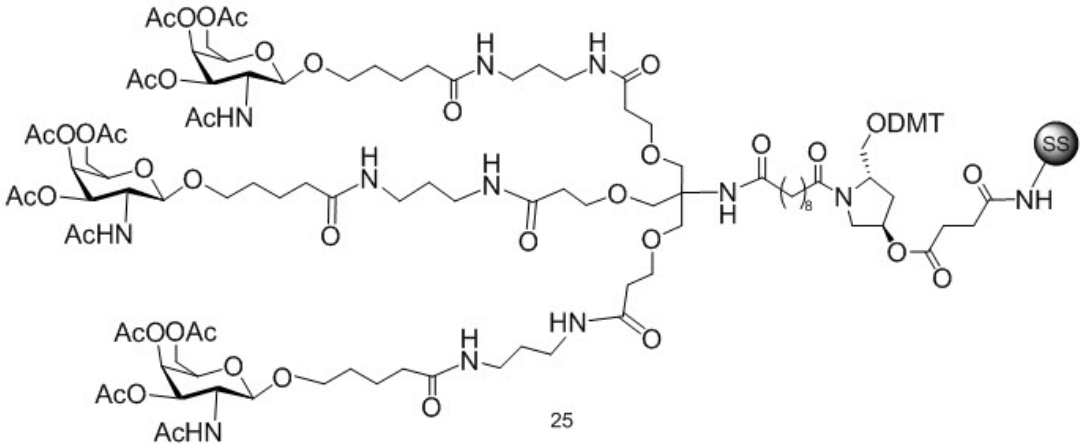
Ejemplo 6: Preparación del Compuesto 24



Los Compuestos 18 y 23 se prepararon según los procedimientos ilustrados en los Ejemplos 4 y 5.

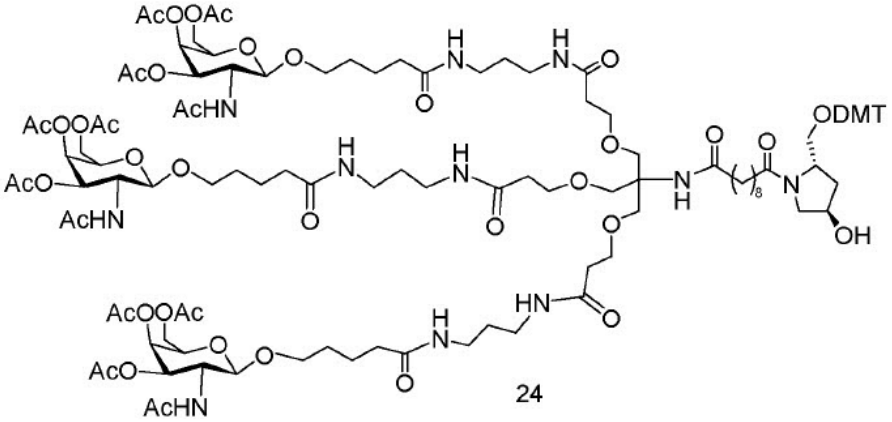
Ejemplo 7: Preparación del Compuesto 25



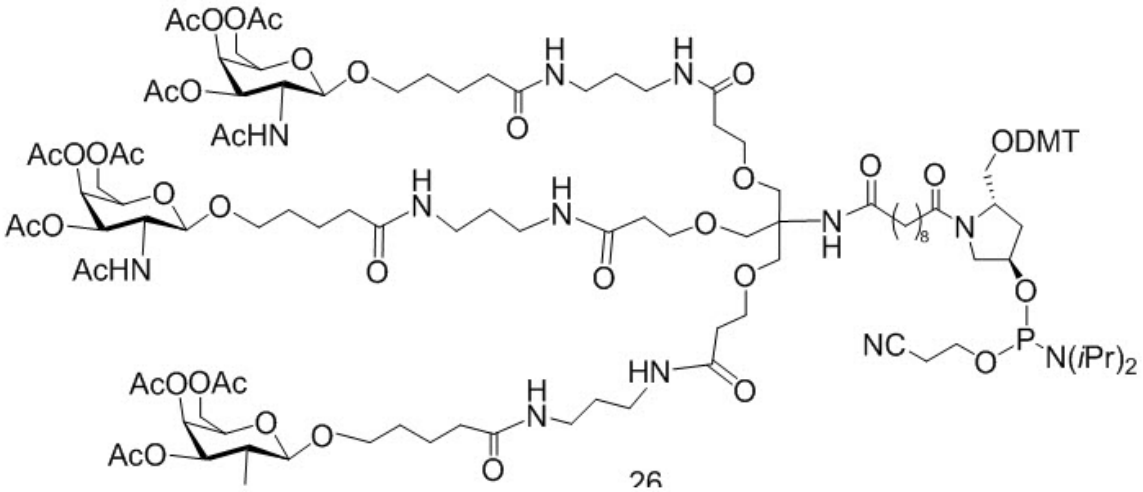


El Compuesto 24 se preparó según los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 6.

Ejemplo 8: Preparación del Compuesto 26

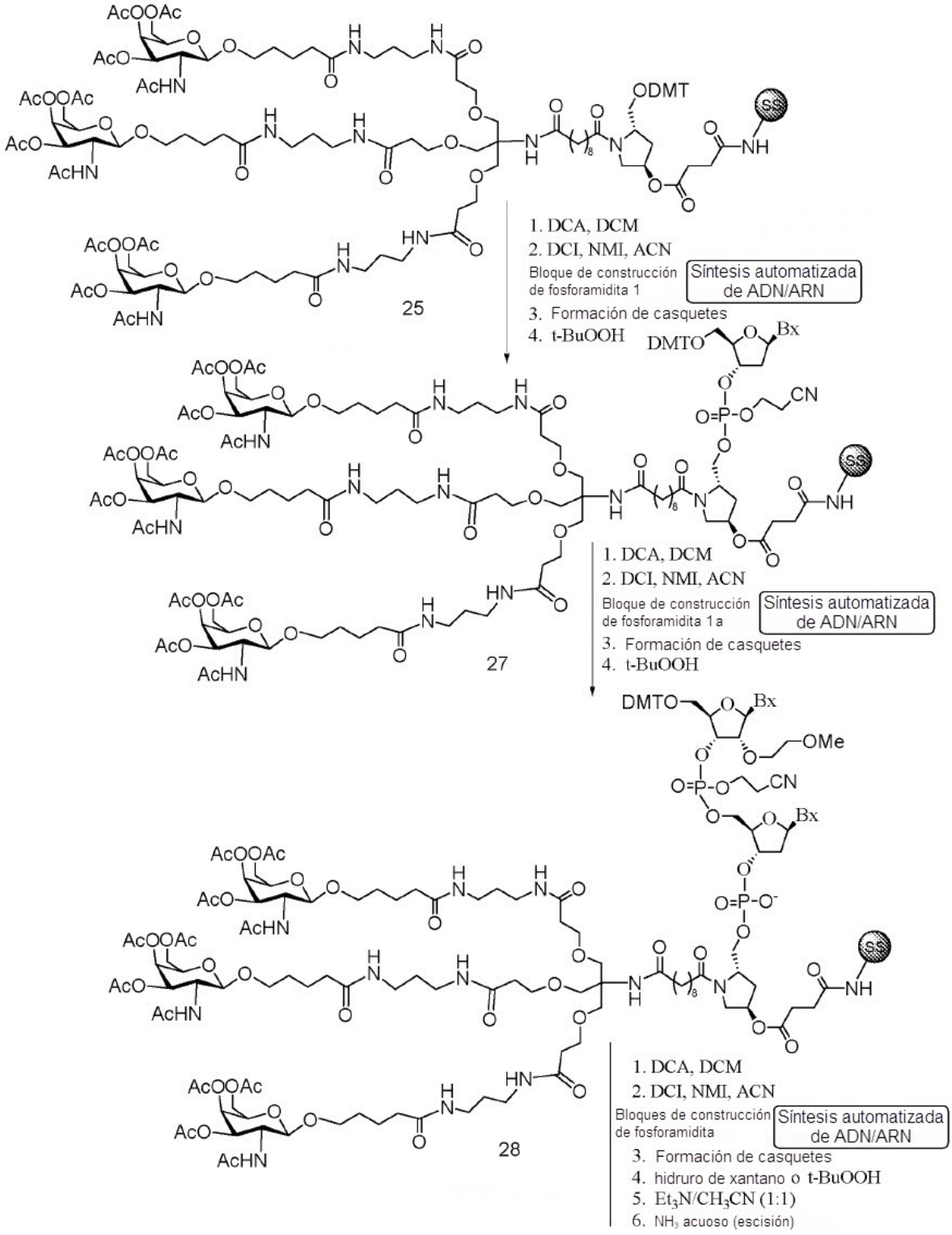


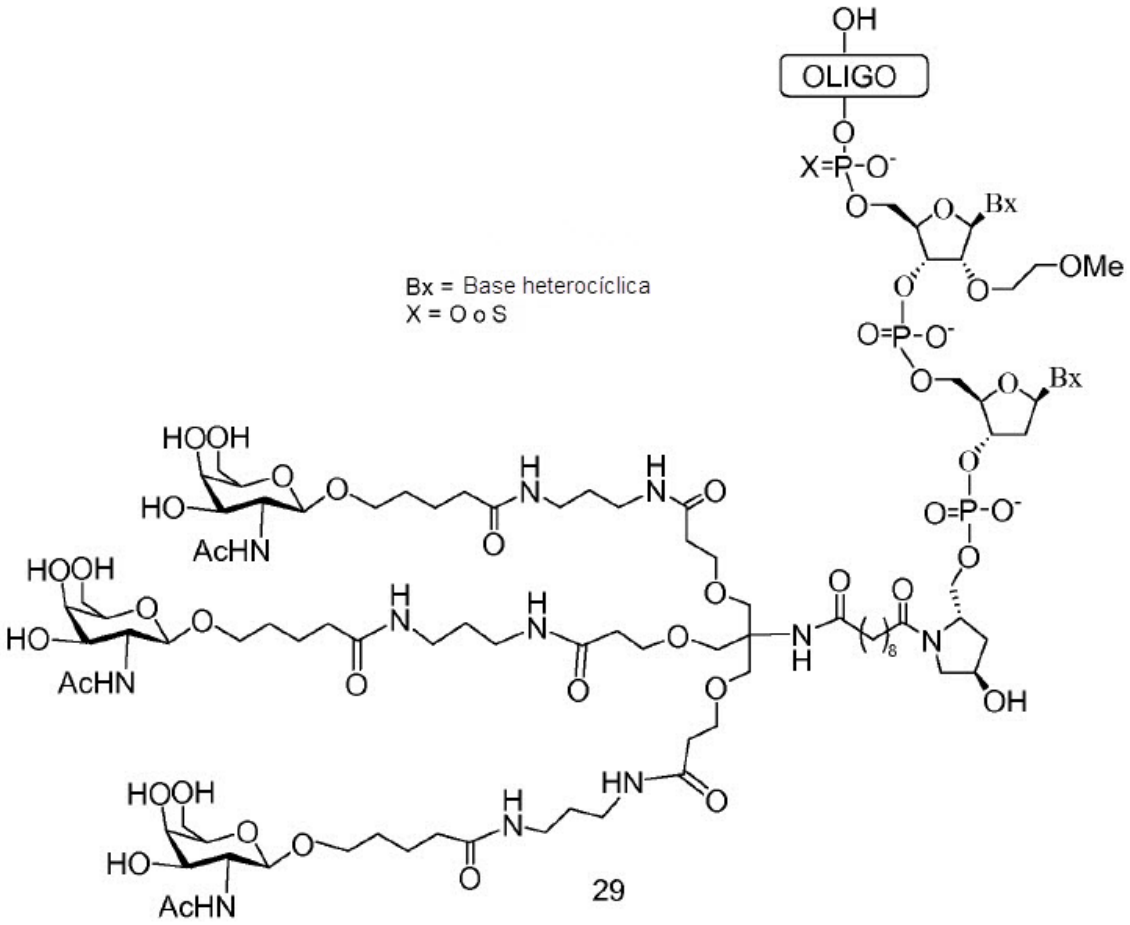
Fosfitilación



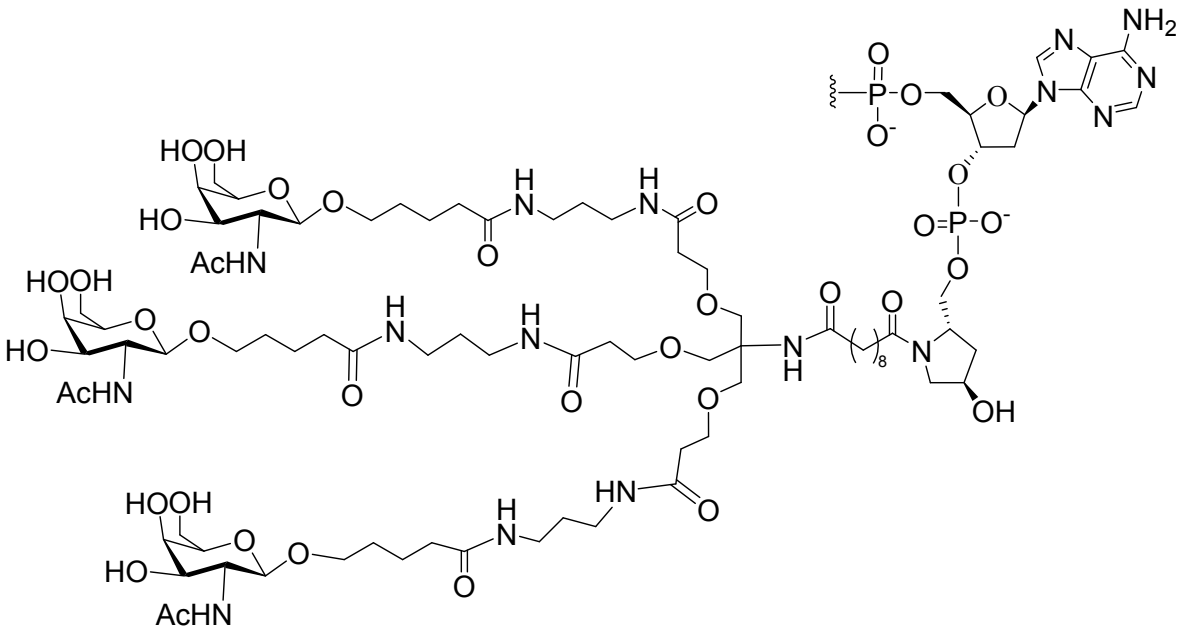
El Compuesto 24 se preparó según los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 6.

Ejemplo 9: Preparación general de ASO conjugados que comprenden GalNAc$_3$-1 en el extremo 3', Compuesto 29.

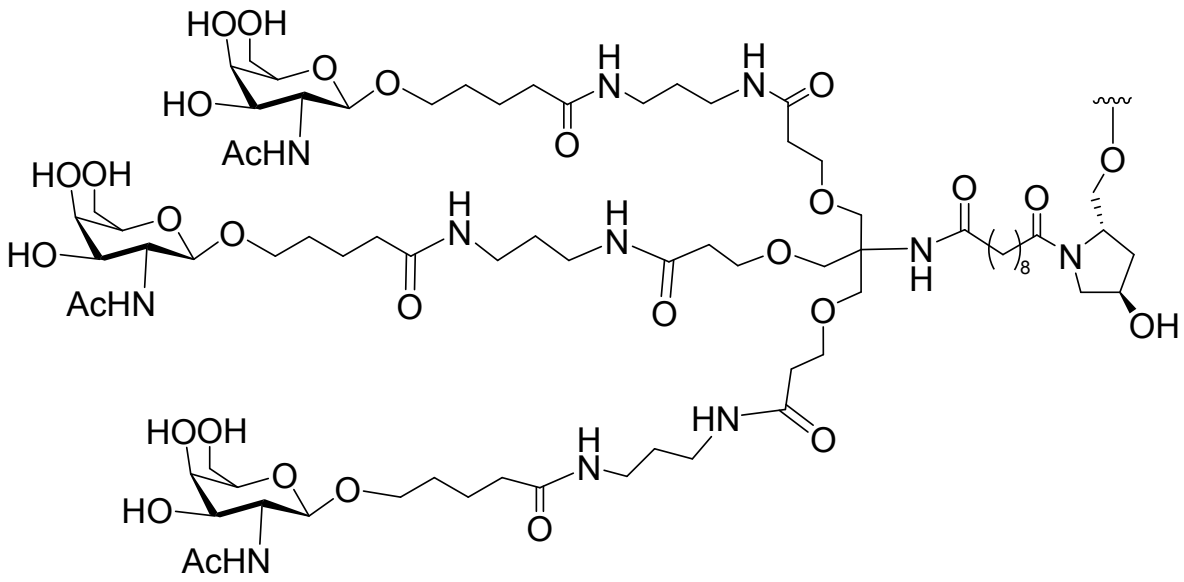




Donde el **GalNAc$_3$-1** protegido tiene la estructura:



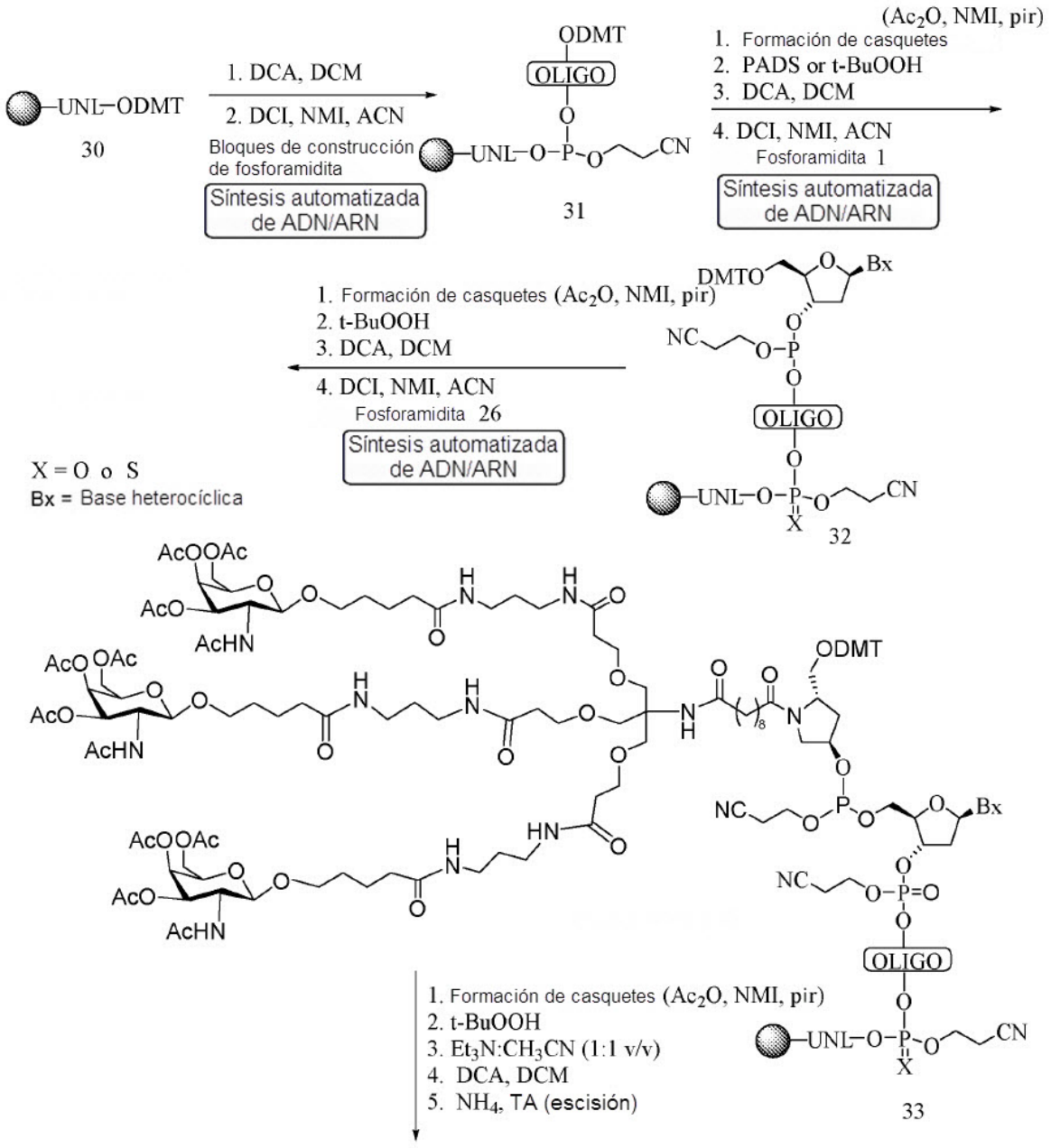
La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-1 ($GalNAc_3$-1_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. Donde $GalNAc_3$-1_a tiene la fórmula:

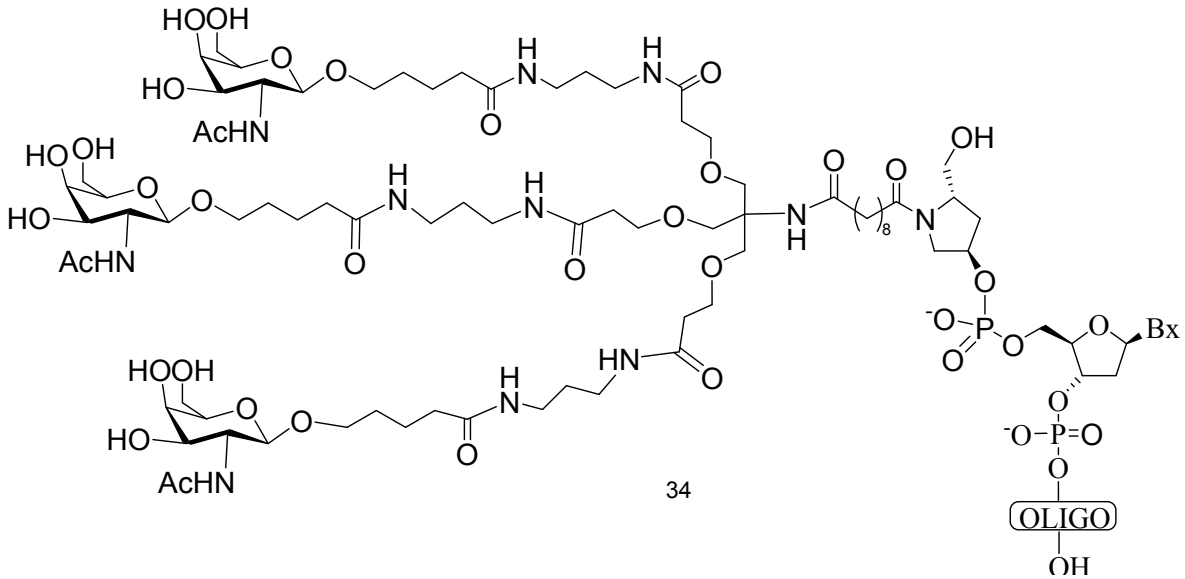


El **$GalNAc_3$-1** protegido unido a soporte sólido, el Compuesto 25, se preparó según los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 7. El Compuesto oligomérico 29 que comprende **$GalNAc_3$-1** en el extremo 3' se preparó mediante procedimientos estándar en síntesis automatizada de ADN/ARN (ver Dupouy et ál., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, *45*, 3623-3627). Los bloques de construcción de fosforamidita, los Compuestos 1 y 1a se prepararon según los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 1. Se pretende que las fosforamiditas ilustradas sean representativas y no taxativas, dado que pueden utilizarse otros bloques de construcción de fosforamidita para preparar

compuestos oligoméricos con una composición y secuencia predeterminada. El orden y la cantidad de fosforamiditas agregadas al soporte sólido puede ajustarse para preparar compuestos oligoméricos ahuecados tal como se describe en la presente. Dichos compuestos oligoméricos ahuecados pueden tener una secuencia de bases y composición predeterminada, dictada por cualquier objetivo.

Ejemplo 10: Preparación general de ASO conjugados que comprenden $GalNAc_3$-1 en el extremo 5', Compuesto 34.

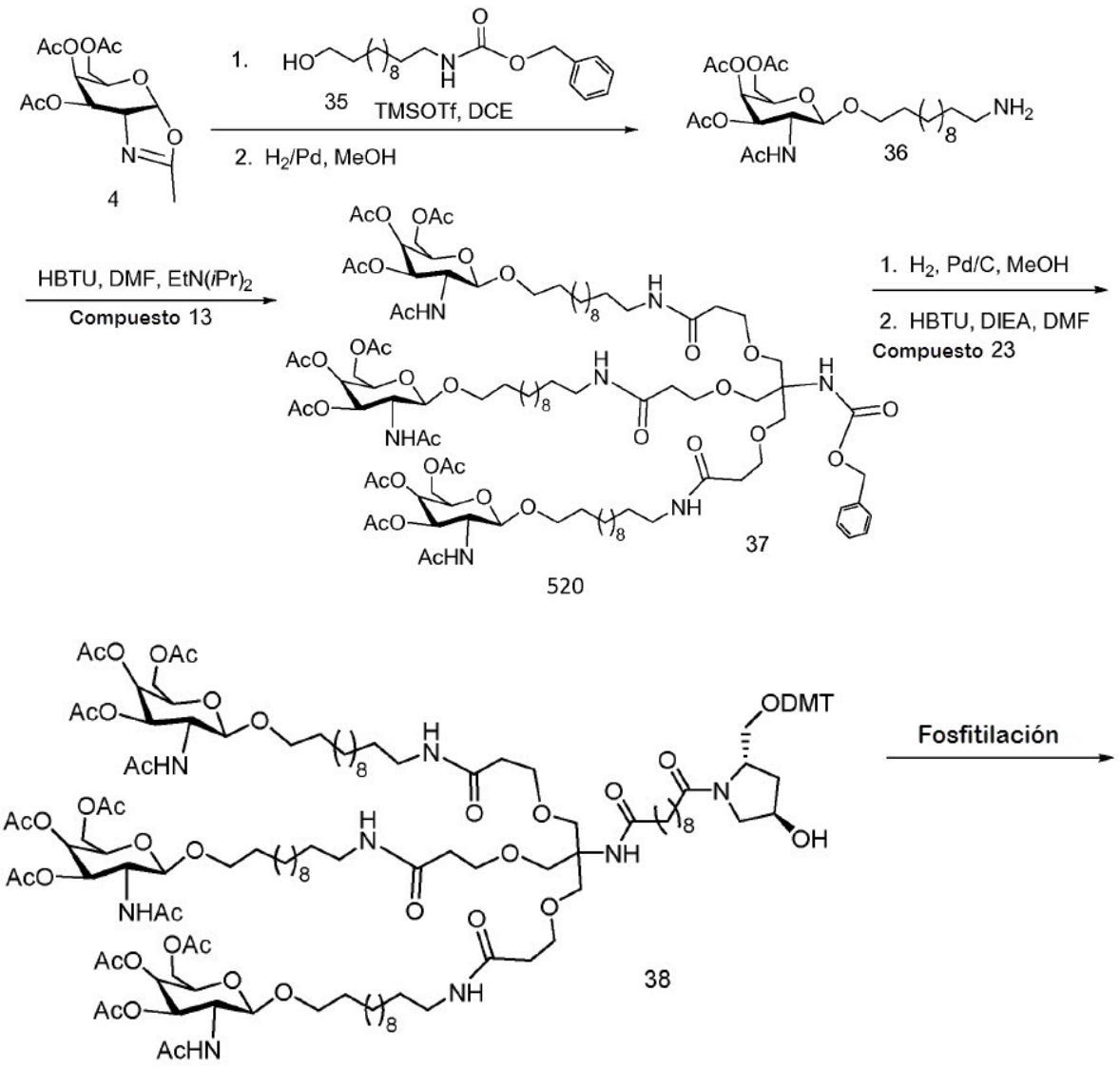

UNL–ODMT
30
1. DCA, DCM
2. DCI, NMI, ACN
Bloques de construcción de fosforamidita
Síntesis automatizada de ADN/ARN
ODMT
OLIGO
UNL–O–P–O–CN
31
(Ac2O, NMI, pir)
1. Formación de casquetes
2. PADS or t-BuOOH
3. DCA, DCM
4. DCI, NMI, ACN
Fosforamidita 1
Síntesis automatizada de ADN/ARN
1. Formación de casquetes (Ac2O, NMI, pir)
2. t-BuOOH
3. DCA, DCM
4. DCI, NMI, ACN
Fosforamidita 26
Síntesis automatizada de ADN/ARN
X = O o S
Bx = Base heterocíclica
DMTO
Bx
NC
OLIGO
UNL–O–P–O–CN
X
32
AcO
OAc
AcHN
ODMT
1. Formación de casquetes (Ac2O, NMI, pir)
2. t-BuOOH
3. Et3N:CH3CN (1:1 v/v)
4. DCA, DCM
5. NH4, TA (escisión)
33

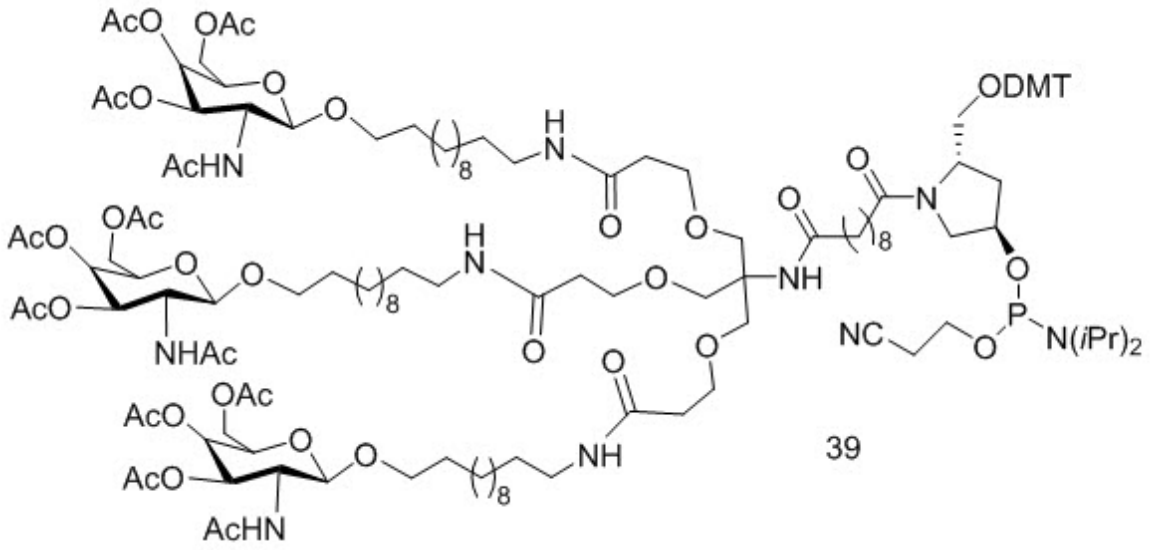


El Unylinker™ 30 se encuentra comercialmente disponible. El Compuesto oligomérico 34 que comprende un conglomerado **GalNAc$_3$-1** en el extremo 5' se preparó mediante procedimientos estándar en síntesis automatizada de ADN/ARN (ver Dupouy et ál., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, *45*, 3623-3627). Los bloques de construcción de fosforamidita, los Compuestos 1 y 1a se prepararon según los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 1. Se pretende que las fosforamiditas ilustradas sean representativas y no taxativas, dado que pueden utilizarse otros bloques de construcción de fosforamidita para preparar un compuesto oligomérico con una composición y secuencia predeterminadas. El orden y la cantidad de fosforamiditas agregadas al soporte sólido puede ajustarse para preparar compuestos oligoméricos ahuecados tal como se describe en la

presente. Dichos compuestos oligoméricos ahuecados pueden tener una secuencia de bases y composición predeterminada, dictada por cualquier objetivo.

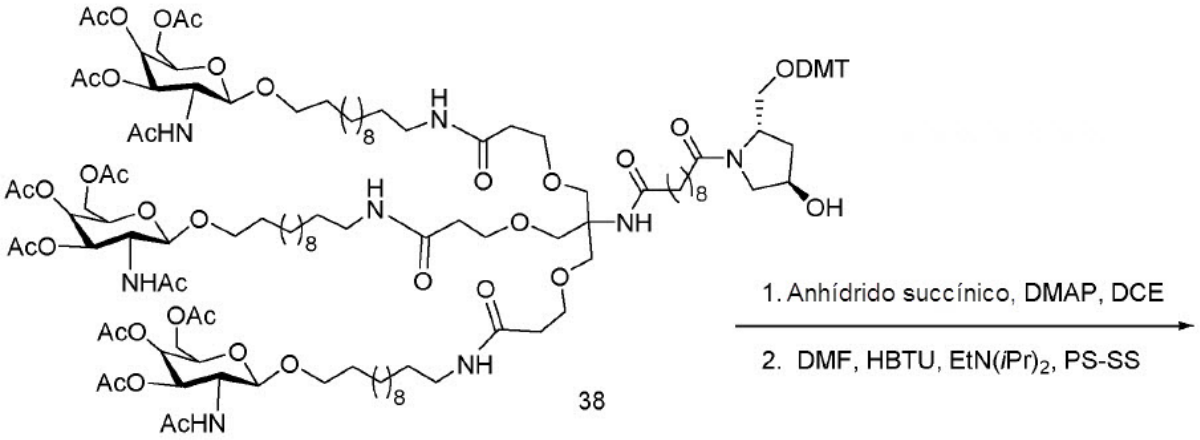
Ejemplo 11: Preparación del Compuesto 39

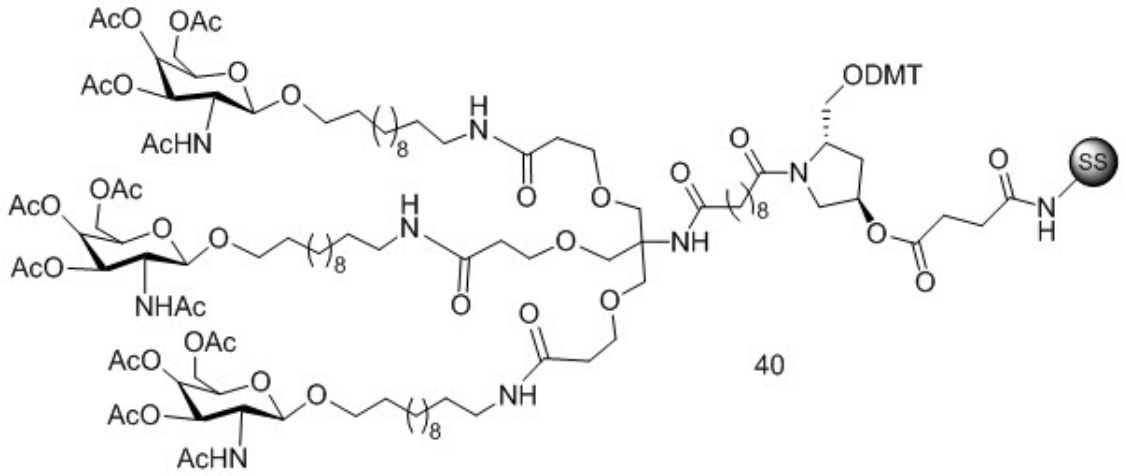




Los Compuestos 4, 13 y 23 se prepararon según los procedimientos ilustrados en los Ejemplos 2, 4 y 5. El Compuesto 35 se preparó mediante procedimientos similares publicados en Rouchaud et ál., *J. Med. J. Org. Chem.*, 2011, *12*, 2346-2353.

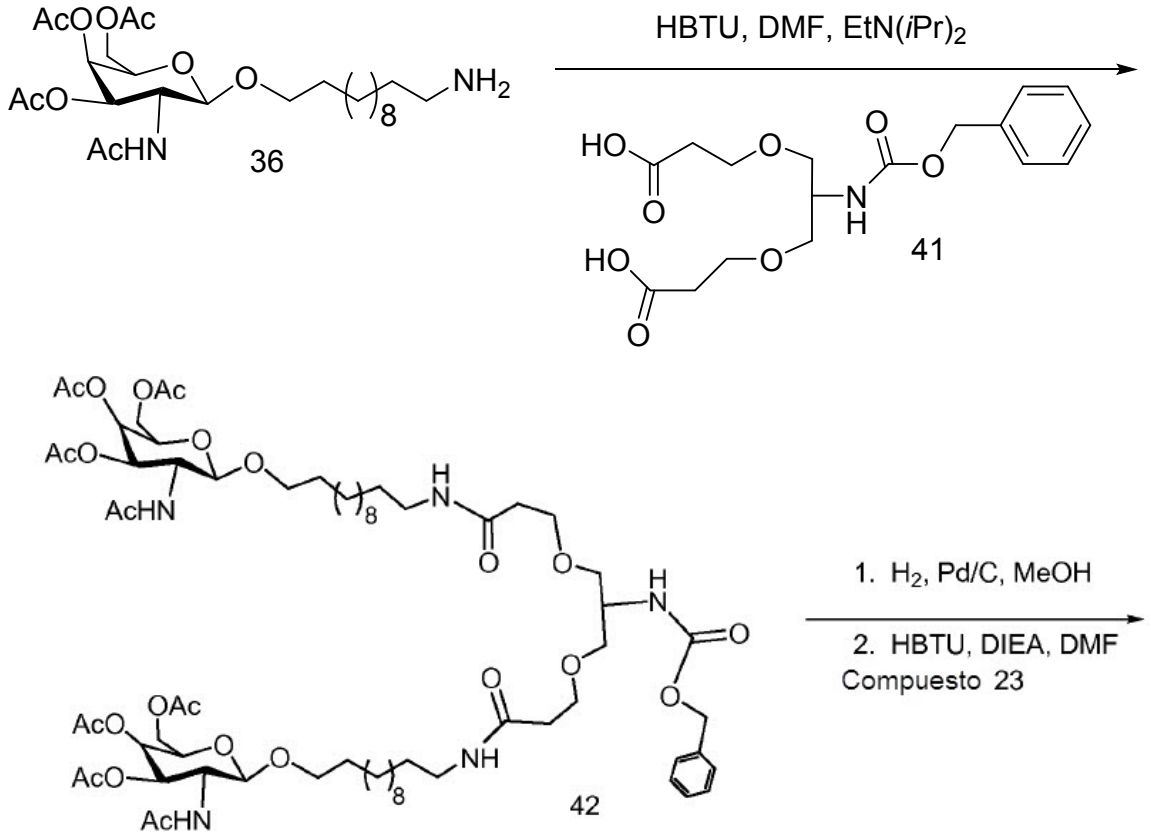
Ejemplo 12: Preparación del Compuesto 40

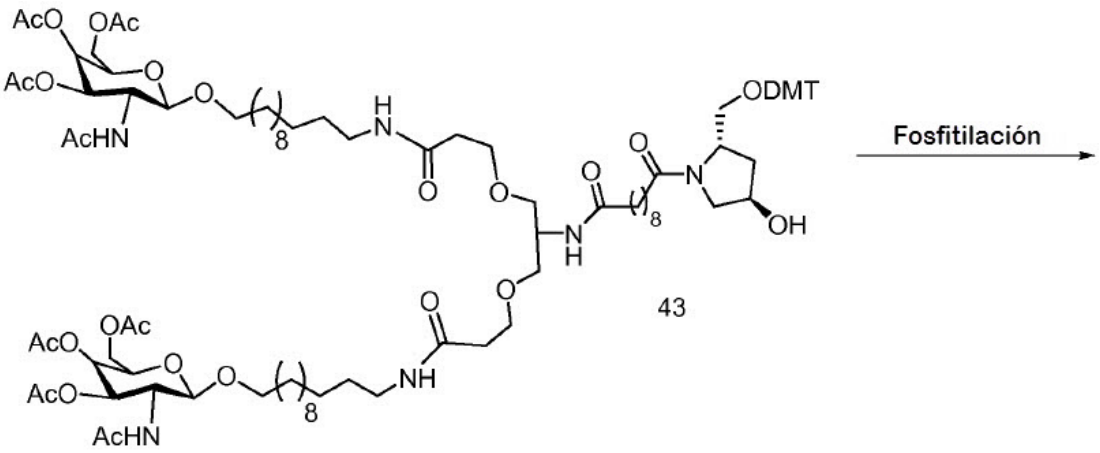


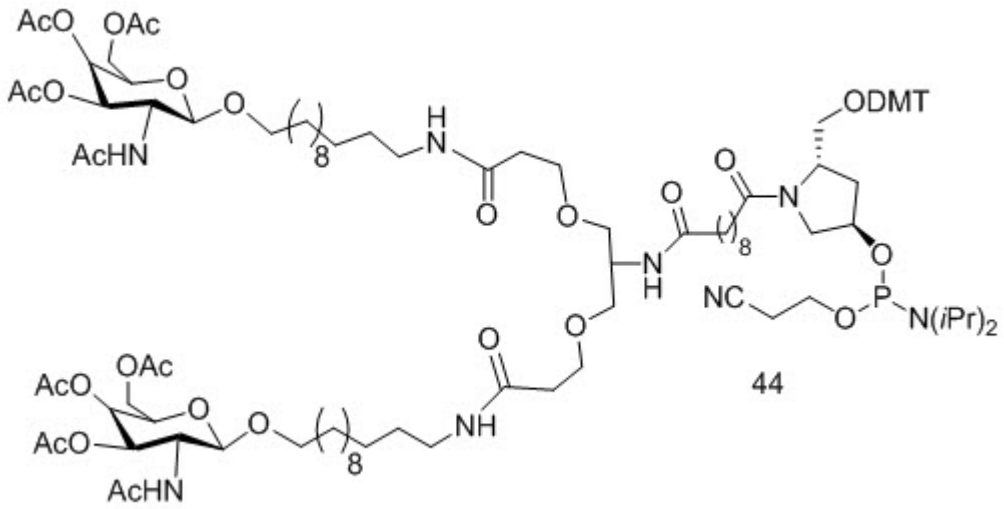


El Compuesto 38 se preparó según los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 11.

Ejemplo 13: Preparación del Compuesto 44

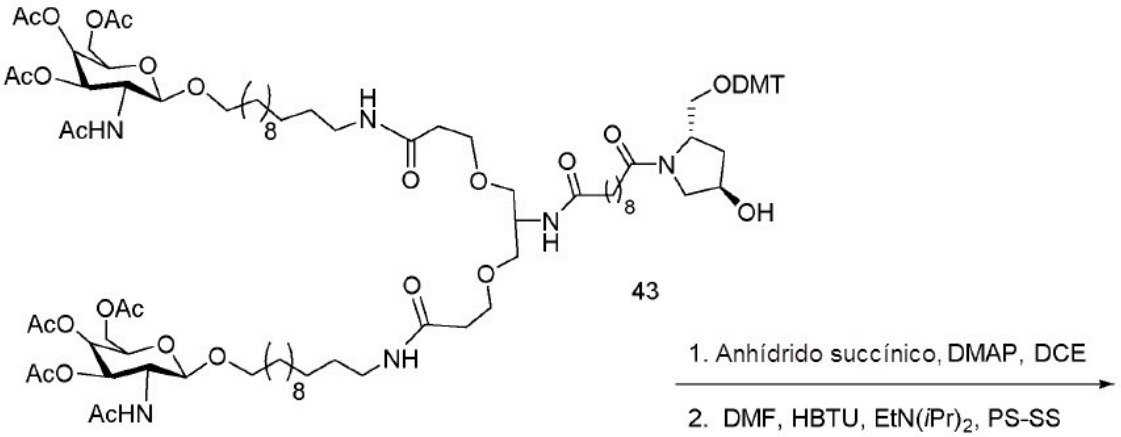


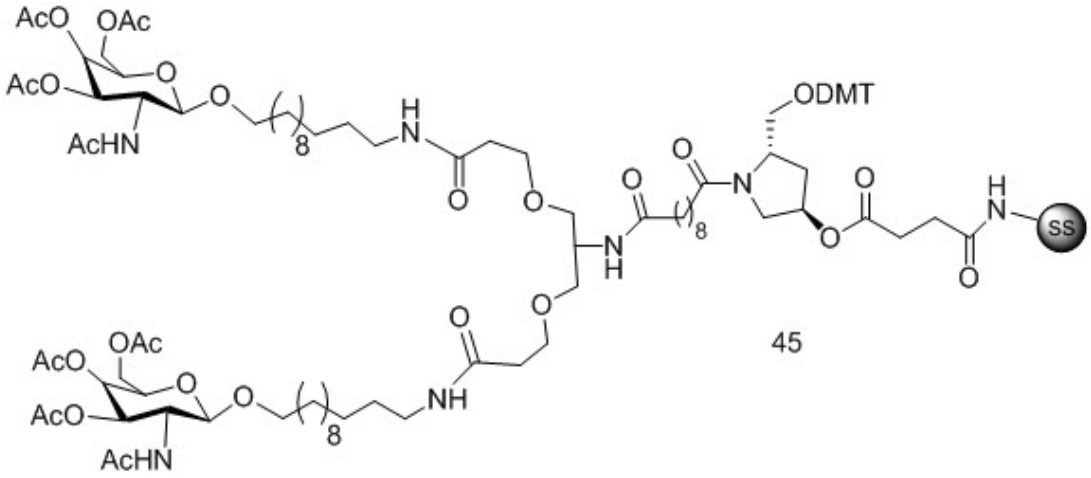




Los Compuestos 23 y 36 se prepararon según los procedimientos ilustrados en los Ejemplos 5 y 11. El Compuesto 41 se preparó mediante procedimientos similares publicados en WO 2009082607.

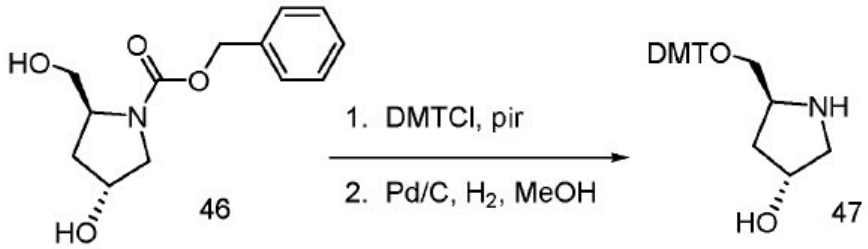
Ejemplo 14: Preparación del Compuesto 45





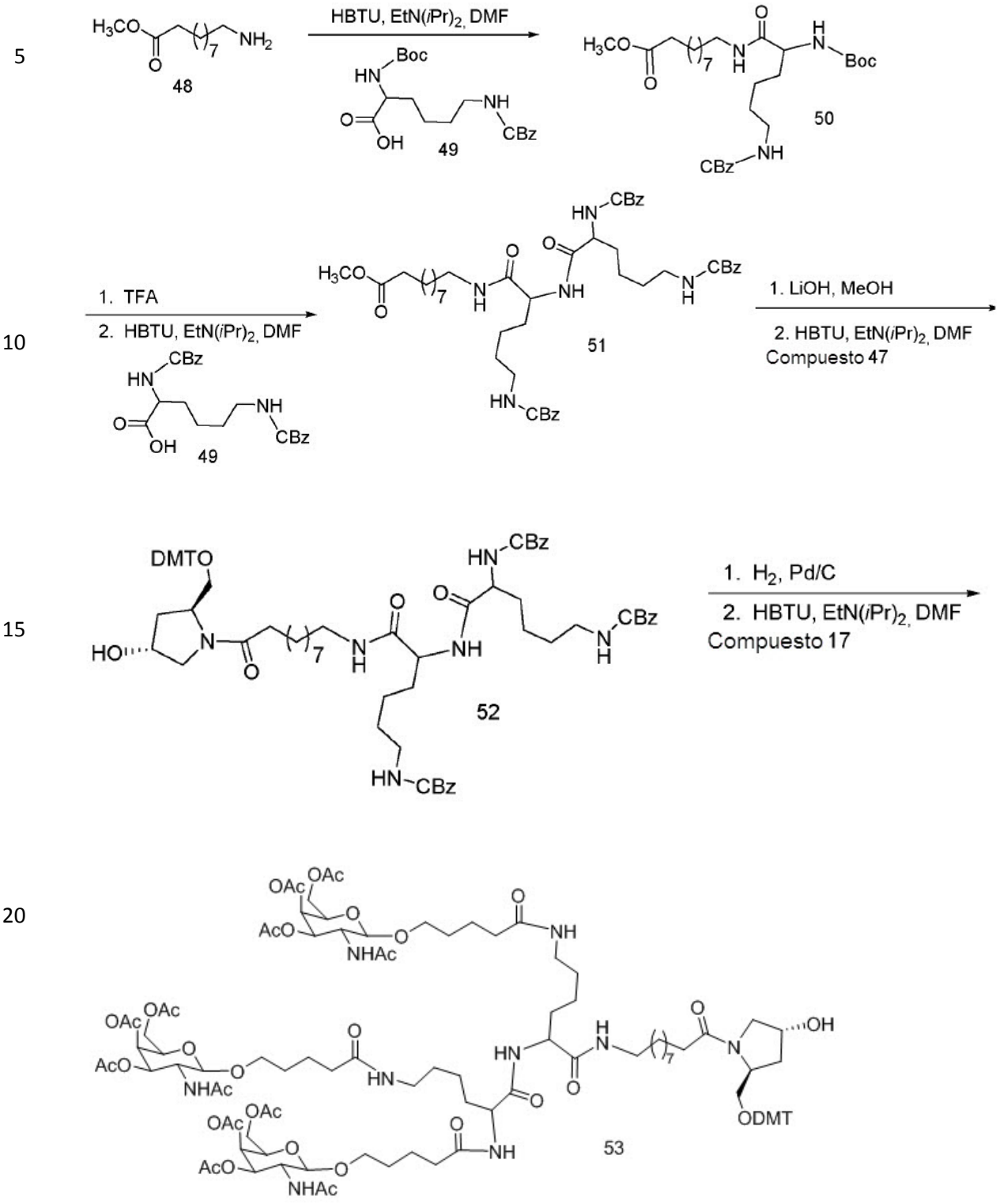
El Compuesto 43 se preparó según los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 13.

Ejemplo 15: Preparación del Compuesto 47



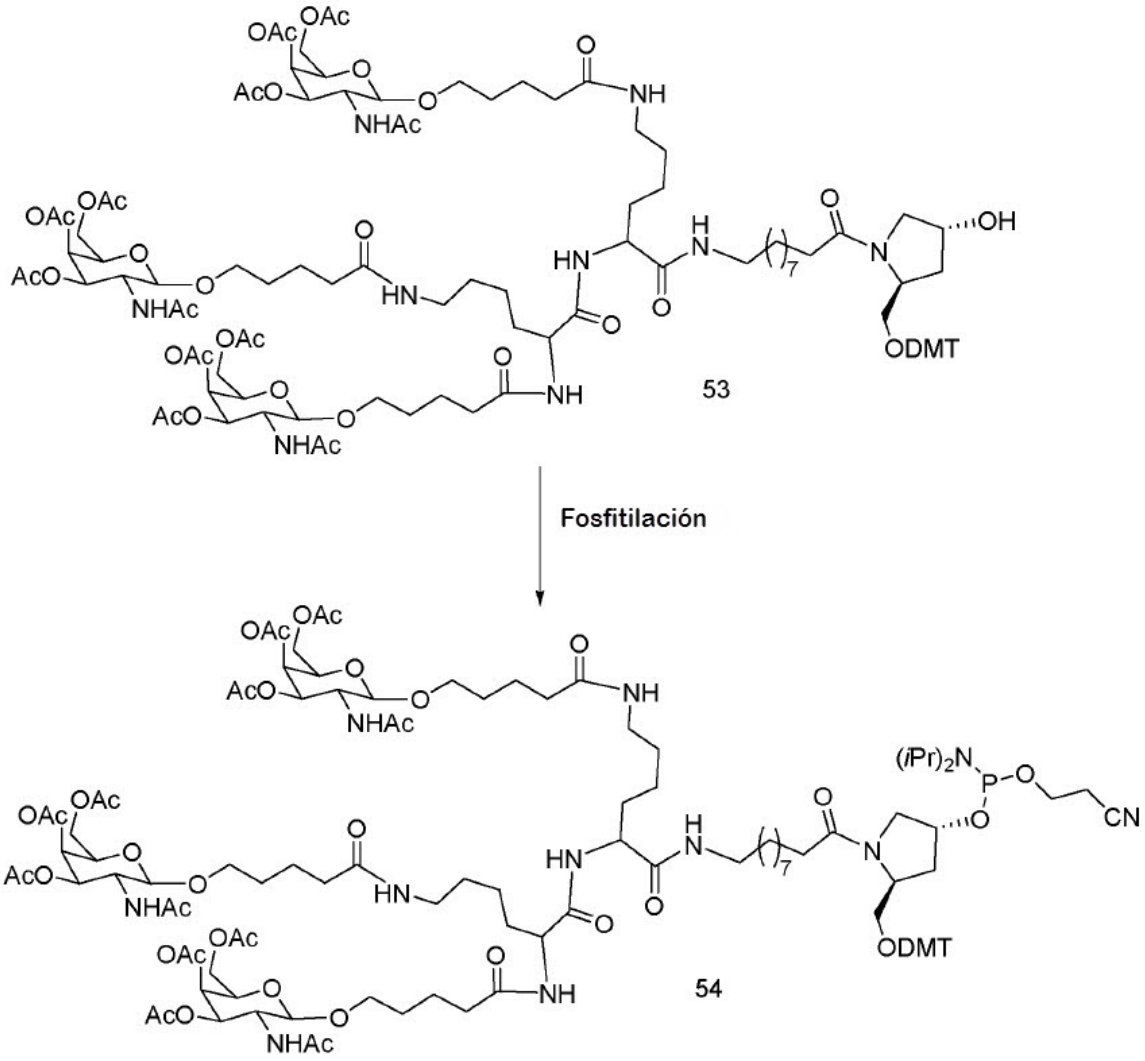
El Compuesto 46 está disponible en el mercado.

Ejemplo 16: Preparación del Compuesto 53



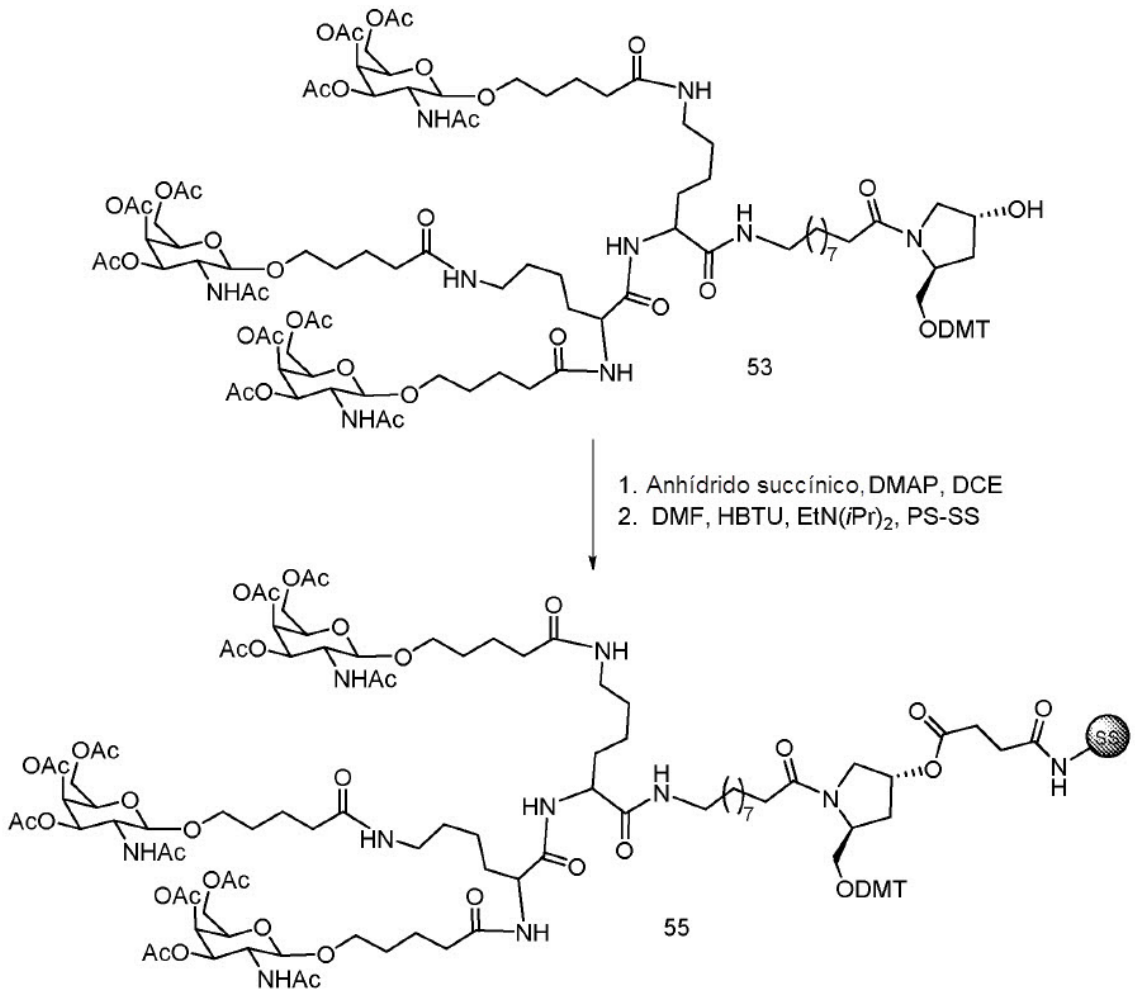
Los Compuestos 48 y 49 están disponibles en el mercado. Los Compuestos 17 y 47 se prepararon según los procedimientos ilustrados en los Ejemplos 4 y 15.

Ejemplo 17: Preparación del Compuesto 54



El Compuesto 53 se preparó según los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 16.

Ejemplo 18: Preparación del Compuesto 55



El Compuesto 53 se preparó según los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 16.

Ejemplo 19: Método general para la preparación de ASO conjugados que comprenden $GalNAc_3$-1 en la posición 3' mediante técnicas de fase sólida (preparación de ISIS 647535, 647536 y 651900)

A menos que se establezca lo contrario, todos los reactivos y soluciones utilizados para la síntesis de compuestos oligoméricos se adquirieron de fuentes comerciales. Se utilizaron soportes sólidos y bloques de construcción de fosforamidita estándar para la incorporación de residuos de nucleósidos que incluyen, por ejemplo, residuos T, A, G y ^{m}C. Se utilizó una solución de fosforamidita 0,1 M en acetonitrilo anhidro para β-D-2′-deoxyribonucleósido y 2′-MOE.

Las síntesis de ASO se realizaron en un sintetizador ABI 394 (escala 1-2 µmol) o en un sintetizador GE Healthcare Bioscience ÄKTA oligopilot (escala 40-200 µmol) mediante el método de acoplamiento de fosforamidita en un soporte sólido VIMAD cargado con **$GalNAc_3$-1** (110 µmol/g, Guzaev et ál., 2003) empaquetado en la columna. Para la etapa de acoplamiento, las fosforamidita se administraron en un exceso de 4 veces sobre la carga en el soporte sólido y se llevó a cabo la condensación de fosforamidita durante 10 minutos. El resto de las etapas siguió protocolos estándar proporcionados por el fabricante. Se utilizó una solución de ácido dicloroacético al 6 % en tolueno para quitar el grupo dimetoxitritilo (DMT) del grupo 5'-hidroxilo del nucleótido. Se utilizó 4,5-Dicianoimidazola (0,7 M) en CH_3CN anhidro como catalizador

durante la etapa de acoplamiento. Las uniones fosforotioato se introdujeron mediante sulfurización con una solución 0,1 M de hidruro de xantano en piridina/CH_3CN 1:1 durante un tiempo de contacto de 3 minutos. Se utilizó una solución de *terc*-butilhidroperóxido al 20 % en CH_3CN con agua al 6 % como un agente oxidante para proporcionar uniones internucleósido fosfodiéster con un tiempo de contacto de 12 minutos.

Luego de haberse ensamblado la secuencia deseada, los grupos protectores de fosfato de cianoetilo se desprotegieron con una mezcla 1:1 (v/v) de trietilamina y acetonitrilo con un tiempo de contacto de 45 minutos. Los ASO unidos a soporte sólido se suspendieron en amoníaco acuoso (28-30 % en peso) y se calentaron a 55 °C durante 6 horas.

Los ASO sin unir se filtraron y se hirvió el amoníaco. El residuo se purificó mediante cromatografía líquida a presión elevada en una columna de intercambio aniónico fuerte (GE Healthcare Bioscience, Source 30Q, 30 µm, 2,54 x 8 cm, A = acetato de amonio 100 mM en CH_3CN acuoso al 30 %, B = NaBr 1,5 M en A, 0-40 % de B en 60 min, flujo 14 mL min-1, λ = 260 nm). El residuo se desaló mediante HPLC en una columna de fase inversa para proporcionar los ASO deseados en un rendimiento aislado de 15-30 % basado en la carga inicial en

el soporte sólido. Los ASO se caracterizaron mediante análisis MS acoplado por HPLC de pares iónicos con el sistema Agilent 1100 MSD.

Los oligonucleótidos antisentido que no comprenden un conjugado se sintetizaron mediante procedimientos estándar de síntesis de oligonucleótidos conocidos en la técnica.

Mediante estos métodos, se prepararon tres compuestos antisentido separados dirigidos a ApoC III. Tal como se resume en la Tabla 17, cada uno de los tres compuestos antisentido dirigidos a ApoC III tenía la misma secuencia de nucleobases; ISIS 304801 es un gapmer MOE 5-10-5 con todas las uniones fosforotioato; ISIS 647535 es igual a ISIS 304801, salvo que tenía un **$GalNAc_3$-1** conjugado en su extremo 3’; e ISIS 647536 es igual a ISIS 647535, salvo que algunas uniones internucleósido de ese compuesto son uniones fosfodiéster. Como se resume adicionalmente en la Tabla 17, se sintetizaron dos compuestos antisentido separados dirigidos a SRB-1. ISIS 440762 era un gapmer cEt 2-10-2 con todas las uniones internucleósido fosforotioato; ISIS 651900 es igual a ISIS 440762, salvo que incluía un **$GalNAc_3$-1** en su extremo 3’.

Tabla 17

ASO modificado dirigido a ApoC III y SRB-1

ASO	Secuencia (5' a 3')	Objetivo	Masa calCd	Masa observada	SEQ ID NO.
ISIS 304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	ApoC III	7165,4	7164,4	821
ISIS 647535	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-**$GalNAc_3$-$1_a$**	ApoC III	9239,5	9237,8	822
ISIS 647536	$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-**$GalNAc_3$-$1_a$**	ApoC III	9142,9	9140,8	822
ISIS 440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	SRB-1	4647,0	4646,4	823
ISIS 651900	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ko}\mathbf{A_{do'}}$-**$GalNAc_3$-$1_a$**	SRB-1	6721,1	6719,4	824

Subíndices: "e" indica un nucleósido modificado en 2'-MOE; "d" indica β-D-2'-desoxirribonucleósido; "k" indica el nucleósido bicíclico 6'-*(S)*-CH_3 (por ejemplo, cEt); "s" indica uniones internucleósido fosforotioato (PS); "o" indica uniones internucleósido fosfodiéster (PO) y "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. El superíndice "m" indica 5-metilcitosinas. "**$GalNAc_3$-1**" indica un grupo conjugado con la estructura

mostrada previamente en el Ejemplo 9. Nótese que **$GalNAc_3$-1** comprende una adenosina escindible que une el ASO al resto del conjugado, el cual se designa como "**$GalNAc_3$-1_a**". Esta nomenclatura se utiliza en la tabla que antecede para mostrar la secuencia de nucleobases completa, inclusive la adenosina, que es parte del conjugado. Por lo tanto, en la tabla que antecede, las secuencias también podrían estar enumeradas finalizando con un "**$GalNAc_3$-1**", omitiendo el "**A_{do}**". Se usa a lo largo de estos Ejemplos esta convención de utilizar el superíndice "a" para indicar la parte de un grupo conjugado carente de un nucleósido escindible o resto escindible. Se hace referencia en la presente a esta parte de un grupo conjugado sin el resto escindible como "conglomerado" o "conglomerado conjugado" o "conglomerado de $GalNAc_3$". En determinadas instancias es conveniente describir un grupo conjugado al proporcionar, de manera separada, su conglomerado y su resto escindible.

Ejemplo 20: Inhibición antisentido dependiente de la dosis para ApoC III humana en ratones transgénicos de huApoC III

ISIS 304801 y ISIS 647535, ambas dirigidas a la ApoC III humana y descritas anteriormente, se probaron de manera separada y se evaluaron en un estudio dependiente de la dosis

en cuanto a su capacidad de inhibir la ApoC III humana en ratones transgénicos de ApoCIII humana.

Tratamiento

Los ratones transgénicos de ApoCIII humana se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y se alimentaron a voluntad con alimento de laboratorio Teklad. Los animales se aclimataron durante al menos 7 días en el centro de investigación antes de comenzar con el experimento. Los ASO se prepararon en PBS y se esterilizaron mediante filtración a través de un filtro de 0,2 micrones. Los ASO se disolvieron en PBS al 0,9 % para la inyección.

Se inyectó a los ratones transgénicos de ApoC III humana de manera intraperitoneal una vez a la semana durante dos semanas con ISIS 304801 o 647535 a 0,08, 0,25. 0,75, 2,25 o 6,75 µmol/kg o con PBS como control. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Cuarenta y ocho horas después de la administración de la última dosis, se extrajo sangre de cada ratón y los ratones fueron sacrificados y se recolectaron los tejidos.

Análisis de ARNm de ApoC III

Se determinaron los niveles de ARNm de ApoC III en los hígados de los ratones mediante PCR de tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los niveles de ARNm de ApoC III se determinaron en comparación con el ARN total (mediante Ribogreen), antes de la normalización con el control tratado con PBS. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de ApoC III para cada grupo de tratamiento, normalizados con control tratado con PBS y se denotan como "% PBS". La dosificación eficaz máxima media (ED_{50}) de cada ASO también se presenta en la Tabla 18 a continuación.

Tal como se ilustra, ambos compuestos antisentido redujeron el ARN de ApoC III en comparación con el control con PBS. Además, el compuesto antisentido conjugado a **$GalNAc_3$-1** (ISIS 647535) era sustancialmente más potente que el compuesto antisentido sin el conjugado **$GalNAc_3$-1** (ISIS 304801).

Tabla 18

Efecto del tratamiento con ASO en los niveles de ARNm de ApoC III en ratones transgénicos de ApoC III humana

ASO	Dosis (µmol/kg)	% PBS	ED_{50} (µmol/kg)	Conjugado 3'	Unión internucleósido/ longitud	SEQ ID NO.
PBS	0	100	--	-	--	
ISIS 304801	0,08	95	0,77	Ninguno	PS/20	821
	0,75	42				
	2,25	32				
	6,75	19				
ISIS 647535	0,08	50	0,074	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	822
	0,75	15				
	2,25	17				
	6,75	8				

Análisis de proteína ApoC III (ensayo turbidimétrico)

El análisis de proteína ApoC III en plasma se determinó mediante procedimientos informados por Graham et ál., *Circulation Research,* publicado en línea antes de su impresión el 29 de marzo de 2013.

Se analizaron aproximadamente 100 µl de plasma aislado de ratones, sin dilución, con un Olympus Clinical Analyzer y un ensayo turbidimétrico de ApoC III disponible en el mercado

(Kamiya, Cat# KAI-006, Kamiya Biomedical, Seattle, WA). El protocolo del ensayo se realizó como describe el vendedor. Tal como se muestra en la Tabla 19 a continuación, ambos compuestos antisentido redujeron la proteína ApoC III en comparación con el control con PBS. Además, el compuesto antisentido conjugado a **$GalNAc_3$-1** (ISIS 647535) era sustancialmente más potente que el compuesto antisentido sin el conjugado **$GalNAc_3$-1** (ISIS 304801).

Tabla 19

Efecto del tratamiento con ASO en los niveles de proteína ApoC III en plasma en ratones transgénicos de ApoC III humana

ASO	Dosis (µmol/kg)	% PBS	ED_{50} (µmol/kg)	Conjugado 3'	Internucleósido Unión/longitud	SEQ ID NO.
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0,08	86	0,73	Ninguno	PS/20	821
	0,75	51				
	2,25	23				
	6,75	13				
ISIS 647535	0,08	72	0,19	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	822
	0,75	14				
	2,25	12				
	6,75	11				

Se extrajo colesterol y triglicéridos en plasma mediante el método de Bligh y Dyer (Bligh, E.G. y Dyer, W.J. Can. J.

Biochem. Physiol. 37: 911-917, 1959)(Bligh, E y Dyer, W, *Can J Biochem Physiol*, 37, 911-917, 1959)(Bligh, E y Dyer, W, *Can J Biochem Physiol*, 37, 911-917, 1959) y se midieron utilizando un analizador clínico Beckmann Coulter y reactivos comercialmente disponibles.

Los niveles de triglicéridos se midieron con relación a ratones inyectados con PBS y se denotan como "% PBS". Los resultados se presentan en la Tabla 20. Tal como se ilustra, ambos compuestos antisentido disminuyeron los niveles de triglicéridos. Además, el compuesto antisentido conjugado a **$GalNAc_3$-1** (ISIS 647535) era sustancialmente más potente que el compuesto antisentido sin el conjugado **$GalNAc_3$-1** (ISIS 304801).

Tabla 20

Efecto del tratamiento con ASO en los niveles de triglicéridos en ratones transgénicos

ASO	Dosis (µmol/kg)	% PBS	ED_{50} (µmol/kg)	Conjugado 3'	Unión internucleósido /longitud	SEQ ID NO.
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0,08	87	0,63	Ninguno	PS/20	821
	0,75	46				
	2,25	21				
	6,75	12				
ISIS 647535	0,08	65	0,13	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	822
	0,75	9				
	2,25	8				
	6,75	9				

Las muestras de plasma se analizaron mediante HPLC para determinar la cantidad de colesterol total de diferentes fracciones de colesterol (HDL y LDL). Los resultados se presentan en las Tablas 21 y 22. Tal como se ilustra, ambos compuestos antisentido disminuyeron los niveles totales de colesterol; ambos disminuyeron el LDL y ambos aumentaron el HDL. Además, el compuesto antisentido conjugado a **$GalNAc_3$-1** (ISIS 647535) era sustancialmente más potente que el compuesto antisentido sin el conjugado **$GalNAc_3$-1** (ISIS

304801). Un aumento de los niveles de HDL y una disminución de los niveles de LDL es un efecto cardiovascular beneficioso de la inhibición antisentido de ApoC III.

Tabla 21

Efecto del tratamiento con ASO en los niveles totales de colesterol en ratones transgénicos

ASO	Dosis (µmol/kg)	Colesterol total (mg/dL)	Conjugado 3'	Unión internucleósido /longitud	SEQ ID NO.
PBS	0	257	--	--	
ISIS 304801	0,08	226	Ninguno	PS/20	821
	0,75	164			
	2,25	110			
	6,75	82			
ISIS 647535	0,08	230	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	822
	0,75	82			
	2,25	86			
	6,75	99			

Tabla 22

Efecto del tratamiento con ASO en los niveles de colesterol HDL y LDL en ratones transgénicos

ASO	Dosis (µmol/kg)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	Conjugado 3'	Unión internucleósido /longitud	SEQ ID NO.
PBS	0	17	28	--	--	
ISIS 304801	0,08	17	23	Ninguno	PS/20	821
	0,75	27	12			
	2,25	50	4			
	6,75	45	2			
ISIS 647535	0,08	21	21	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	822
	0,75	44	2			
	2,25	50	2			
	6,75	58	2			

Análisis de la farmacocinética (PK)

También se evaluó la PK de los ASO. Se picaron y se extrajeron muestras de hígado y riñón mediante protocolos estándar. Las muestras se analizaron en MSD1 con IP-HPLC-MS. Se midió el nivel de tejidos (µg/g) de ISIS 304801 y 647535 de longitud completa y los resultados se proporcionan en la Tabla 23. Tal como se ilustra, las concentraciones en hígado

de los compuestos antisentido de longitud completa totales fueron similares para ambos compuestos antisentido. Por lo tanto, a pesar de que el compuesto antisentido conjugado con **$GalNAc_3$-1** es más activo en el hígado (según se demostró mediante los datos de ARN y proteína que anteceden), no está presente en el hígado a una concentración sustancialmente más alta. En efecto, la EC_{50} calculada (que se proporciona en la Tabla 23) confirma que el aumento observado de la potencia del compuesto conjugado no puede atribuirse por completo al aumento de la acumulación. Este resultado sugiere que el conjugado mejoró la potencia mediante un mecanismo distinto de la acumulación en hígado por sí sola, posiblemente al mejorar la absorción productiva del compuesto antisentido en las células.

Los resultados también muestran que la concentración del compuesto antisentido conjugado con **$GalNAc_3$-1** en el riñón es menor que la del compuesto antisentido sin el conjugado GalNAc. Esto tiene varias implicaciones terapéuticas beneficiosas. Para las indicaciones terapéuticas donde no se busca la actividad en el riñón, la exposición al riñón pone en riesgo la toxicidad del riñón sin un beneficio correspondiente. Además, una alta concentración en el riñón típicamente da como resultado la pérdida del compuesto en la

orina, lo que resulta en una eliminación más rápida. Por consiguiente, no es deseada la acumulación hepática para los objetivos que no son del riñón. Estos datos sugieren que la conjugación con **GalNAc$_3$-1** reduce la acumulación en el riñón.

Tabla 23

Análisis PK del tratamiento con ASO en ratones transgénicos

ASO	Dosis (µmol/kg)	Hígado (µg/g)	Riñón (µg/g)	EC_{50} del hígado (µg/g)	Conjugado 3'	Unión internucleósido /longitud	SEQ ID NO.
ISIS 304801	0,1	5,2	2,1	53	Ninguno	PS/20	821
	0,8	62,8	119,6				
	2,3	142,3	191,5				
	6,8	202,3	337,7				
ISIS 647535	0,1	3,8	0,7	3,8	**GalNAc$_3$-1**	PS/20	822
	0,8	72,7	34,3				
	2,3	106,8	111,4				
	6,8	237,2	179,3				

También se identificaron los metabolitos de ISIS 647535 y se confirmaron sus masas mediante análisis de espectrometría de masas de alta resolución. Se muestran a continuación los sitios de escisión y las estructuras de los metabolitos observados. El % relativo del ASO de longitud completa se calculó mediante procedimientos estándar y los resultados se

presentan en la Tabla 23a. El mayor metabolito de ISIS 647535 fue el ASO de longitud completa carente del conjugado entero (es decir, ISIS 304801), lo que se obtiene como resultado de la escisión en el sitio de escisión A, que se muestra a continuación. Adicionalmente, también se observaron metabolitos adicionales resultantes de otros sitios de escisión. Estos resultados sugieren que puede ser útil también la introducción de otros enlaces escindibles, tales como ésteres, péptidos, disulfuros, fosforamidatos o acilhidrazonas entre el azúcar de **$GalNAc_3$-1** y el ASO, que pueden escindirse mediante enzimas dentro de la célula, que se pueden escindir en el ambiente reductor del citosol o que son lábiles al pH ácido dentro de los endosomas y lisosomas.

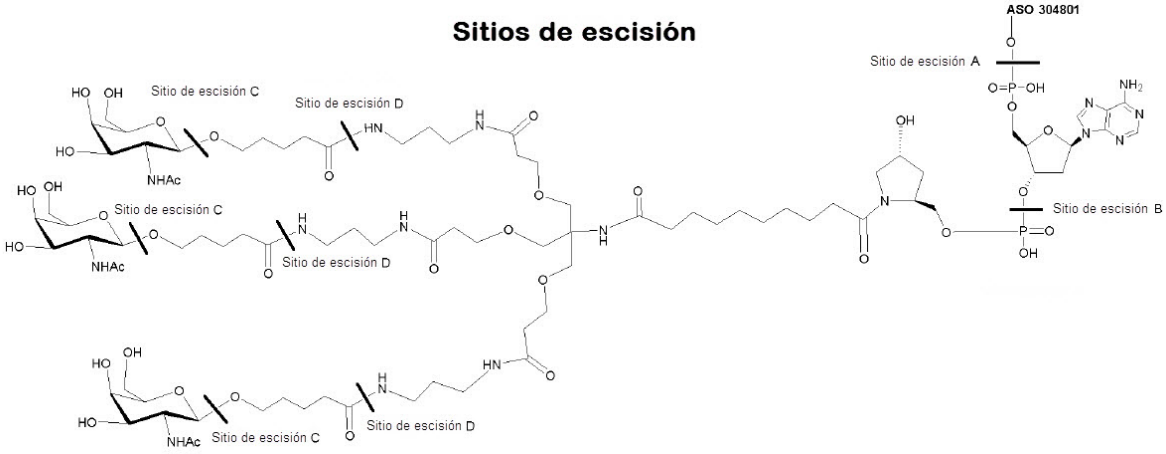
Tabla 23a

Metabolitos de longitud completa de ISIS 647535 observados

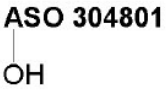
Metabolito	ASO	Sitio de escisión	% relativo
1	ISIS 304801	A	36,1
2	ISIS 304801 + dA	B	10,5
3	ISIS 647535 menos [3 GalNAc]	C	16,1
4	ISIS 647535 menos [3 GalNAc + 1 ligadura de ácido 5-hidroxi-pentanoico]	D	17,6

5	ISIS 647535 menos [2 GalNAc + 2 ligadura de ácido 5-hidroxi-pentanoico]	D	9,9
6	ISIS 647535 menos [3 GalNAc + 3 ligadura de ácido 5-hidroxi-pentanoico]	D	9,8

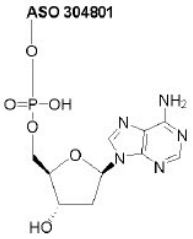
Sitios de escisión

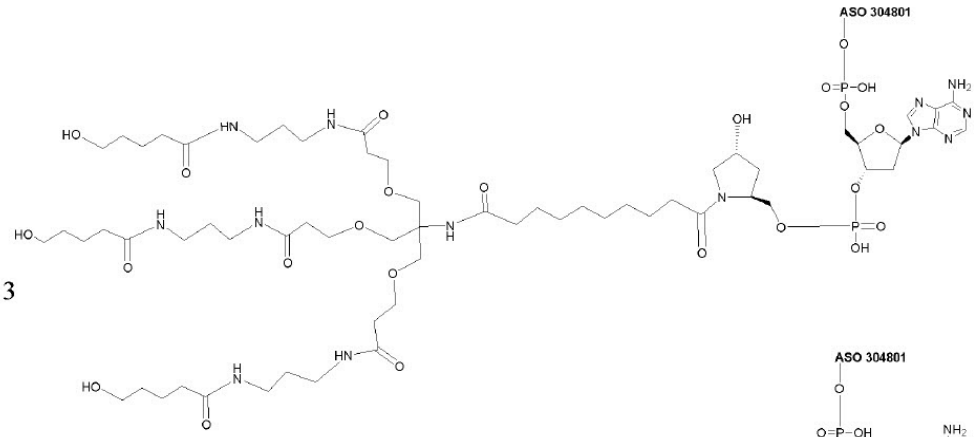


Metabolito 1

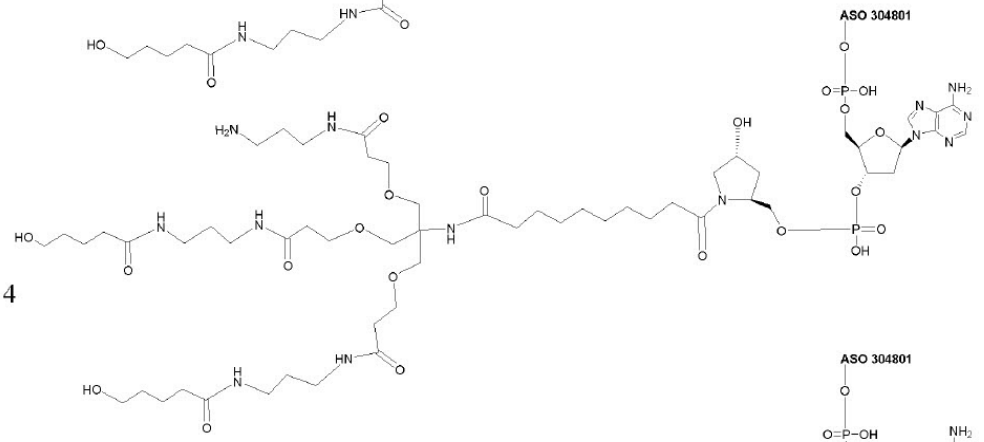


Metabolito 2

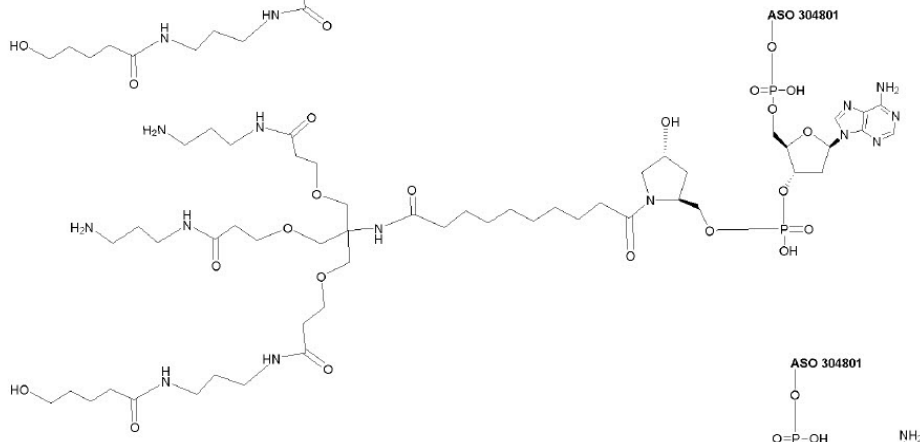




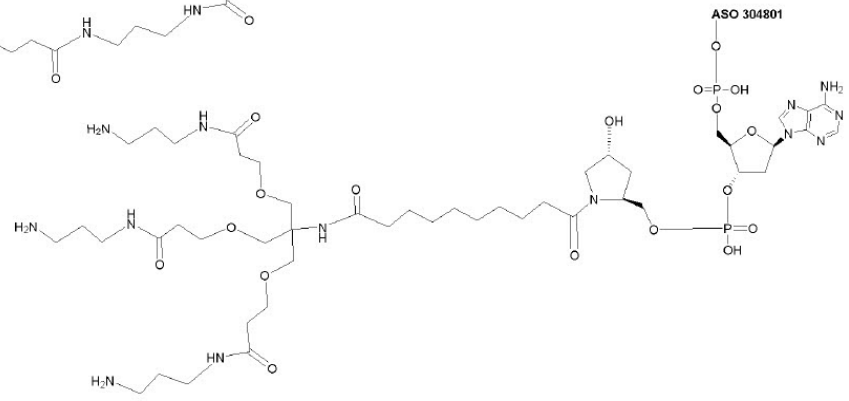
Metabolito 3



Metabolito 4



Metabolito 5



Metabolito 6

Ejemplo 21: Inhibición antisentido de ApoC III humana en ratones transgénicos de ApoC III humana en un estudio de administración única

ISIS 304801, 647535 y 647536, cada una dirigida a la ApoC III humana y descrita en la Tabla 17, se evaluaron adicionalmente en un estudio de administración única en cuanto a su capacidad de inhibir la ApoC III humana en ratones transgénicos de ApoCIII humana.

Tratamiento

Los ratones transgénicos de ApoCIII humana se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y se alimentaron a voluntad con alimento de laboratorio Teklad. Los animales se aclimataron durante al menos 7 días en el centro de investigación antes de comenzar con el experimento. Los ASO se prepararon en PBS y se esterilizaron mediante filtración a través de un filtro de 0,2 micrones. Los ASO se disolvieron en PBS al 0,9 % para la inyección.

Los ratones transgénicos de ApoC III humana fueron inyectados de forma intraperitoneal una única vez a la dosificación que se muestra a continuación con ISIS 304801, 647535 o 647536

(descritos anteriormente) o con un control tratado con PBS. El grupo de tratamiento consistió en 3 animales y el grupo de control consistió en 4 animales. Antes del tratamiento y después de la última dosis, se extrajo sangre de cada ratón y se analizaron muestras de plasma. Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la última administración.

Se recolectaron y analizaron muestras para determinar los niveles de ARNm de ApoC III y proteína en el hígado; se evaluaron los triglicéridos en plasma y colesterol, inclusive fracciones de HDL y LDL, tal como se describe anteriormente (Ejemplo 20). Se presentan los datos de esos análisis en las Tablas 24-28 a continuación. Se midieron los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y transaminasa en hígado, en suero, con relación a ratones inyectados con solución salina, mediante protocolos estándar. Los niveles de ALT y AST mostraron que los compuestos antisentido eran bien tolerados a todas las dosis administradas.

Estos resultados muestran una mejora de la potencia para los compuestos antisentido que comprenden un conjugado **$GalNAc_3$-1** en el extremo 3' (ISIS 647535 y 647536) en comparación con el compuesto antisentido carente de un conjugado **$GalNAc_3$-1** (ISIS

304801). Además, ISIS 647536, que comprende un conjugado **$GalNAc_3$-1** y algunas uniones fosfodiéster, era tan potente como ISIS 647535, que comprende el mismo conjugado y todas las uniones internucleósido dentro del ASO son fosforotioato.

Tabla 24

Efecto del tratamiento con ASO en los niveles de ARNm de ApoC III en ratones transgénicos de ApoC III humana

ASO	Dosis (mg/kg)	% PBS	ED_{50} (mg/kg)	Conjugado 3'	Unión internucleósido /longitud	SEQ ID NO
PBS	0	99	--	--	--	
ISIS 304801	1	104	13,2	Ninguno	PS/20	821
	3	92				
	10	71				
	30	40				
ISIS 647535	0,3	98	1,9	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	822
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 647536	0,3	103	1,7	**$GalNAc_3$-1**	PS/PO/20	822
	1	60				
	3	31				
	10	21				

Tabla 25

Efecto del tratamiento con ASO en los niveles de proteína ApoC III en plasma en ratones transgénicos de ApoC III humana

ASO	Dosis (mg/kg)	% PBS	ED_{50} (mg/kg)	Conjugado 3'	Unión internucleósido /longitud	SEQ ID NO.
PBS	0	99	--	--	--	
ISIS 304801	1	104	23,2	Ninguno	PS/20	821
	3	92				
	10	71				
	30	40				
ISIS 647535	0,3	98	2,1	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	822
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 647536	0,3	103	1,8	**$GalNAc_3$-1**	PS/PO/20	822
	1	60				
	3	31				
	10	21				

Tabla 26

Efecto del tratamiento con ASO en los niveles de triglicéridos en ratones transgénicos

ASO	Dosis (mg/kg)	% PBS	ED_{50} (mg/kg)	Conjugado 3'	Unión internucleósido /longitud	SEQ ID NO.
PBS	0	98	--	--	--	
ISIS 304801	1	80	29,1	Ninguno	PS/20	821
	3	92				
	10	70				
	30	47				
ISIS 647535	0,3	100	2,2	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	822
	1	70				
	3	34				
	10	23				
ISIS 647536	0,3	95	1,9	**$GalNAc_3$-1**	PS/PO/20	822
	1	66				
	3	31				
	10	23				

Tabla 27

Efecto del tratamiento con ASO en los niveles totales de colesterol en ratones transgénicos

ASO	Dosis (mg/kg)	% PBS	Conjugado 3'	Unión internucleósido /longitud	SEQ ID NO.
PBS	0	96	--	--	
ISIS 304801	1	104	Ninguno	PS/20	821
	3	96			
	10	86			
	30	72			
ISIS 647535	0,3	93	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	822
	1	85			
	3	61			
	10	53			
ISIS 647536	0,3	115	**$GalNAc_3$-1**	PS/PO/20	822
	1	79			
	3	51			
	10	54			

Tabla 28

Efecto del tratamiento con ASO en los niveles de colesterol HDL y LDL en ratones transgénicos

ASO	Dosis (mg/kg)	HDL % PBS	LDL % PBS	Conjugado 3'	Unión internucleósido /longitud	SEQ ID NO.
PBS	0	131	90	--	--	
ISIS 304801	1	130	72	Ninguno	PS/20	821
	3	186	79			
	10	226	63			
	30	240	46			
ISIS 647535	0,3	98	86	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	822
	1	214	67			
	3	212	39			
	10	218	35			
ISIS 647536	0,3	143	89	**$GalNAc_3$-1**	PS/PO/20	822
	1	187	56			
	3	213	33			
	10	221	34			

Estos resultados confirman que el conjugado **$GalNAc_3$-1** mejora la potencia de un compuesto antisentido. Los resultados también muestran una igual potencia de un compuesto conjugado antisentido **$GalNAc_3$-1** donde los oligonucleótidos antisentido tienen uniones mixtas (ISIS 647536, que tiene seis uniones fosfodiéster) y una versión fosforotioato completa del mismo

compuesto antisentido (ISIS 647535).

Las uniones fosforotioato proporcionan varias propiedades a los compuestos antisentido. Por ejemplo, resisten la digestión de nucleasas y unen a las proteínas que dan como resultado la acumulación del compuesto en el hígado, en vez de en el riñón/orina. Estas son propiedades deseables, particularmente en el tratamiento de una indicación en el hígado. No obstante, las uniones fosforotioato también se han asociado con una respuesta inflamatoria. Por consiguiente, se espera que la reducción de la cantidad de uniones fosforotioato en un compuesto reduzca el riesgo de inflamación, pero también disminuya la concentración del compuesto en el hígado, aumente la concentración en el riñón y la orina, disminuya la estabilidad en presencia de nucleasas y disminuya la potencia general. Los presentes resultados muestran que un compuesto conjugado antisentido **$GalNAc_3$-1** donde se han reemplazado determinadas uniones fosforotioato con uniones fosfodiéster es tan potente contra un objetivo en el hígado como un equivalente que tiene uniones fosforotioato completas. Se espera que dichos compuestos sean menos proinflamatorios (ver Ejemplo 24 que describe un experimento que muestra la reducción de resultados PS en la reducción de efectos inflamatorios).

Ejemplo 22: Efecto de ASO modificado conjugado con $GalNAc_3$-1 dirigido a SRB-1 *in vivo*

ISIS 440762 y 651900, ambos dirigidos a SRB-1 y descritos en la Tabla 17, fueron evaluados en un estudio dependiente de la dosis en busca de su capacidad de inhibir SRB-1 en ratones Balb/c.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones macho Balb/c de seis semanas (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una única vez con la dosificación que se muestra más adelante con ISIS 440762, 651900 o con control tratado con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones fueron sacrificados 48 horas después de la administración final para determinar los niveles de ARNm de SRB-1 en el hígado mediante PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los niveles de ARNm de SRB-1 se determinaron en comparación con el ARN total (mediante Ribogreen), antes de la normalización con el control tratado con PBS. Los resultados a continuación se presentan como el

porcentaje promedio de los niveles de ARNm de SRB-1 para cada grupo de tratamiento, normalizados con control tratado con PBS y se denotan como "% PBS".

Tal como se ilustra en la Tabla 29, ambos compuestos antisentido disminuyeron los niveles de ARNm de SRB-1. Además, el compuesto antisentido que comprende el conjugado **$GalNAc_3$-1** (ISIS 651900) fue sustancialmente más potente que el compuesto antisentido sin el conjugado **$GalNAc_3$-1** (ISIS 440762). Estos resultados demuestran que el beneficio de potencia de los conjugados **$GalNAc_3$-1** se observa mediante el uso de oligonucleótidos antisentido complementarios a un objetivo distinto y con diferentes nucleósidos modificados químicamente; en esta instancia, los nucleósidos modificados comprenden restos de azúcar de etilo limitado (un resto de azúcar bicíclico).

Tabla 29

Efecto del tratamiento con ASO en los niveles de ARNm de ARB-1 en ratones Balb/c

ASO	Dosis (mg/kg)	% PBS en el hígado	ED_{50} (mg/kg)	Conjugado 3'		Unión internucleósido/longitud	SEQ ID NO.
PBS	0	100		-		--	
ISIS 440762	0,7	85	2,2	Ninguno		PS/14	823
	2	55					
	7	12					
	20	3					
ISIS 651900	0,07	98	0,3	**$GalNAc_3$-1**		PS/14	824
	0,2	63					
	0,7	20					
	2	6					
	7	5					

Ejemplo 23: Protocolo de ensayo de células mononucleares de sangre periférica humana (hPBMC)

El ensayo de hPBMC se realizó con un método de tubos BD Vacutainer CPT. Se obtuvo y recolectó una muestra de sangre entera de donantes voluntarios con consentimiento informado en la clínica US HealthWorks (Faraday y El Camino Real, Carlsbad) en 4-15 tubos BD Vacutainer CPT de 8 ml (VWR Cat.#

BD362753). Se registró el volumen total inicial aproximado de sangre entera en los tubos CPT para cada donante mediante la hoja de datos del ensayo PBMC.

La muestra de sangre se volvió a mezclar inmediatamente antes del centrifugado invirtiendo los tubos 8-10 veces. Los tubos CPT se centrifugaron a t.a. (18-25 °C) en un rotor horizontal (basculante) durante 30 minutos a 1500-1800 RCF sin detenerse (2700 RPM Beckman Allegra 6R). Se recuperaron las células de la interfaz de la capa leucocitaria (entre capas de gel polímero y Ficoll), se transfirieron a un tubo cónico estéril de 50 ml y se recolectaron en 5 tubos CPT/tubos cónicos de 50 ml/donante. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS (Ca^{++}, sin Mg^{++}; GIBCO). Los tubos se completaron hasta 50 ml y se mezclaron invirtiéndolos varias veces. La mezcla se centrifugó a 330 x g durante 15 minutos a t.a. (1215 RPM en Beckman Allegra 6R) y se aspiró la mayor cantidad de sobrenadante posible sin alterar los sedimentos. Los sedimentos celulares se desprendieron mediante un movimiento de rotación suave del tubo y las células resuspendidas en RPMI + 10 % FBS + pen/strep (~1 ml / 10 ml del volumen inicial de sangre entera). Se pipeteó una muestra de 60 µl a un vial de muestras (Beckman Coulter) con 600 µl de reactivo VersaLyse (Beckman Coulter Cat# A09777) y se mezcló en vórtex

suavemente durante 10-15 segundos. Se le permitió a la mezcla incubar durante 10 minutos a t.a. y se mezcló nuevamente antes del conteo. La suspensión celular se contó en un analizador de viabilidad celular Vicell XR (Beckman Coulter) utilizando el tipo celular PBMC (el factor de dilución de 1:11 se almacenó con otros parámetros). Se registró la relación célula viva/ml y la viabilidad. La suspensión celular se diluyó a 1 x 10^7 PBMC vivas/ml en RPMI + FBS al 10 % + pen/strep.

Las células se colocaron a 5 x 10^5 en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos de 50 µl/pocillo (Falcon Microtest). Se agregaron 50 µl/pocillo de concentración 2x de oligos/controles diluidos en RPMI + FBS al 10 % + pen/strep, de acuerdo con el modelo del experimento (total 100 µl/pocillo). Las placas se colocaron en el agitador y se dejaron mezclar durante aproximadamente 1 minuto. Después de incubarse durante 24 horas a 37 °C; CO_2 al 5 %, las placas se centrifugaron a 400 x g durante 10 minutos antes de quitar el sobrenadante para el ensayo de citocina MSD (es decir, IL-6, IL-10, IL-8 y MCP-1 humana).

Ejemplo 24: Evaluación de efectos proinflamatorios en el ensayo hPBMC para ASO conjugados con $GalNAc_3$-1

Los oligonucleótidos antisentido (ASO) enumerados en la Tabla 30 se evaluaron en búsqueda de un efecto proinflamatorio en un ensayo hPBMC utilizando el protocolo descrito en el Ejemplo 23. ISIS 353512 es un estándar interno de respuesta alta para la liberación de IL-6 en el ensayo. Se aislaron las hPBMC de los donantes voluntarios y se trataron con ASO a concentraciones de 0, 0,0128, 0,064, 0,32, 1,6, 8, 40 y 200 µM. Luego de un tratamiento de 24 horas, se midieron los niveles de citocina.

Los niveles de IL-6 se utilizaron como lectura primaria. Se calcularon los valores EC_{50} y E_{max} mediante procedimientos estándar. Los resultados se expresan como la relación promedio de E_{max}/EC_{50} de dos donantes y se denotan como "E_{max}/EC_{50}". La relación inferior indica una disminución relativa de la respuesta proinflamatoria y la relación superior indica un aumento relativo de la respuesta proinflamatoria.

Con relación a los compuestos de la prueba, el compuesto menos proinflamatorio fue el ASO unido con PS/PO (ISIS

616468). El ASO conjugado con **GalNAc$_3$-1,** ISIS 647535 fue ligeramente menos proinflamatorio que su equivalente no conjugado ISIS 304801. Estos resultados indican que la incorporación de algunas uniones PO reducen la reacción proinflamatoria y la adición de un conjugado **GalNAc$_3$-1** no hace a un compuesto más proinflamatorio y puede reducir la respuesta proinflamatoria. Por consiguiente, se esperaría que un compuesto antisentido que comprende ambas uniones PS/PO mixtas y un conjugado **GalNAc$_3$-1** produjera respuestas proinflamatorias inferiores con relación a un compuesto antisentido unido a una PS completa, con o sin un conjugado **GalNAc$_3$-1.** Estos resultados muestran que los compuestos antisentido conjugados con **GalNAc$_3$-1,** particularmente los que tienen un contenido de PS reducido, son menos proinflamatorios.

En conjunto, estos resultados sugieren que un compuesto conjugado con **GalNAc$_3$-1,** particularmente uno con un contenido de PS reducido, puede administrarse a una dosis mayor que un compuesto antisentido equivalente con PS completa carente de un conjugado **GalNAc$_3$-1.** Dado que no se espera que la semivida sea sustancialmente diferente para estos compuestos, dicha administración mayor daría como resultado una dosificación menos frecuente. En efecto, dicha administración podría ser

incluso menos frecuente, dado que los compuestos conjugados con **$GalNAc_3$-1** son más potentes (ver Ejemplos 20-22) y es necesaria una nueva dosificación una vez que la concentración de un compuesto haya disminuido por debajo de un nivel deseado, donde dicho nivel deseado está basado en la potencia.

Tabla 30

ASO modificados

ASO	Secuencia (5' a 3')	Objetivo	SEQ ID NO.
ISIS 104838	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	TNFα	825
ISIS 353512	$T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}G_{es}G_{e}$	CRP	826
ISIS 304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}\ T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	ApoC III	821
ISIS 647535	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$**-GalNAc$_3-1_a$**	ApoC III	822
ISIS 616468	$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{e}$	ApoC III	821

Subíndices: "e" indica un nucleósido modificado en 2'-MOE; "d" indica β-D-2'-desoxirribonucleósido; "k" indica el nucleósido bicíclico 6'-*(S)*-CH_3 (por ejemplo, cEt); "s" indica uniones internucleósido fosforotioato (PS); "o" indica

uniones internucleósido fosfodiéster (PO) y "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. El superíndice "m" indica 5-metilcitosinas. "**$A_{do'}$-$GalNAc_3$-1_a**" indica un conjugado con la estructura **$GalNAc_3$-1** mostrada en el Ejemplo 9 unida al extremo 3'del oligonucleótido antisentido, tal como se indica.

Tabla 31

Efecto proinflamatorio de ASO dirigidos a ApoC III en ensayo de hPBMC

ASO	EC_{50} (μM)	E_{max} (μM)	E_{max}/EC_{50}	Conjugado 3'	Unión internucleósido/longitud	SEQ ID NO.
ISIS 353512 (de respuesta alta)	0,01	265,9	26.590	Ninguno	PS/20	826
ISIS 304801	0,07	106,55	1.522	Ninguno	PS/20	821
ISIS 647535	0,12	138	1.150	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	822
ISIS 616468	0,32	71,52	224	Ninguno	PS/PO/20	821

Ejemplo 25: Efecto de ASO modificado conjugado con $GalNAc_3$-1 dirigido a ApoC III humana *in vitro*

ISIS 304801 y 647535 descritos anteriormente se evaluaron *in*

vitro. Se trataron hepatocitos primarios de ratones transgénicos a una densidad de 25.000 células por pocillo con concentraciones de 0,03, 0,08, 0,24, 0,74, 2,22, 6,67 y 20 µM de oligonucleótidos modificados. Después del período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm mediante PCR cuantitativa en tiempo real y los niveles de ARNm de hApoC III se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según se midió mediante RIBOGREEN.

Se calculó la IC_{50} usando los métodos estándar y los resultados se presentan en la Tabla 32. Según se ilustra, se observó una potencia similar en las células tratadas con ISIS 647535 en comparación con el control, ISIS 304801.

Tabla 32

ASO modificado dirigido a ApoC III humana en hepatocitos primarios

ASO	IC_{50} (µM)	Conjugado 3'	Unión internucleósido/ longitud	SEQ ID NO.
ISIS 304801	0,44	Ninguno	PS/20	821
ISIS 647535	0,31	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	822

En este experimento, los beneficios de potencia elevada de la conjugación con **GalNAc$_3$-1** que se observaron *in vivo* no se observaron *in vitro*. Los experimentos de absorción libre subsiguientes en hepatocitos primarios *in vitro* mostraron un aumento en la potencia de oligonucleótidos que comprenden varios conjugados de GalNAc en comparación con los oligonucleótidos que carecían del conjugado de GalNAc (ver los Ejemplos 60, 82 y 92)

Ejemplo 26: Efecto de uniones PO/PS en la actividad de ASO de ApoC III

Se les inyectó una vez a ratones transgénicos de ApoC III por vía intraperitoneal 25 mg/kg de ISIS 304801, o ISIS 616468 (ambos descritos anteriormente) o con control tratado con PBS una vez por semana durante dos semanas. El grupo de tratamiento consistió en 3 animales y el grupo de control consistió en 4 animales. Antes del tratamiento y después de la última dosis, se extrajo sangre de cada ratón y se analizaron muestras de plasma. Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la última administración.

Se recogieron muestras y se analizaron para determinar el nivel de proteína ApoC III en el hígado como se describió

anteriormente (Ejemplo 20). Se presentan los datos de esos análisis en la Tabla 33 a continuación.

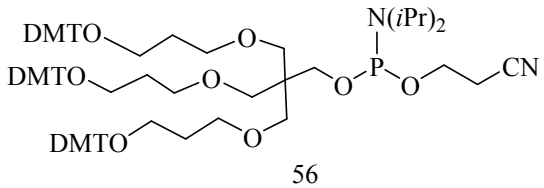
Estos resultados muestran una reducción en la potencia para los compuestos antisentido con PO/PS (ISIS 616468) en las alas en comparación con PS completo (ISIS 304801).

Tabla 33

Efecto del tratamiento con ASO en los niveles de proteína ApoC III en ratones transgénicos de ApoC III humana

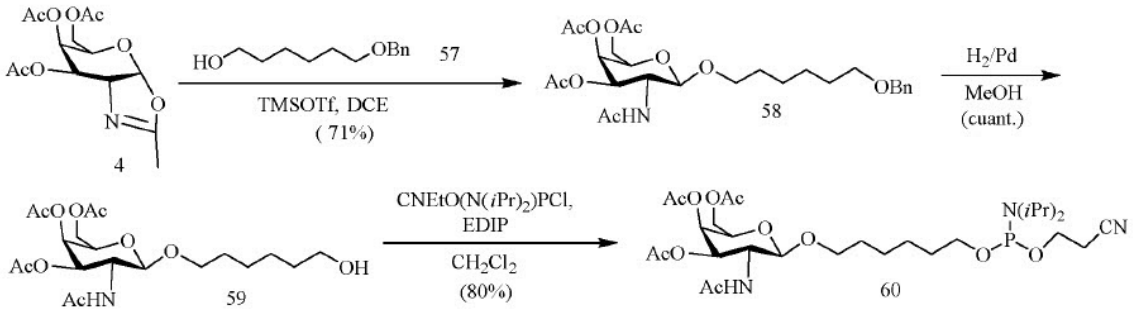
ASO	Dosis (mg/kg)	% PBS	Conjugado 3'	Unión internucleósido/longitud	SEQ ID NO.
PBS	0	99	--	--	
ISIS 304801	25 mg/kg/semana durante 2 semanas	24	Ninguno	PS completo	821
ISIS 616468	25 mg/kg/semana durante 2 semanas	40	Ninguno	14 PS/6 PO	821

Ejemplo 27: Compuesto 56



El compuesto 56 está disponible comercialmente de Glen Research o puede prepararse de acuerdo con los procedimientos publicados por Shchepinov et ál., *Nucleic Acids Research*, 1997, *25(22)*, 4447-4454.

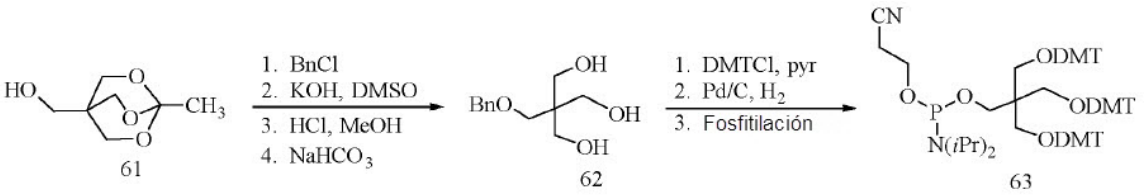
Ejemplo 28: Preparación del Compuesto 60



El Compuesto 4 se preparó según los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 2. El Compuesto 57 está disponible en el mercado. El compuesto 60 se confirmó mediante análisis estructural.

Se pretende que el compuesto 57 sea representativo y no se pretende que sea taxativo, dado que otros alquil dioles sustituidos o no sustituidos monoprotegidos, incluidos, de modo no taxativo, los representados en la presente memoria descriptiva pueden usarse para preparar fosforamiditas que tengan una composición predeterminada.

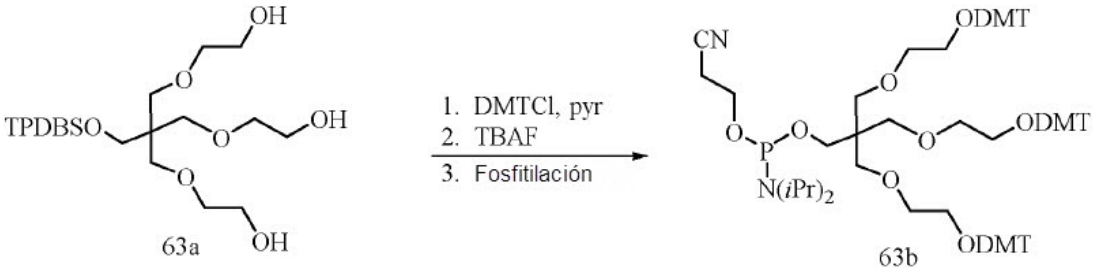
Ejemplo 29: Preparación del Compuesto 63



Los compuestos 61 y 62 se prepararon usando procedimientos similares a los informados por Tober et ál., *Eur. J. Org. Chem.*, 2013, *3*, 566-577; y Jiang et ál., *Tetrahedron*, 2007, *63(19)*, 3982-3988.

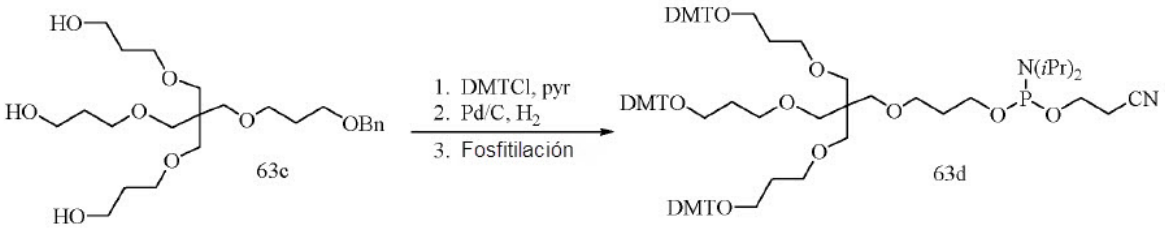
De manera alternativa, el compuesto 63 se preparó usando procedimientos similares a los informados por Kim et ál., *Synlett*, 2003, *12*, 1838-1840; y Kim et ál., solicitud internacional PCT publicada, WO 2004063208.

Ejemplo 30: Preparación del Compuesto 63b



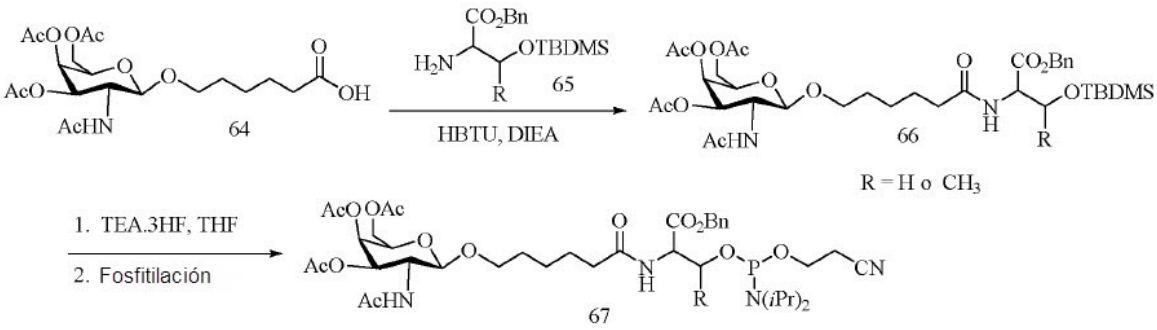
El compuesto 63a se preparó usando procedimientos similares a los informados por Hanessian et ál., *Canadian Journal of Chemistry*, 1996, *74(9)*, 1731-1737.

Ejemplo 31: Preparación del Compuesto 63d



El compuesto 63c se preparó usando procedimientos similares a los informados por Chen et ál., *Chinese Chemical Letters*, 1998, *9(5)*, 451-453.

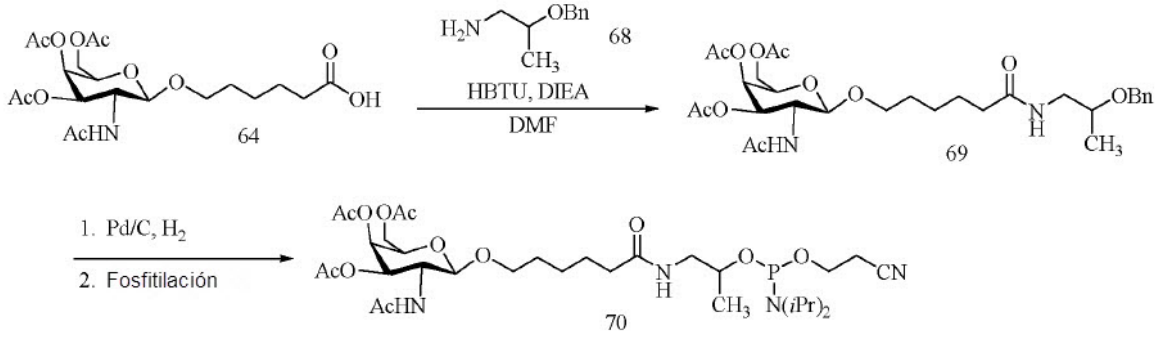
Ejemplo 32: Preparación del Compuesto 67



El Compuesto 64 se preparó según los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 2. El compuesto 65 se preparó usando procedimientos similares a los informados por Or et ál., solicitud internacional PCT publicada, WO 2009003009. Se pretende que los grupos protectores usados para el compuesto 65 sean representativos y no se pretende que sean taxativos,

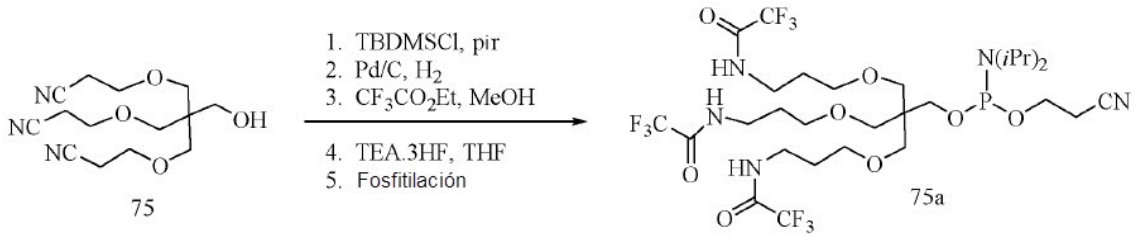
ya que pueden usarse otros grupos protectores, incluidos, de modo no taxativo, los presentados en la presente memoria descriptiva.

Ejemplo 33: Preparación del Compuesto 70



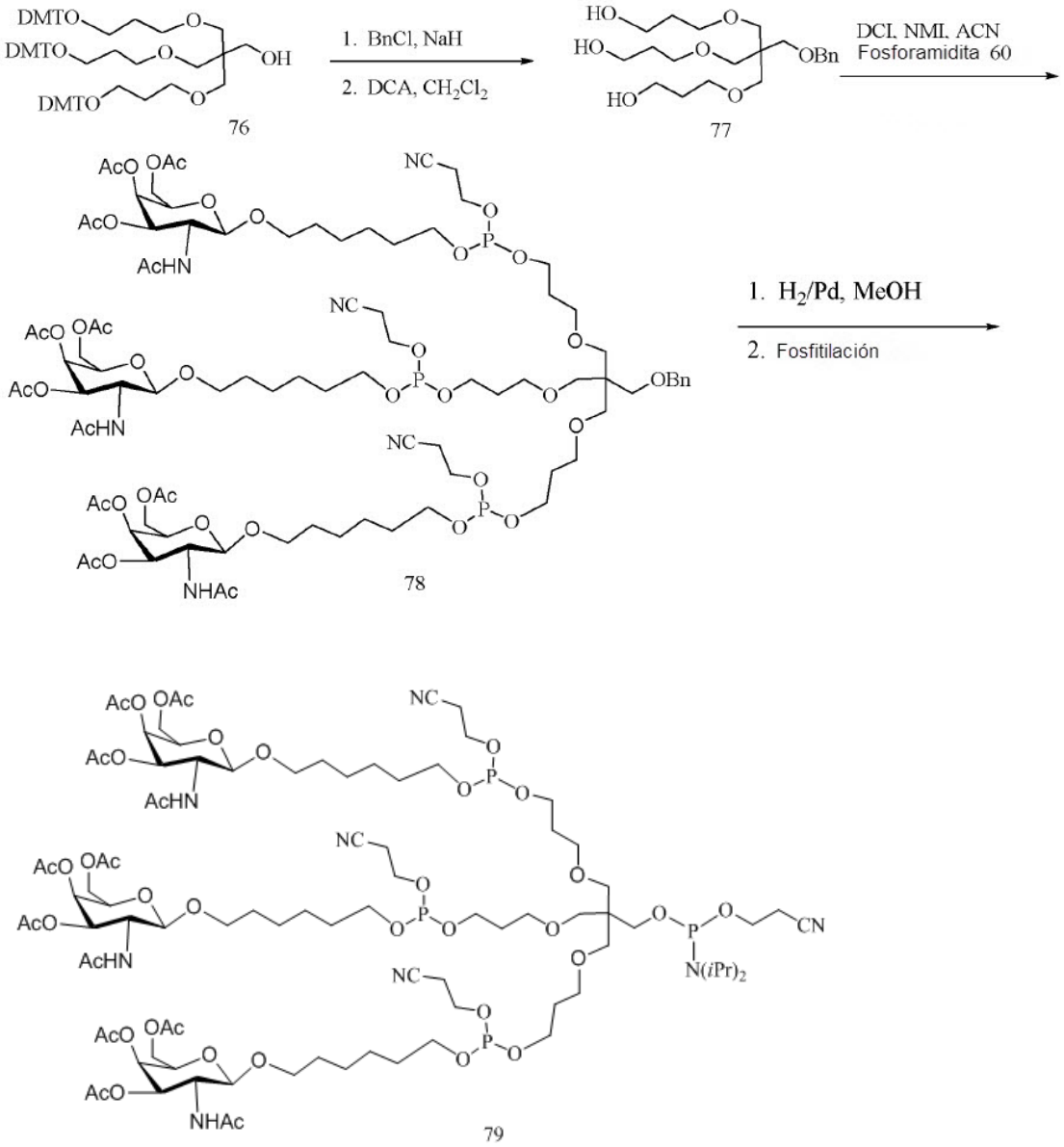
El Compuesto 64 se preparó según los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 2. El Compuesto 68 está disponible en el mercado. Se pretende que el grupo protector usado para el compuesto 68 sea representativo y no se pretende que sea taxativo, ya que pueden usarse otros grupos protectores, incluidos, de modo no taxativo, los presentados en la presente memoria descriptiva.

Ejemplo 34: Preparación del Compuesto 75a



El compuesto 75 se preparó de acuerdo con los procedimientos publicados por Shchepinov et ál., *Nucleic Acids Research*, 1997, *25(22)*, 4447-4454.

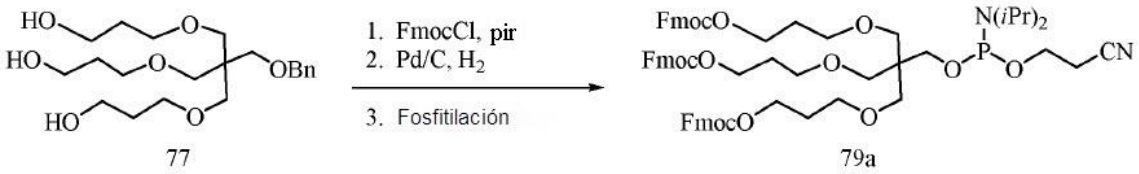
Ejemplo 35: Preparación del Compuesto 79



El compuesto 76 se preparó de acuerdo con los procedimientos

publicados por Shchepinov et ál., *Nucleic Acids Research*, 1997, *25(22)*, 4447-4454.

Ejemplo 36: Preparación del Compuesto 79[a]

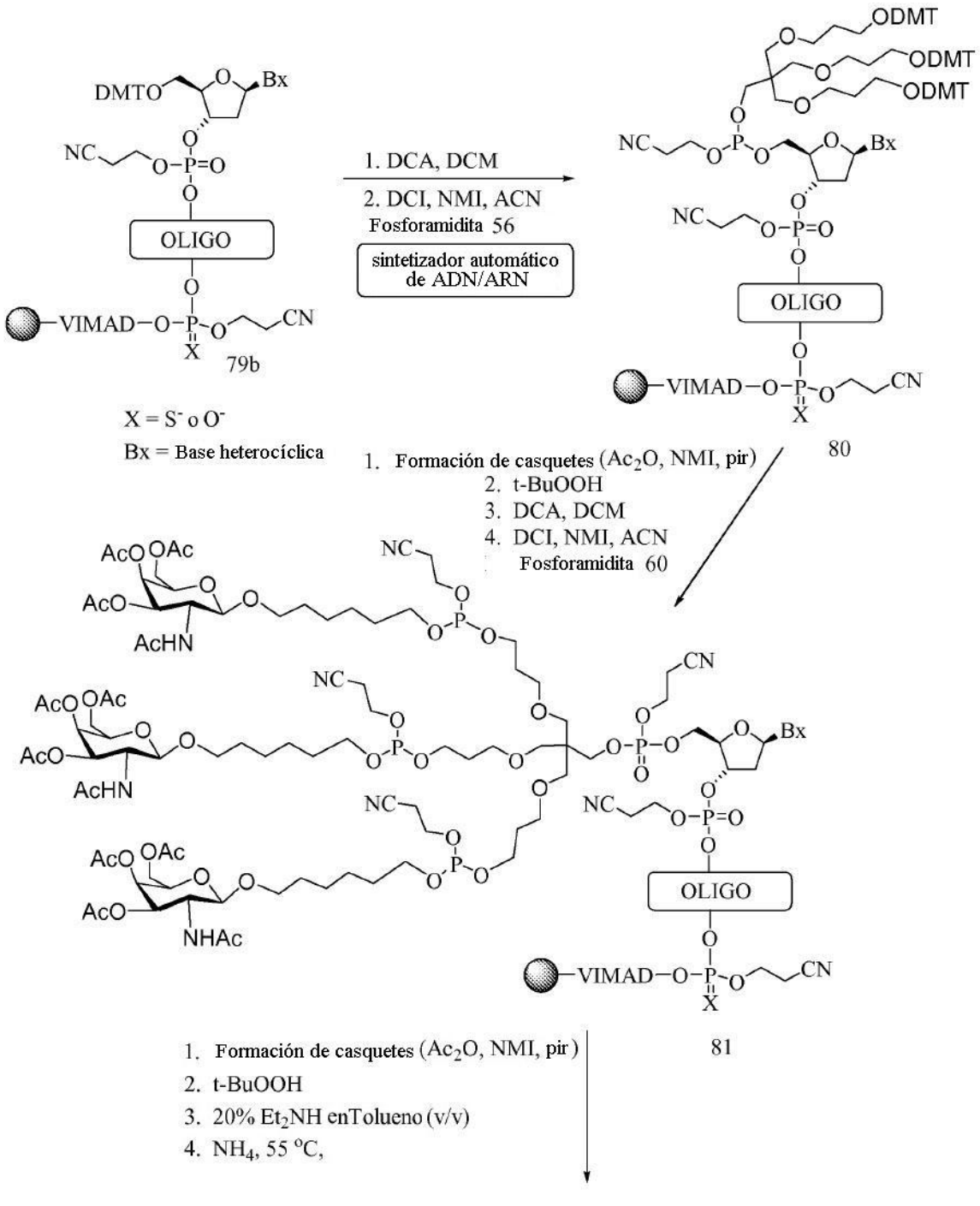


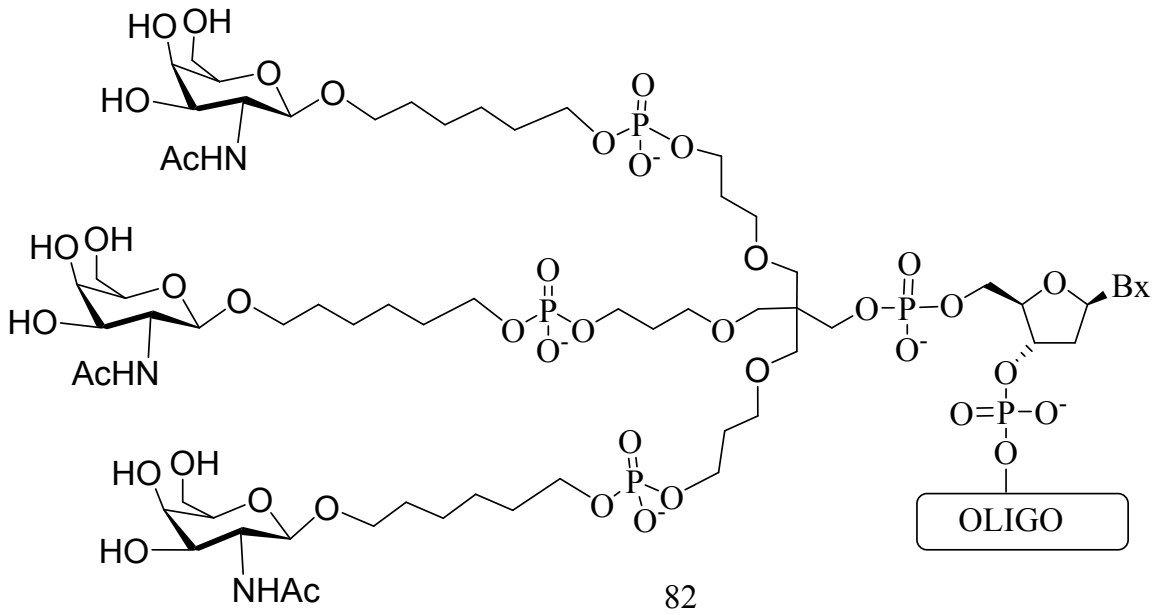
77 79a

547

El Compuesto 77 se preparó según los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 35.

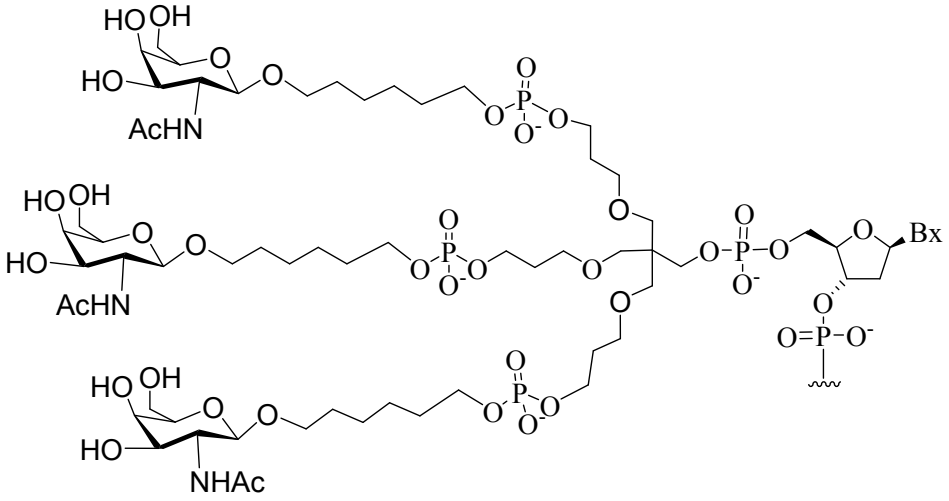
Ejemplo 37: Método general para la preparación del compuesto oligomérico conjugado 82 que comprende $GalNAc_3$-2 conjugado unido a fosfodiéster en el extremo 5′ por medio de un soporte sólido (Método I)


DMTO
Bx
NC
OLIGO
VIMAD
CN
79b
X = S⁻ o O⁻
Bx = Base heterocíclica
1. DCA, DCM
2. DCI, NMI, ACN
Fosforamidita 56
sintetizador automático de ADN/ARN
ODMT
80
1. Formación de casquetes (Ac2O, NMI, pir)
2. t-BuOOH
3. DCA, DCM
4. DCI, NMI, ACN
Fosforamidita 60
AcO
OAc
AcHN
NHAc
81
1. Formación de casquetes (Ac2O, NMI, pir)
2. t-BuOOH
3. 20% Et2NH enTolueno (v/v)
4. NH4, 55 °C,

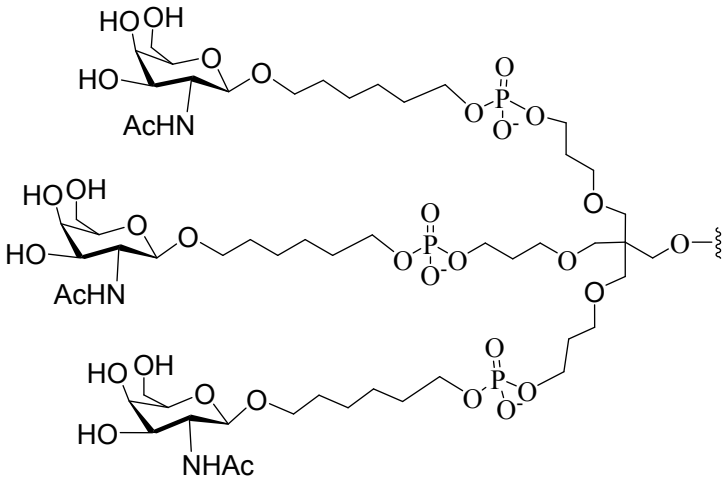


82

donde $GalNAc_3$-2 tiene la estructura:

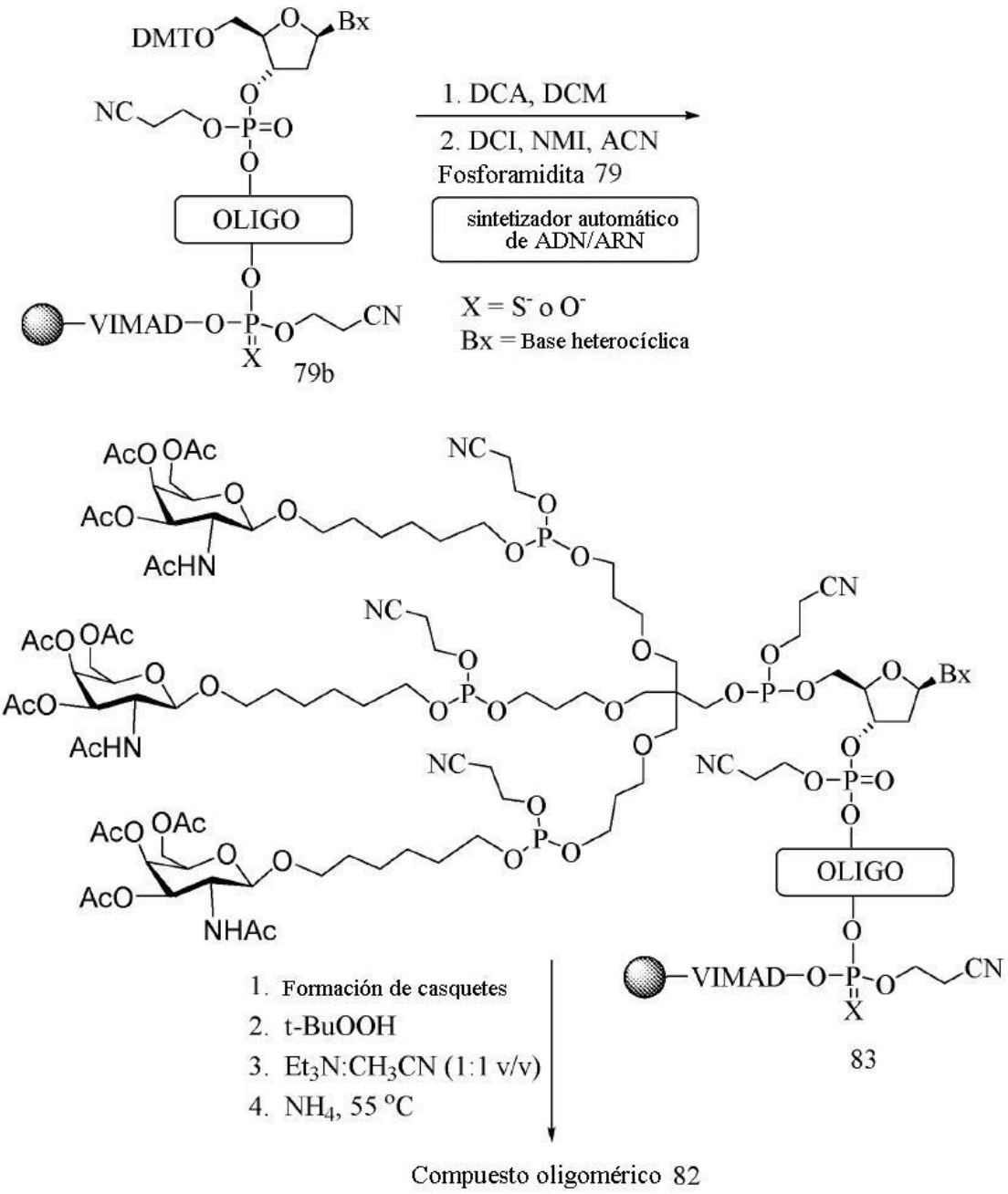


La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-2 ($GalNAc_3$-2_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. Donde GalNAc3-2_a tiene la fórmula:



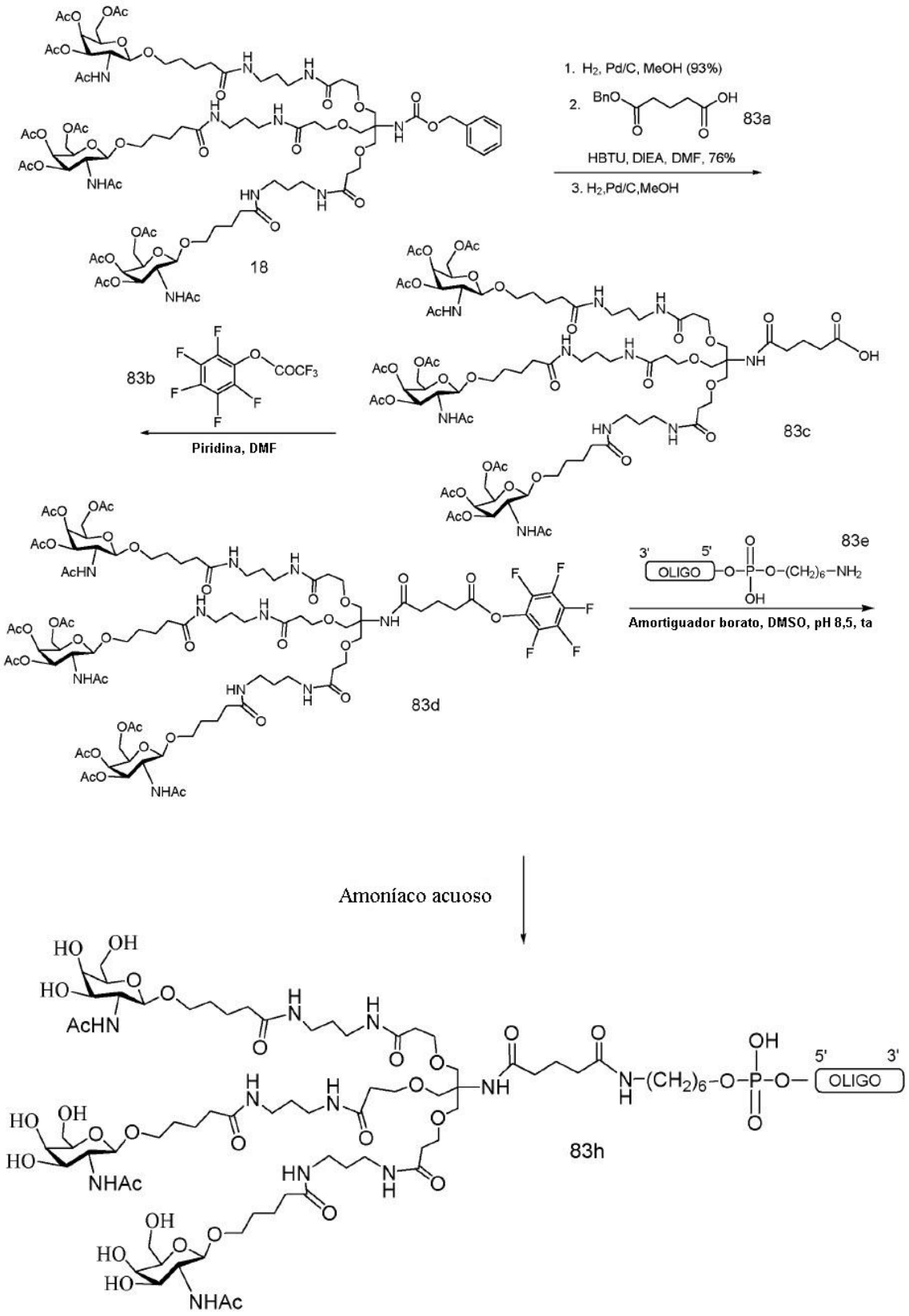
El compuesto oligomérico 79b unido a VIMAD se preparó usando procedimientos estándar para la síntesis automática de ADN/ARN (ver Dupouy et ál., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, *45*, 3623-3627). Los Compuestos 56 y 60 de fosforamidita se prepararon según los procedimientos ilustrados en los Ejemplos 27 y 28, respectivamente. Se pretende que las fosforamiditas ilustradas sean representativas y no se pretende que sean taxativas, ya que pueden utilizarse otros bloques de construcción de fosforamidita, incluidos, de modo no taxativo, los presentados en la presente memoria descriptiva, para preparar un compuesto oligomérico que tenga un grupo conjugado unido a fosfodiéster en el extremo 5'. El orden y la cantidad de fosforamiditas agregadas al soporte sólido puede ajustarse para preparar los compuestos oligoméricos tal como se describe en la presente que tengan una secuencia y composición predeterminadas.

Ejemplo 38: Método alternativo para la preparación del compuesto oligomérico 82 que comprende $GalNAc_3$-2 conjugado unido a fosfodiéster en el extremo 5' (Método II)



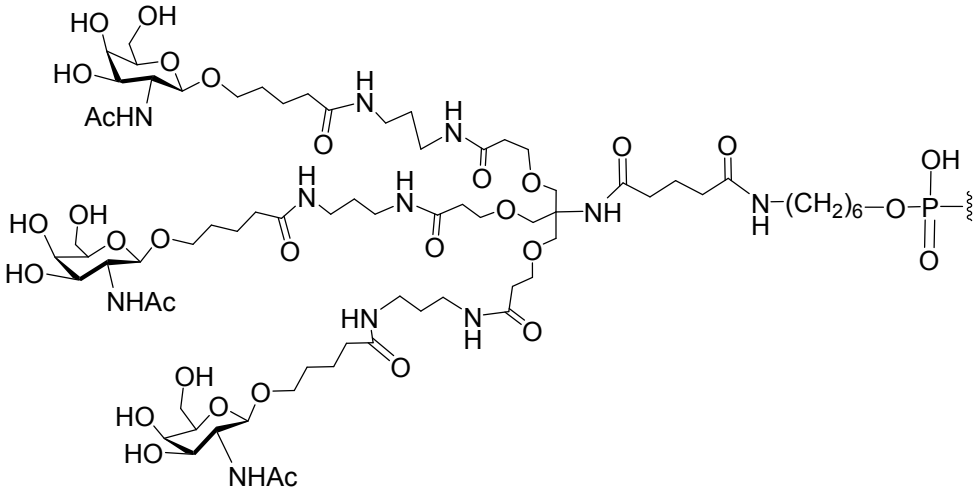
El compuesto oligomérico 79b unido a VIMAD se preparó usando procedimientos estándar para la síntesis automática de ADN/ARN (ver Dupouy et ál., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, *45*, 3623-3627). La fosforamidita de conglomerado $GalNAc_3$-2, Compuesto 79, se preparó según el procedimiento ilustrado en el Ejemplo 35. Este método alternativo permite una instalación en un paso del $GalNAc_3$-2 conjugado unido a fosfodiéster al compuesto oligomérico en la etapa final de la síntesis. Se pretende que las fosforamiditas ilustradas sean representativas y no se pretende que sean taxativas, ya que pueden utilizarse otros bloques de construcción de fosforamidita, incluidos, de modo no taxativo, los presentados en la presente memoria descriptiva, para preparar compuestos oligoméricos que tengan un fosfodiéster conjugado en el extremo 5′. El orden y la cantidad de fosforamiditas agregadas al soporte sólido puede ajustarse para preparar los compuestos oligoméricos tal como se describe en la presente que tengan una secuencia y composición predeterminadas.

Ejemplo 39: Método general para la preparación del compuesto oligomérico 83h que comprende un $GalNAc_3$-3 conjugado en el extremo 5′ ($GalNAc_3$-1 modificado para el acoplamiento en el extremo 5') por un soporte sólido


1. H2, Pd/C, MeOH (93%)
2.
83a
HBTU, DIEA, DMF, 76%
3. H2,Pd/C,MeOH
18
83b
Piridina, DMF
83c
83d
83e
Amortiguador borato, DMSO, pH 8,5, ta
Amoníaco acuoso
83h

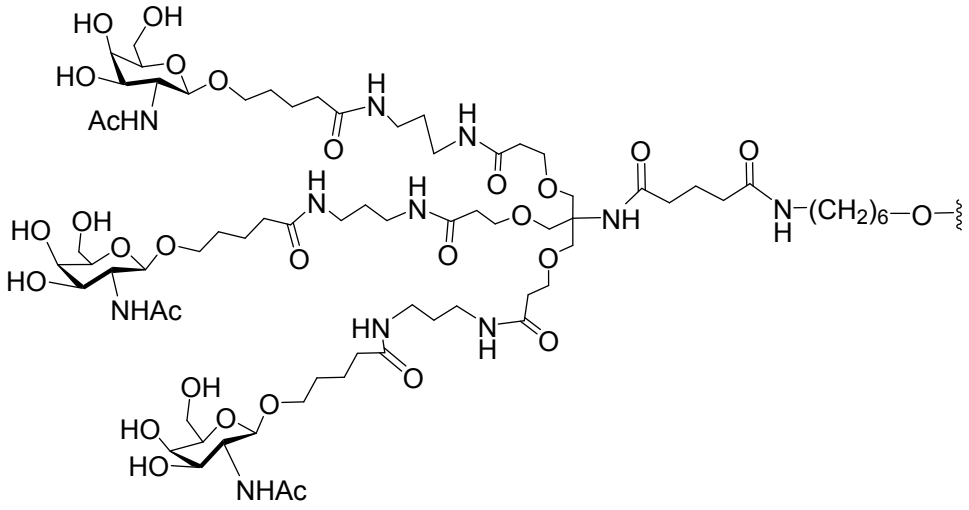
El Compuesto 18 se preparó según los procedimientos ilustrados en el Ejemplo 4. Los Compuestos 83a y 83b están disponibles en el mercado. El Compuesto oligomérico 83e que comprende una hexilamina unida a fosfodiéster se preparó mediante procedimientos estándar de síntesis de oligonucleótidos. El tratamiento del compuesto oligomérico protegido con amoníaco acuoso proporcionó el compuesto oligomérico conjugado 5'-$GalNAc_3$-3 (83h).

Donde $GalNAc_3$-3 tiene la estructura:

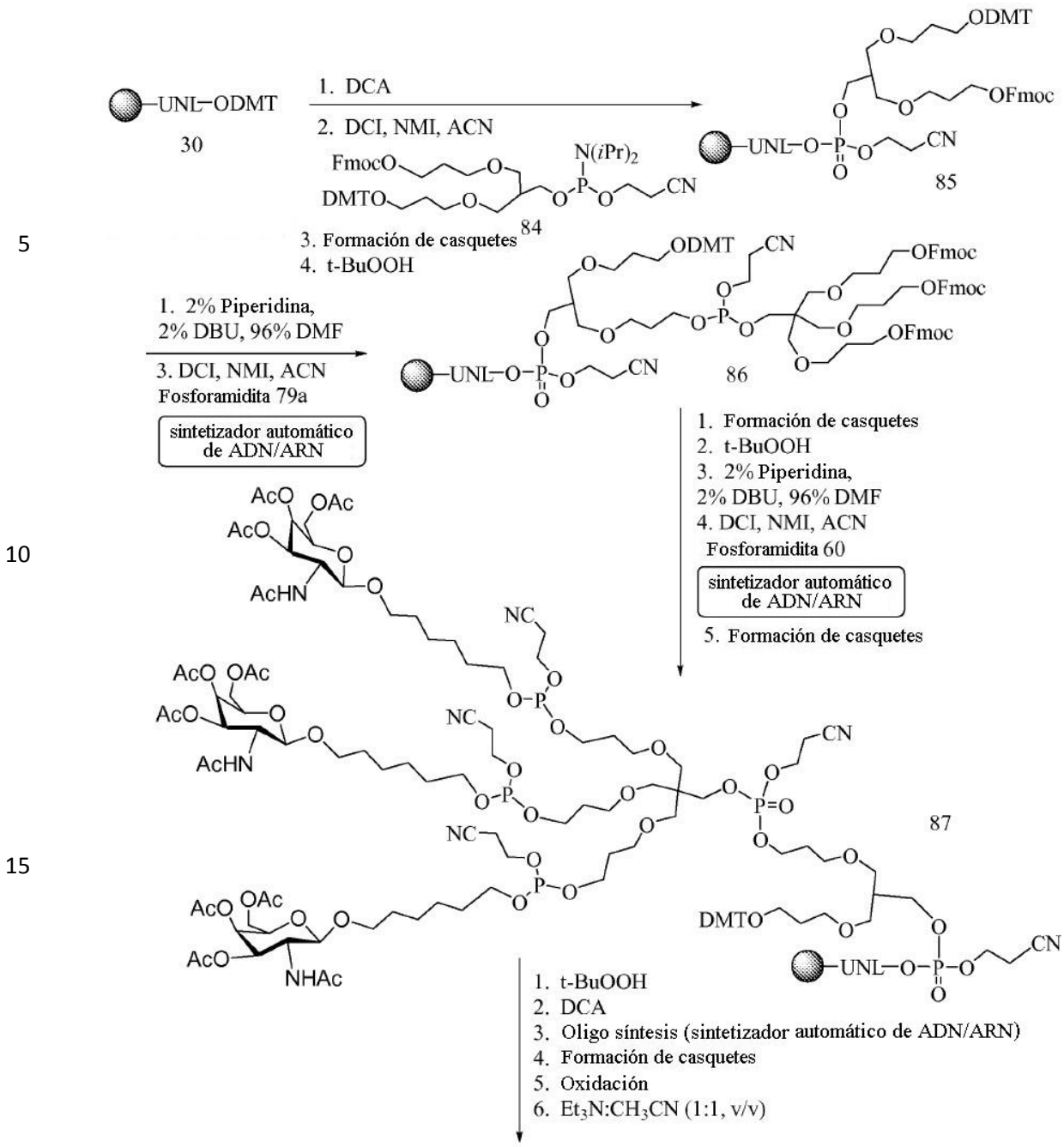


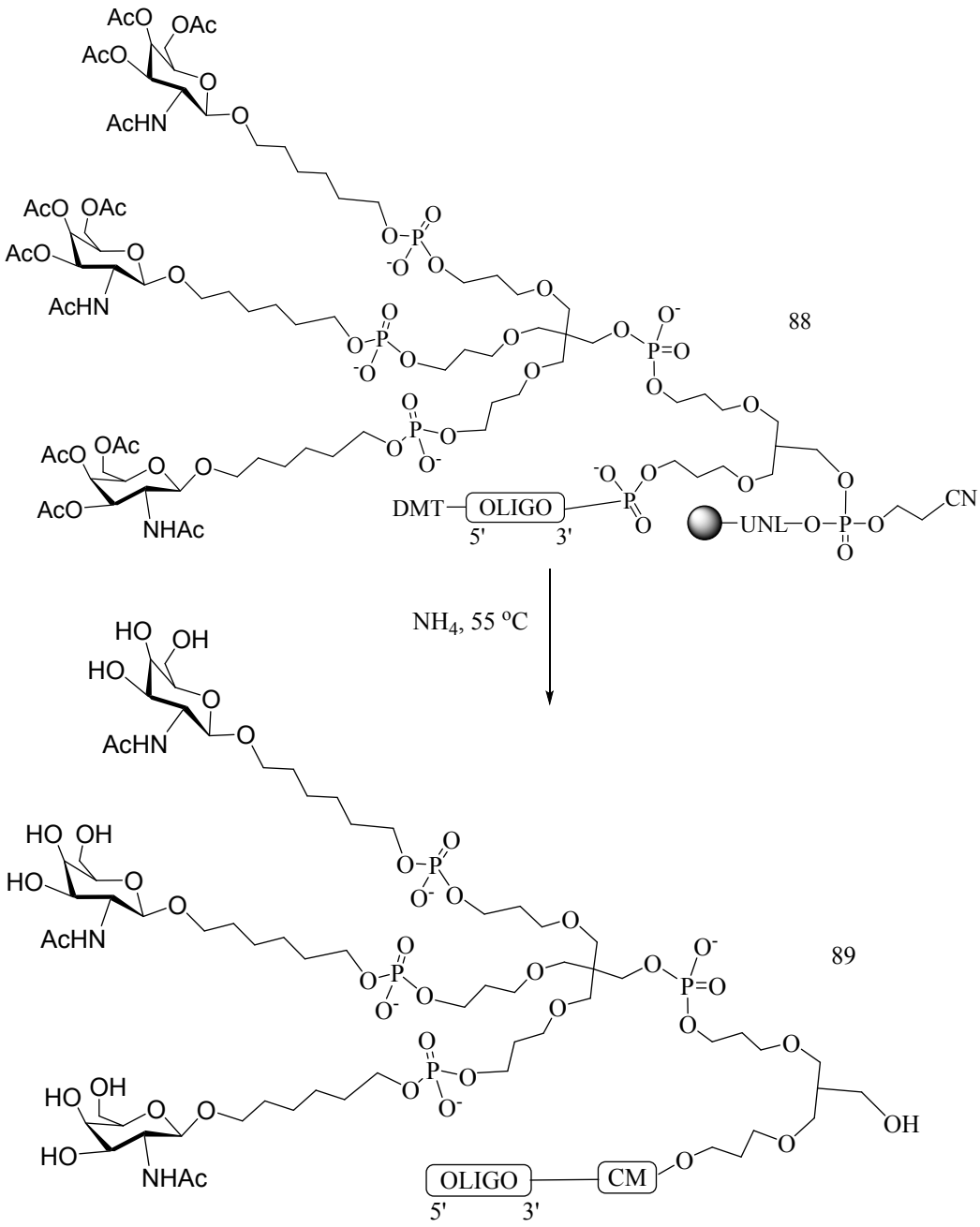
.

La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-3 ($GalNAc_3$-3_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. Donde $GalNAc_3$-3_a tiene la fórmula:

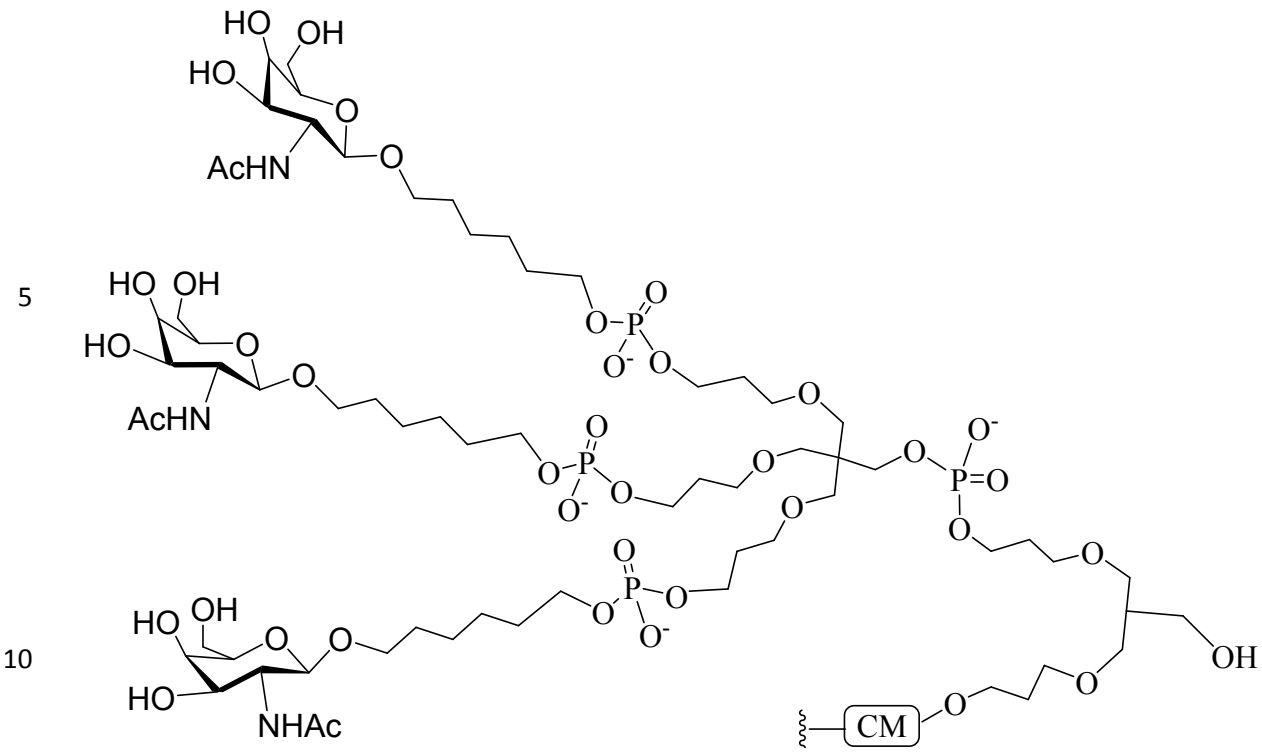


Ejemplo 40: Método general para la preparación del compuesto oligomérico 89 que comprende $GalNAc_3$-4 conjugado unido a fosfodiéster en el extremo 3' por medio de un soporte sólido

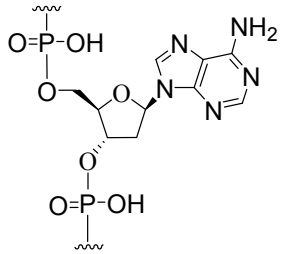

UNL–ODMT
30
1. DCA
2. DCI, NMI, ACN
FmocO
DMTO
N(iPr)2
CN
84
3. Formación de casquetes
4. t-BuOOH
ODMT
OFmoc
UNL–O–P–O–CN
85
1. 2% Piperidina,
2% DBU, 96% DMF
3. DCI, NMI, ACN
Fosforamidita 79a
sintetizador automático de ADN/ARN
86
1. Formación de casquetes
2. t-BuOOH
3. 2% Piperidina,
2% DBU, 96% DMF
4. DCI, NMI, ACN
Fosforamidita 60
sintetizador automático de ADN/ARN
5. Formación de casquetes
AcO
OAc
AcHN
NC
P=O
87
NHAc
1. t-BuOOH
2. DCA
3. Oligo síntesis (sintetizador automático de ADN/ARN)
4. Formación de casquetes
5. Oxidación
6. Et3N:CH3CN (1:1, v/v)



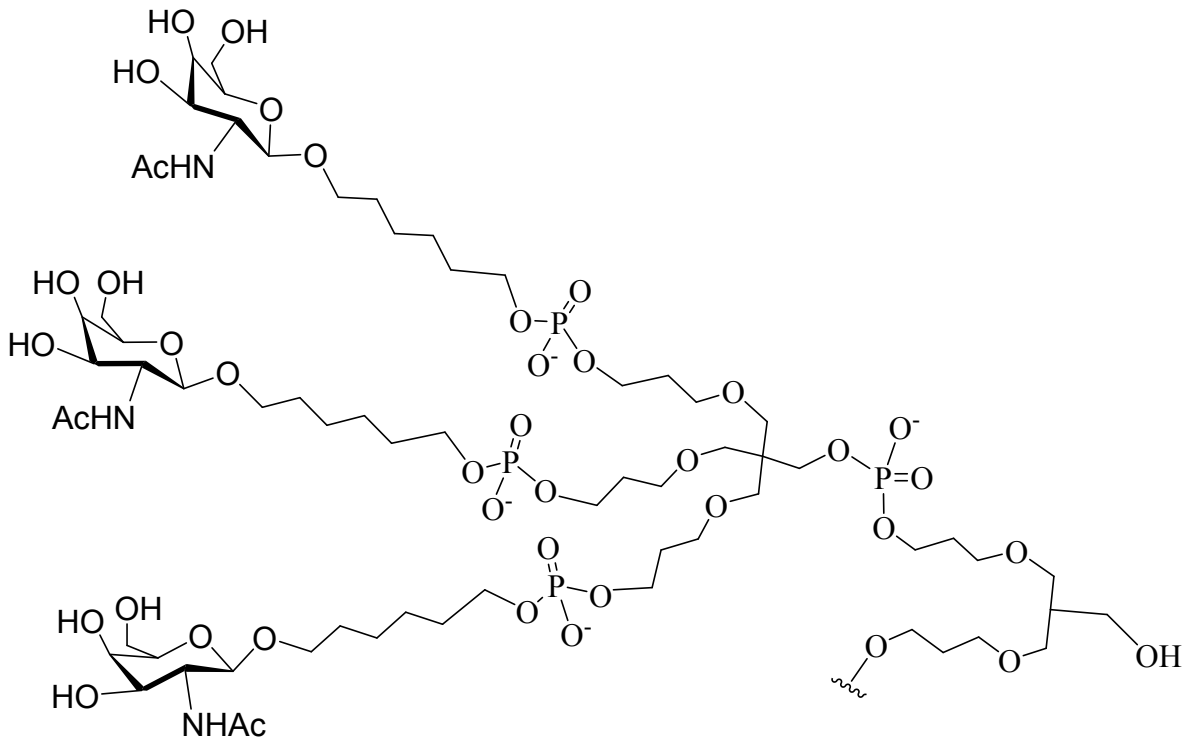
Donde $GalNAc_3$-4 tiene la estructura:



Donde CM es un resto escindible. En determinadas modalidades, el resto escindible es:



La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-4 ($GalNAc_3$-4_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. Donde $GalNAc_3$-4a tiene la fórmula:



El compuesto 30 de soporte sólido funcionalizado Unyliner protegido está disponible en el comercio. El compuesto 84 se preparó usando procedimientos similares a los informados en la bibliografía (ver Shchepinov et ál., *Nucleic Acids Research,* 1997, *25(22)*, 4447-4454; Shchepinov et ál., *Nucleic Acids Research,* 1999, *27*, 3035-3041; y Hornet et ál., *Nucleic Acids Research,* 1997, *25*, 4842-4849).

Los bloques de construcción de fosforamidita, los Compuestos 60 y 79a se prepararon según los procedimientos ilustrados en los Ejemplos 28 y 36. Se pretende que las fosforamiditas ilustradas sean representativas y no taxativas, dado que

pueden utilizarse otros bloques de construcción de fosforamidita para preparar un compuesto oligomérico que tiene un conjugado unido a fosfodiéster en el extremo 3′ con una composición y secuencia predeterminadas. El orden y la cantidad de fosforamiditas agregadas al soporte sólido puede ajustarse para preparar los compuestos oligoméricos tal como se describe en la presente que tengan una secuencia y composición predeterminadas.

Ejemplo 41: Método general para la preparación de ASO que comprende $GalNAc_3$-2 conjugado unido a fosfodiéster (ver el Ejemplo 37, Bx es adenina) en la posición 5′ por medio de técnicas de fase sólida (preparación de ISIS 661134)

A menos que se establezca lo contrario, todos los reactivos y soluciones utilizados para la síntesis de compuestos oligoméricos se adquirieron de fuentes comerciales. Se utilizaron soportes sólidos y bloques de construcción de fosforamidita estándar para la incorporación de residuos de nucleósidos que incluyen, por ejemplo, residuos T, A, G y ^{m}C. Se usaron los compuestos 56 y 60 de fosforamidita para sintetizar el $GalNAc_3$-2 conjugado unido a fosfodiéster en el extremo 5′. Se utilizó una solución de fosforamidita 0,1 M en acetonitrilo anhidro para β-D-2′-deoxiribonucleósido y 2′-

MOE.

Las síntesis de ASO se realizaron en un sintetizador ABI 394 (escala 1-2 µmol) o en un sintetizador GE Healthcare Bioscience ÄKTA oligopilot (escala 40-200 µmol) mediante el método de acoplamiento de fosforamidita en un soporte sólido VIMAD (110 µmol/g, Guzaev et ál., 2003) empaquetado en la columna. Para la etapa de acoplamiento, las fosforamidita se administraron con un exceso de 4 veces sobre la carga inicial del soporte sólido y se llevó a cabo el acoplamiento de fosforamidita durante 10 minutos. El resto de las etapas siguió protocolos estándar proporcionados por el fabricante. Se utilizó una solución de ácido dicloroacético al 6 % en tolueno para quitar los grupos dimetoxitritilo (DMT) de los grupos 5'-hidroxilo del nucleótido. Se utilizó 4,5-Dicianoimidazola (0,7 M) en CH_3CN anhidro como catalizador durante la etapa de acoplamiento. Las uniones fosforotioato se introdujeron mediante sulfurización con una solución 0,1 M de hidruro de xantano en piridina/CH_3CN 1:1 durante un tiempo de contacto de 3 minutos. Se utilizó una solución de *terc*-butilhidroperóxido al 20 % en CH_3CN con agua al 6 % como un agente oxidante para proporcionar uniones internucleósido fosfodiéster con un tiempo de contacto de 12 minutos.

Después de ensamblar la secuencia deseada, se desprotegieron grupos protectores de fosfato de cianoetilo se desprotegieron con dietilamina al 20 % en tolueno (v/v) con un tiempo de contacto de 45 minutos. Los ASO unidos a soporte sólido se suspendieron en amoníaco acuoso (28-30 % en peso) y se calentaron a 55 °C durante 6 horas.

Los ASO sin unir se filtraron y se hirvió el amoníaco. El residuo se purificó mediante cromatografía líquida a presión elevada en una columna de intercambio aniónico fuerte (GE Healthcare Bioscience, Source 30Q, 30 µm, 2,54 x 8 cm, A = acetato de amonio 100 mM en CH_3CN acuoso al 30 %, B = NaBr 1,5 M en A, 0-40 % de B en 60 min, flujo 14 mL min-1, λ = 260 nm). El residuo se desaló mediante HPLC en una columna de fase inversa para proporcionar los ASO deseados en un rendimiento aislado de 15-30 % basado en la carga inicial en el soporte sólido. Los ASO se caracterizaron mediante análisis MS acoplado por HPLC de pares iónicos con el sistema Agilent 1100 MSD.

Tabla 34

ASO que comprende un $GalNAc_3$-2 conjugado unido a fosfodiéster en la posición 5′ dirigido a SRB-1

N.° ISIS	Secuencia (5′ a 3′)	Masa calCd	Masa observada	SEQ ID NO.
661134	**$GalNAc_3$-2_a-$_{o'}$$A_{do}$**$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	6482,2	6481,6	827

Subíndices: "e" indica un nucleósido modificado en 2′-MOE; "d" indica β-D-2′-desoxirribonucleósido; "k" indica el nucleósido bicíclico 6′-*(S)*-CH_3 (por ejemplo, cEt); "s" indica uniones internucleósido fosforotioato (PS); "o" indica uniones internucleósido fosfodiéster (PO) y "o′" indica -O-P(=O)(OH)-. El superíndice "m" indica 5-metilcitosinas. La estructura de $GalNAc_3$-2_a se muestra en el Ejemplo 37.

Ejemplo 42: Método general para la preparación de ASO que comprenden un $GalNAc_3$-3 conjugado en la posición 5′ por medio de técnicas de fase sólida (preparación de ISIS 661166)

La síntesis de ISIS 661166 se realizó utilizando procedimientos similares, tal como se ilustra en los Ejemplos

39 y 41.

ISIS 661166 es un gapmer 5-10-5 MOE, donde la posición 5′ comprende un $GalNAc_3$-3 conjugado. Los ASO se caracterizaron mediante análisis MS acoplado por HPLC de pares iónicos con el sistema Agilent 1100 MSD.

Tabla 34a

ASO que comprende un $GalNAc_3$-3 conjugado en la posición 5′ mediante una unión fosfodiéster hexilamino dirigido a Malat-1

N.° ISIS	Secuencia (5′ a 3′)	Conjugado	Masa calcd	Masa observada	SEQ ID NO.
661166	5′-**$GalNAc_3$-$3_{a-o'}$**$^{m}C_{es}G_{es}G_{es}T_{es}G_{es}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $G_{es}A_{es}A_{es}$ $T_{es}T_{e}$	**5′-$GalNAc_3$-3**	8992,16	8990,51	828

Subíndices: “e” indica un nucleósido 2′-MOE modificado; “d” indica un β-D-2′-desoxirribonucleósido; “s” indica uniones internucleósido fosforotioato (PS); “o” indica uniones internucleósido fosfodiéster (PO); y “o′” indica -O-P(=O)(OH)-. El superíndice "m" indica 5-metilcitosinas. La estructura de “5′-$GalNAc_3$-3a” se muestra en el Ejemplo 39.

Ejemplo 43: Estudio dependiente de la dosis de $GalNAc_3$-2 unido a fosfodiéster (ver ejemplos 37 y 41, Bx es adenina) en el extremo 5′ dirigido a SRB-1 *in vivo*

ISIS 661134 (ver Ejemplo 41) que comprende un conjugado $GalNAc_3$-2 unido a fosfodiéster en el extremo 5′ se evaluó en un estudio dependiente de la dosis para verificar la inhibición antisentido de SRB-1 en ratones. ISIS 440762 y 651900 no conjugados ($GalNAc_3$-1 conjugado en el extremo 3′, ver Ejemplo 9) se incluyeron en este estudio para comparar y se describen previamente en la Tabla 17.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones macho Balb/c de seis semanas (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una única vez con la dosificación que se muestra más adelante con ISIS 440762, 651900, 661134 o con control tratado con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones fueron sacrificados 72 horas después de la administración final para determinar los niveles de ARNm de SRB-1 en el hígado mediante PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc.

Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los niveles de ARNm de SRB-1 se determinaron en comparación con el ARN total (mediante Ribogreen), antes de la normalización con el control tratado con PBS. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de SRB-1 para cada grupo de tratamiento, normalizados con control tratado con PBS y se denotan como "% PBS". Las ED_{50} se midieron mediante métodos similares tal como se describió anteriormente y se presentan a continuación.

Tal como se ilustra en la Tabla 35, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de ARNm de SRB-1 de una forma dependiente de la dosis. De hecho, los oligonucleótidos antisentido que comprenden los conjugados $GalNAc_3$-2 unidos a fosfodiéster en el extremo 5' (ISIS 661134) o el conjugado $GalNAc_3$-1 unidos en el extremo 3' (ISIS 651900) mostraron una mejora sustancial de la potencia en comparación con el oligonucleótido antisentido no conjugado (ISIS 440762). Además, ISIS 661134, que comprende un conjugado $GalNAc_3$-2 unido a fosfodiéster en el extremo 5', era equipotente en comparación con ISIS 651900, que comprende el conjugado $GalNAc_3$-1 en el extremo 3'.

Tabla 35

ASO que contienen $GalNAc_3$-1 o $GalNAc_3$-2 dirigidos a SRB-1

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	Niveles de ARNm de SRB-1 (% de PBS)	ED_{50} (mg/kg)	Conjugado	SEQ ID NO.
PBS	0	100	--	--	
440762	0,2	116	2,58	Sin conjugado	823
	0,7	91			
	2	69			
	7	22			
	20	5			
651900	0,07	95	0,26	**3′ $GalNAc_3$-1**	824
	0,2	77			
	0,7	28			
	2	11			
	7	8			
661134	0,07	107	0,25	**5′ $GalNAc_3$-2**	827
	0,2	86			
	0,7	28			
	2	10			
	7	6			

Las estructuras de 3′ $GalNAc_3$-1 y 5′ $GalNAc_3$-2 se describieron previamente en los Ejemplos 9 y 37.

Análisis de la farmacocinética (PK)

La PK de los ASO del grupo de dosis alta (7 mg/kg) se examinó y se evaluó de la misma manera que se ilustra en el Ejemplo 20. Se picó una muestra de hígado y se extrajo mediante protocolos estándar. Los metabolitos de longitud completa 661134 (5’ $GalNAc_3$-2) e ISIS 651900 (3’ $GalNAc_3$-1) se identificaron y sus masas se confirmaron mediante análisis de espectrometría de masas de alta resolución. Los resultados mostraron que el metabolito principal detectado para el ASO que comprende conjugado $GalNAc_3$-2 unido a fosfodiéster en el extremo 5' (ISIS 661134) era ISIS 440762 (no se muestran los datos). No se observaron metabolitos adicionales a un nivel detectable. A diferencia de su equivalente, los metabolitos adicionales similares a los informados previamente en la Tabla 23a se observaron para el ASO que tenía el conjugado $GalNAc_3$-1 en el extremo 3' (ISIS 651900). Estos resultados sugieren que el conjugado $GalNAc_3$-1 o $GalNAc_3$-2 unido a fosfodiéster puede mejorar el perfil PK de los ASO sin comprometer su potencia.

Ejemplo 44: Efecto de uniones PO/PS en la inhibición antisentido de ASO que comprenden el conjugado $GalNAc_3$-1 (ver Ejemplo 9) en el extremo 3' dirigido a SRB-1

ISIS 655861 y 655862 que comprenden un conjugado $GalNAc_3$-1 en el extremo 3', cada uno dirigido a SRB-1, se evaluaron en un estudio de una única administración para verificar su capacidad de inhibir SRB-1 en ratones. El compuesto original no conjugado, ISIS 353382, se incluyó en el estudio para comparación.

Los ASO son gapmers 5-10-5 MOE, donde la región del segmento intermedio comprende diez 2'-desoxirribonucleósidos y cada región de ala comprende cinco nucleósido modificados 2'-MOE. Los ASO se prepararon usando métodos similares a los ilustrados previamente en el Ejemplo 19 y se describen en la Tabla 36 a continuación.

Tabla 36

ASO modificados que comprenden un conjugado $GalNAc_3$-1 en el extremo 3' dirigidos a SRB-1

N.° ISIS	Secuencia (5' a 3')	Química	SEQ ID NO.
353382 (original)	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS completo sin conjugado	829

655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do}'}$-**$GalNAc_3$-$1_a$**	PS completo con conjugado **$GalNAc_3$-1**	830
655862	$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do}'}$-**$GalNAc_3$-$1_a$**	PS/PO mixto con conjugado **$GalNAc_3$-1**	830

Subíndices: "e" indica un nucleósido 2'-MOE modificado; "d" indica un β-D-2'-desoxirribonucleósido; "s" indica uniones internucleósido fosforotioato (PS); "o" indica uniones internucleósido fosfodiéster (PO); y "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. El superíndice "m" indica 5-metilcitosinas. La estructura de $GalNAc_3$-1 se muestra en el Ejemplo 9.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones macho Balb/c de seis semanas (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una única vez con la dosificación que se muestra más adelante con ISIS 353382, 655861, 655862 o con control tratado con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Antes del tratamiento y después de la última dosis, se extrajo sangre

de cada ratón y se analizaron muestras de plasma. Los ratones fueron sacrificados 72 horas después de la administración final para determinar los niveles de ARNm de SRB-1 en el hígado mediante PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los niveles de ARNm de SRB-1 se determinaron en comparación con el ARN total (mediante Ribogreen), antes de la normalización con el control tratado con PBS. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de SRB-1 para cada grupo de tratamiento, normalizados con control tratado con PBS y se denotan como "% PBS". Las ED_{50} se midieron mediante métodos similares tal como se describió anteriormente y se indican a continuación.

Tal como se ilustra en la Tabla 37, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de ARNm de SRB-1 de una forma dependiente de la dosis en comparación con el control tratado con PBS. De hecho, los oligonucleótidos antisentido que comprenden el conjugado $GalNAc_3$-1 en el extremo 3' (ISIS 655861 y 655862) mostraron una mejora sustancial de la potencia en comparación con el oligonucleótido antisentido no conjugado (ISIS 353382). Además, ISIS 655862 con uniones PS/PO mixtas mostró una

mejora en la potencia en comparación con PS completo (ISIS 655861).

Tabla 37

Efecto de uniones PO/PS en la inhibición antisentido de ASO que comprenden un conjugado $GalNAc_3$-1 en el extremo 3' dirigidos a SRB-1

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	Niveles de ARNm de SRB-1 (% de PBS)	ED_{50} (mg/kg)	Química	SEQ ID NO.
PBS	0	100	--	--	
353382 (original)	3	76,65	10,4	PS completo sin conjugado	829
	10	52,40			
	30	24,95			
655861	0,5	81,22	2,2	PS completo con conjugado $GalNAc_3$-1	830
	1,5	63,51			
	5	24,61			
	15	14,80			

655862	0,5	69,57	1,3	PS/PO mixtos con conjugado $GalNAc_3$-1	830
	1,5	45,78			
	5	19,70			
	15	12,90			

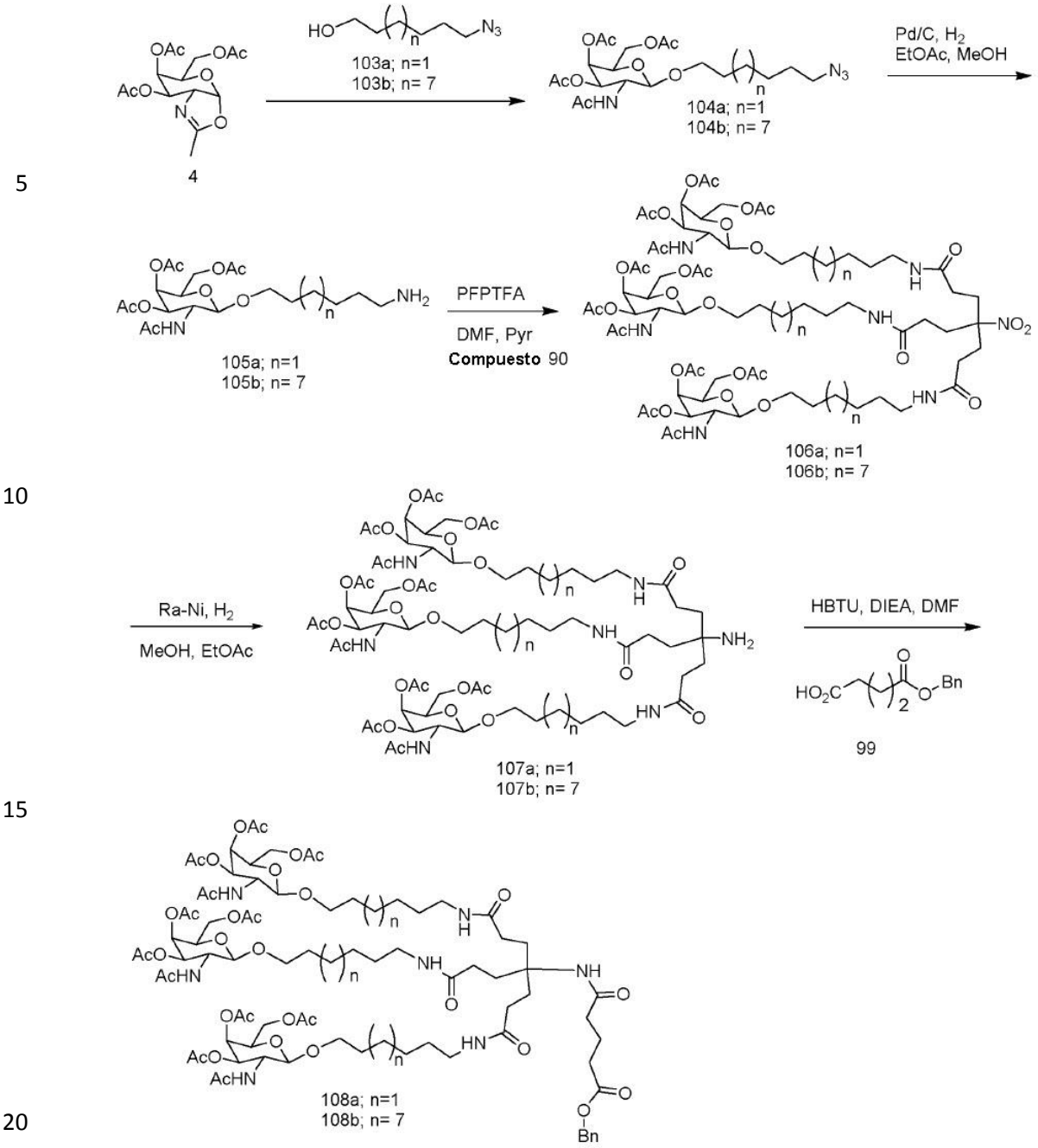
Se midieron los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y transaminasa en hígado, en suero, con relación a ratones inyectados con solución salina, mediante protocolos estándar. También se evaluaron los pesos de los órganos. Los resultados demostraron que no se observó un aumento en los niveles de transaminasa (Tabla 38) o en los pesos de órganos (no se muestran los datos) en los ratones tratados con ASO en comparación con el control con PBS. Además, el ASO con uniones mixtas PS/PO (ISIS 655862) mostró niveles de transaminasa similares en comparación con PS completo (ISIS 655861).

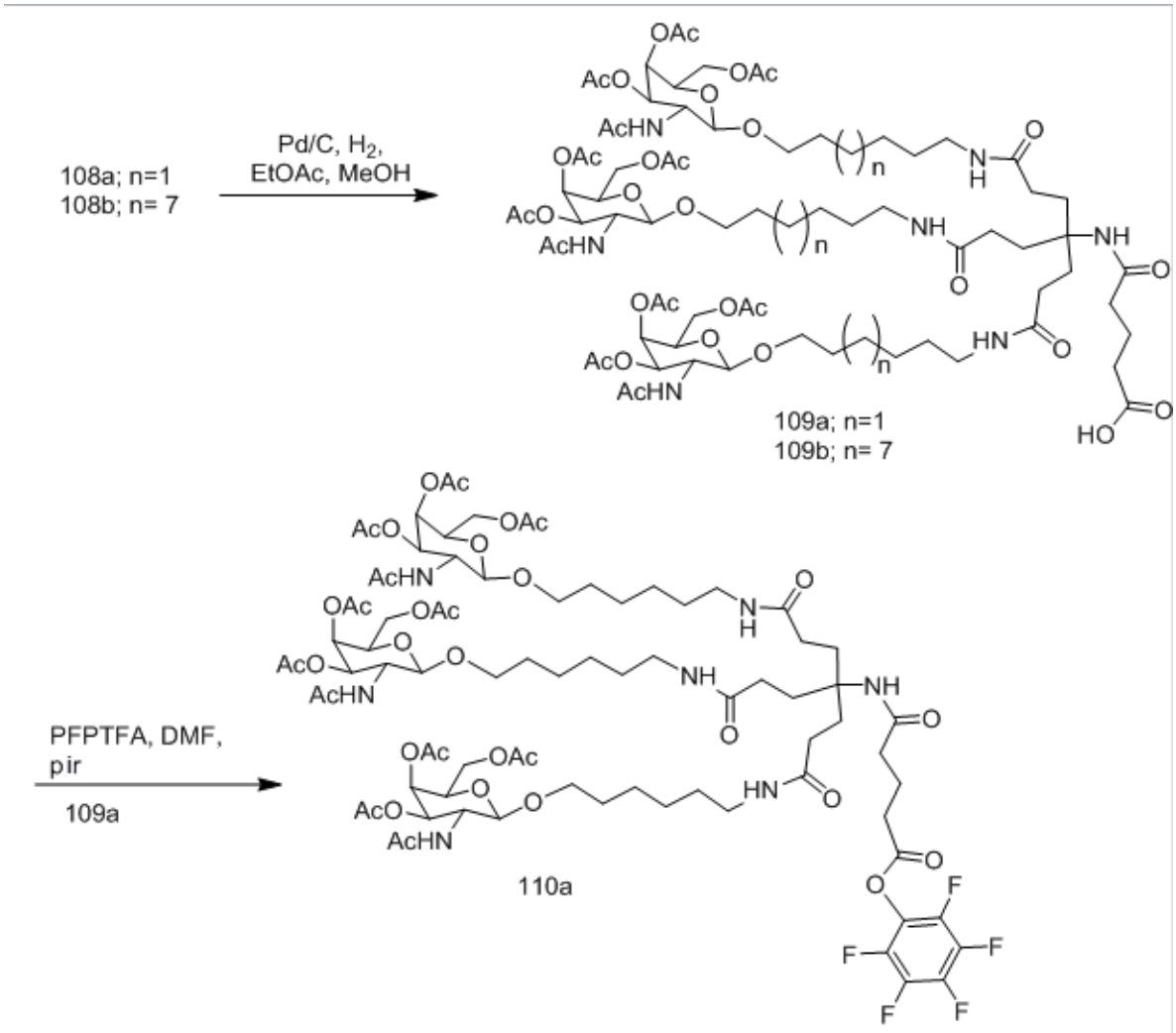
Tabla 38

Efecto de uniones PO/PS en los niveles de transaminasa de ASO que comprenden un conjugado $GalNAc_3$-1 en el extremo 3' dirigidos a SRB-1

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Química	SEQ ID NO.
PBS	0	28,5	65	--	
353382 (original)	3	50,25	89	PS completo sin conjugado	829
	10	27,5	79,3		
	30	27,3	97		
655861	0,5	28	55,7	PS completo con **$GalNAc_3$-1**	830
	1,5	30	78		
	5	29	63,5		
	15	28,8	67,8		
655862	0,5	50	75,5	PS/PO mezclados con **$GalNAc_3$-1**	830
	1,5	21,7	58,5		
	5	29,3	69		
	15	22	61		

Ejemplo 45: Preparación del éster de PFP, Compuesto 110a





El Compuesto 4 (9,5 g, 28,8 mmoles) se trató con el compuesto 103a o 103b (38 mmoles), individualmente, y TMSOTf (0,5 eq.) y tamices moleculares en diclorometano (200 mL), y se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. En ese momento, la capa orgánica se filtró a través de celite, luego se lavó con bicarbonato de sodio, agua y salmuera. La capa orgánica entonces se separó, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se redujo a presión reducida. El aceite resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (2 % -->

10 % de metanol/diclorometano) para proporcionar los compuestos 104a y 104b con un rendimiento >80 %. LCMS y NMR de protones fueron congruentes con la estructura.

Los compuestos 104a y 104b se trataron con las mismas condiciones que los compuestos 100a-d (Ejemplo 47), para proporcionar los compuestos 105a y 105b con un rendimiento >90 %. LCMS y NMR de protones fueron congruentes con la estructura.

Los compuestos 105a y 105b se trataron individualmente con el compuesto 90 en las mismas condiciones que los compuestos 901a-d para proporcionar los compuestos 106a (80 %) y 106b (20 %). LCMS y NMR de protones fueron congruentes con la estructura.

Los compuestos 106a y 106b se trataron con las mismas condiciones que los compuestos 96a-d (Ejemplo 47), para proporcionar 107a (60 %) y 107b (20 %). LCMS y NMR de protones fueron congruentes con la estructura.

Los compuestos 107a y 107b se trataron con las mismas condiciones que los compuestos 97a-d (Ejemplo 47), para proporcionar los compuestos 108a y 108b con un rendimiento de

40-60 %. LCMS y NMR de protones fueron congruentes con la estructura.

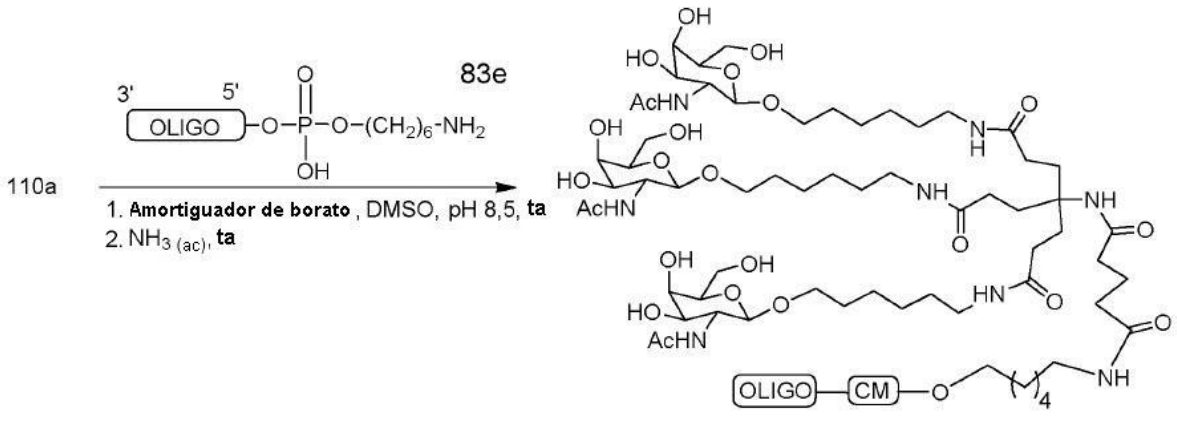
Los compuestos 108a (60 %) y 108b (40 %) se trataron con las mismas condiciones que los compuestos 100a-d (Ejemplo 47), para proporcionar los compuestos 109a y 109b con rendimientos >80%. LCMS y NMR de protones fueron congruentes con la estructura.

El compuesto 109a se trató con las mismas condiciones que los compuestos 101a-d (Ejemplo 47), para proporcionar el Compuesto 110a con un rendimiento de 30-60 %. LCMS y NMR de protones fueron congruentes con la estructura. De manera alternativa, el Compuesto 110b puede prepararse de una manera similar partiendo del Compuesto 109b.

Ejemplo 46: Procedimiento general para la conjugación con ésteres de PFP (oligonucleótido 111); preparación de ISIS 666881 ($GalNAc_3$-10)

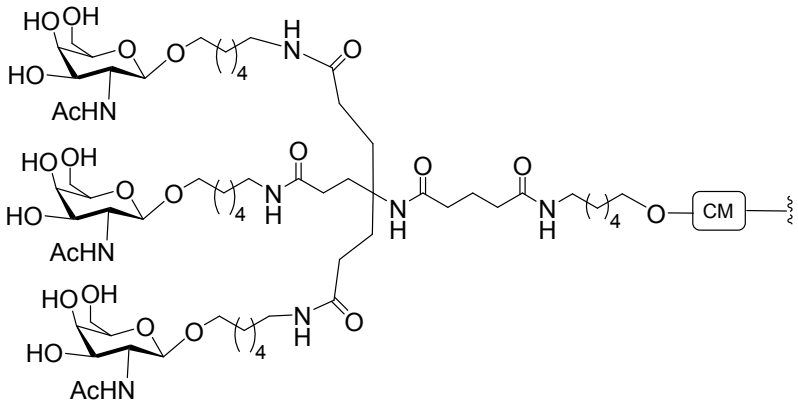
Se sintetizó un oligonucleótido modificado en 5'-hexilamino y se purificó usando procedimientos estándar de oligonucleótido de fase sólida. El oligonucleótido modificado en 5'-hexilamino se disolvió en tetraborato de sodio 0,1 M, pH 8,5

(200 µL) y se agregaron 3 equivalentes de un conglomerado $GalNAc_3$ esterificado con PFP seleccionado disuelto en DMSO (50 µL). De precipitarse el éster de PFP al agregarlo a la solución de ASO, se agregaba DMSO hasta que el éster de PFP estuviera en solución. La reacción se completó después de alrededor de 16 horas de mezclado a temperatura ambiente. La solución resultante se diluyó con agua hasta 12 mL y luego se centrifugó a 3000 rpm en un filtro giratorio con un límite de masa de 3000 Da. Este proceso se repitió dos veces para retirar las impurezas de molécula pequeña. La solución entonces se liofilizó hasta sequedad y se volvió a disolver en amoníaco acuoso concentrado y se mezcló a temperatura ambiente durante 2,5 h seguido por concentración al vacío para retirar la mayor parte del amoníaco. El oligonucleótido conjugado se purificó y se desaló mediante RP-HPLC y se liofilizó para proporcionar el oligonucleótido conjugado con $GalNAc_3$.



111

El oligonucleótido 111 está conjugado con $GalNAc_3$-10. La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-10 ($GalNAc_3$-10_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el resto escindible es -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)- como se muestra en el oligonucleótido (ISIS 666881) sintetizado con $GalNAc_3$-10 más adelante. La estructura de $GalNAc_3$-10 ($GalNAc_3$-10_a-CM-) se muestra a continuación:



Siguiendo este procedimiento generalmente se preparó ISIS 666881. Se sintetizó un oligonucleótido modificado en 5'-hexilamino, ISIS 660254, y se purificó usando procedimientos estándar de oligonucleótido de fase sólida. ISIS 660254 (40 mg, 5,2 µmol) se disolvió en tetraborato de sodio 0,1 M, pH 8,5 (200 µL) y se agregaron 3 equivalentes de éster de PFP (Compuesto 110a) disuelto en DMSO (50 µL). El éster de PFP se

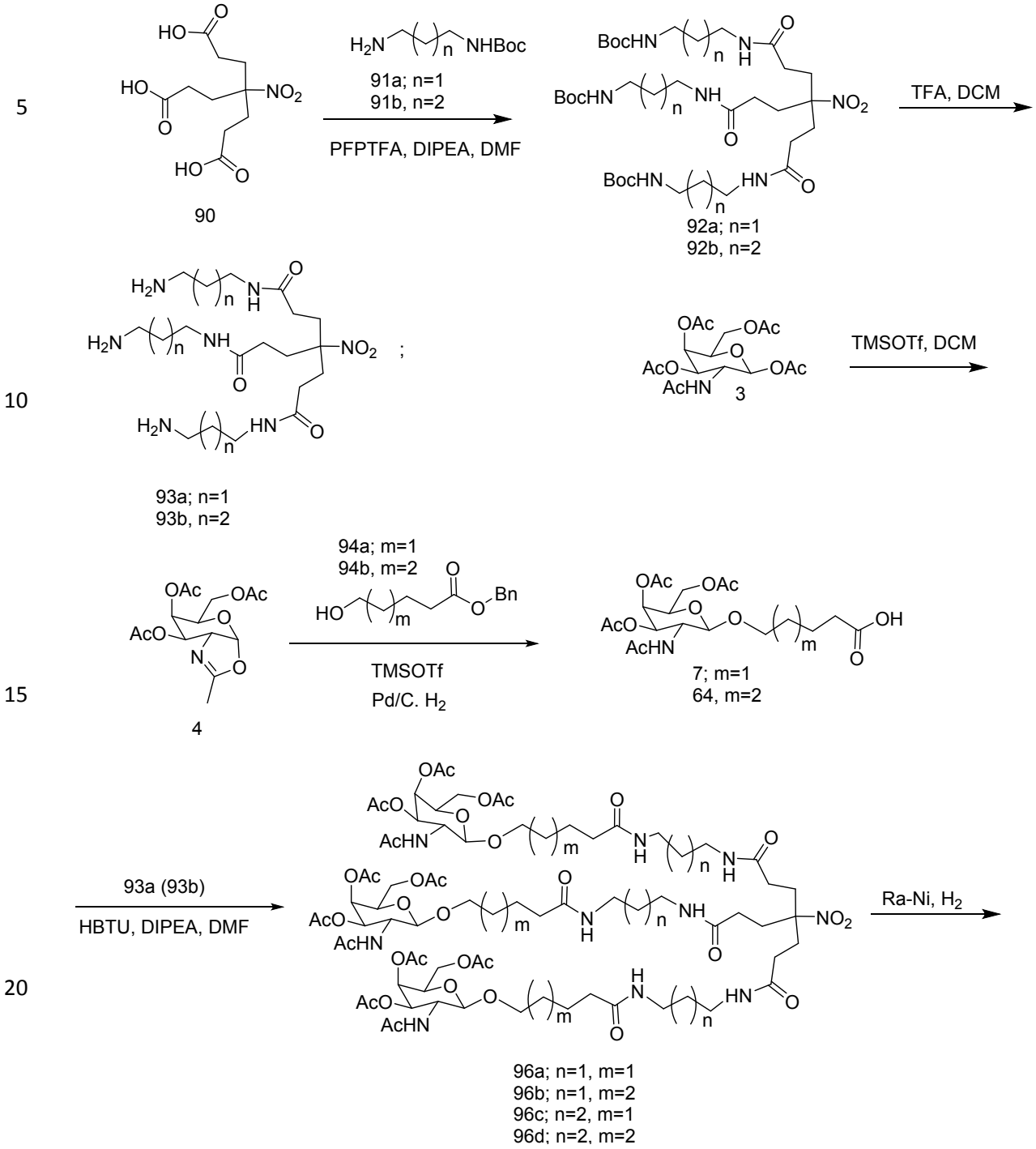
precipitó al agregarlo a la solución de ASO lo cual requirió DMSO (600 µL) adicional para disolver completamente el éster de PFP. La reacción se completó después de 16 horas de mezclado a temperatura ambiente. La solución se diluyó con agua hasta un volumen total de 12 mL y luego se centrifugó a 3000 rpm en un filtro giratorio con un límite de masa de 3000 Da. Este proceso se repitió dos veces para retirar las impurezas de molécula pequeña. La solución se liofilizó hasta sequedad y se volvió a disolver en amoníaco acuoso concentrado con mezclado a temperatura ambiente durante 2,5 h seguido por concentración al vacío para retirar la mayor parte del amoníaco. El oligonucleótido conjugado se purificó y se desaló mediante RP-HPLC y se liofilizó para proporcionar ISIS 666881 con un rendimiento de 90 % en peso (42 mg, 4,7 µmol).

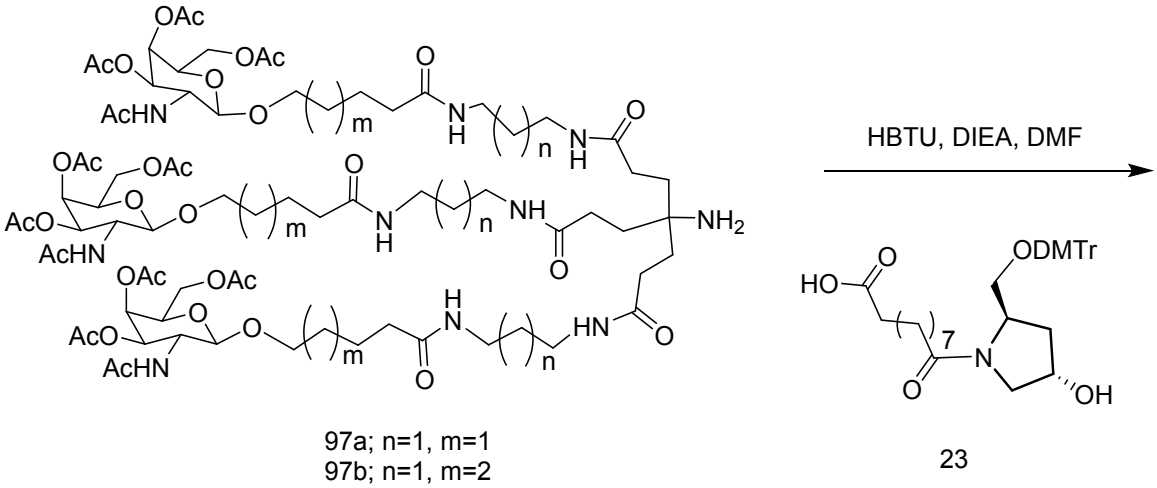
Oligonucleótido conjugado con $GalNAc_3$-10

ASO	Secuencia (5′ a 3′)	Grupo 5'	SEQ ID No.
ISIS 660254	$NH_2(CH_2)_6$- $_oA_{do}G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{es}{}^mC_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^mC_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{ds}T_{ds}T_{es}{}^mC_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_e$	Hexilamina	831
ISIS 666881	**$GalNAc_3$-10_a-** **$_{o'}A_{do}$**$G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{es}{}^mC_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^mC_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{ds}T_{ds}T_{es}{}^mC_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_e$	**$GalNAc_3$-10**	831

Las mayúsculas indican la nucleobase para cada nucleósido y ^{m}C indica una 5-metilcitosina. Subíndices: "e" indica un nucleósido 2′-MOE modificado; "d" indica un β-D-2′-desoxirribonucleósido; "s" indica una unión internucleósido fosforotioato (PS); "o" indica una unión internucleósido fosfodiéster (PO); y "o′" indica -O-P(=O)(OH)-. Los grupos conjugados están en negrita.

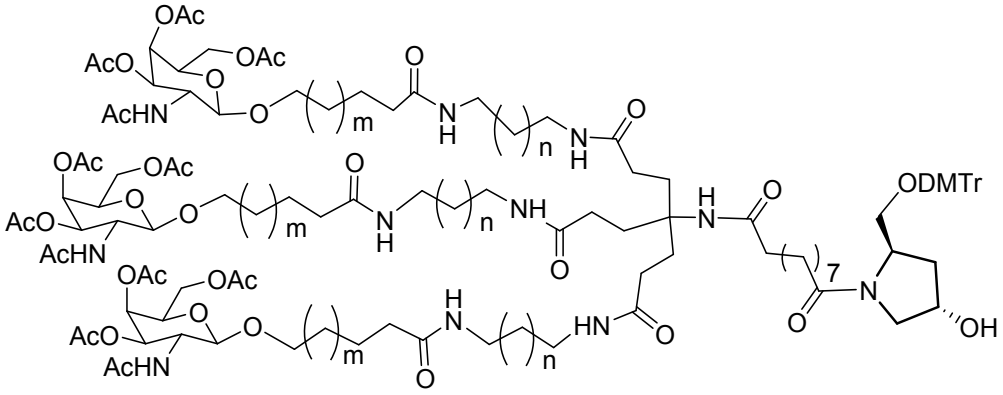
Ejemplo 47: Preparación del Oligonucleótido 102 que comprende $GalNAc_3$-8



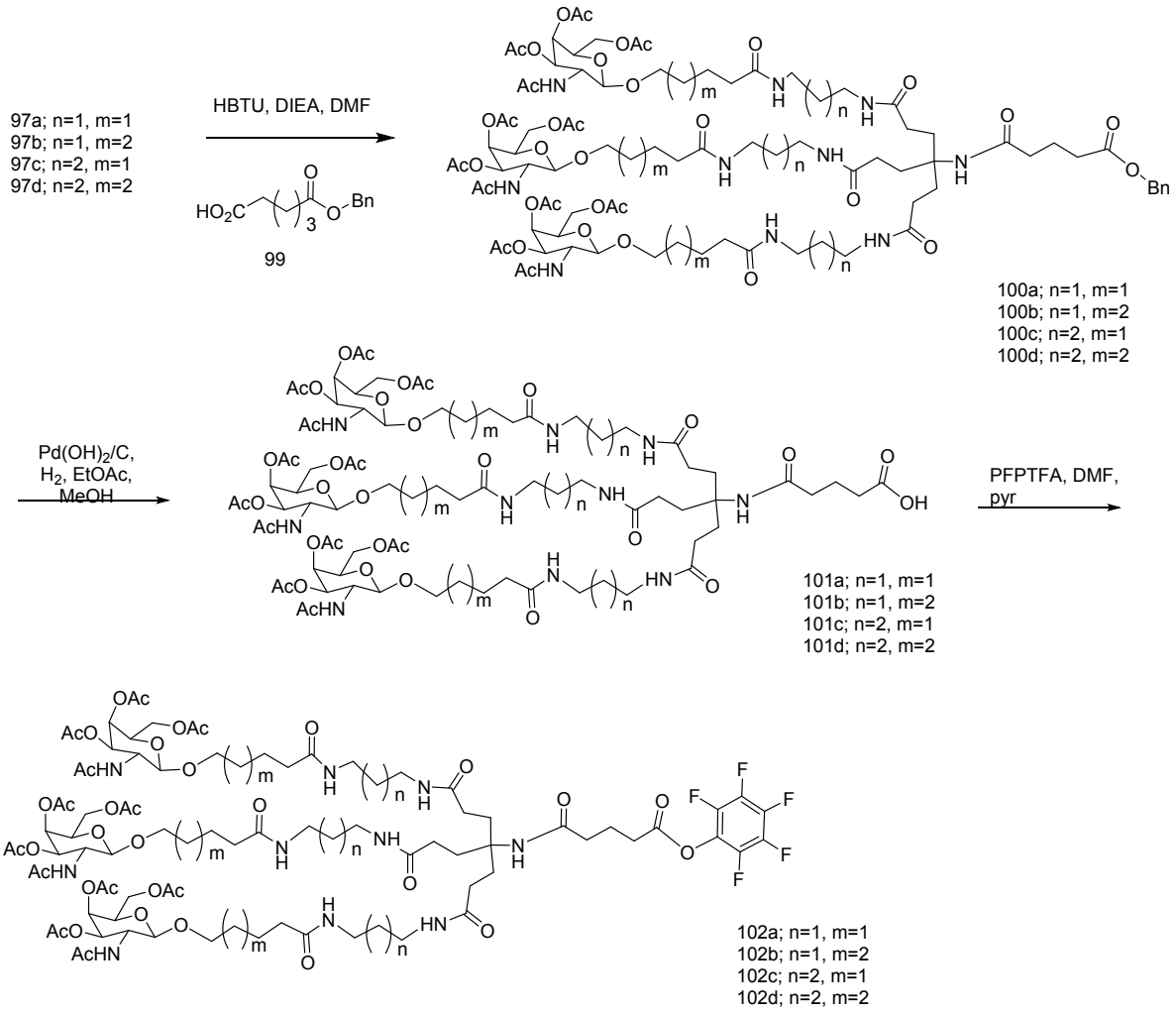


97a; n=1, m=1
97b; n=1, m=2
97c; n=2, m=1
97d; n=2, m=2

23



98a; n=1, m=1
98b; n=1, m=2
98c; n=2, m=1
98d; n=2, m=2



El triácido 90 (4 g, 14,43 mmol) se disolvió en DMF (120 mL) y *N*,*N*-diisopropiletilamina (12,35 mL, 72 mmoles). Se agregó por goteo trifluoroacetato de pentafluorofenilo (8,9 mL, 52 mmoles) bajo argón, la reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se agregó Boc-diamina 91a o 91b (68,87 mmol), junto con *N*,*N*-diisopropiletilamina (12,35 mL, 72 mmoles), y la reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 16 horas. En ese momento, se redujo la DMF

en >75 % bajo presión reducida, y luego la mezcla se disolvió en diclorometano. La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio, agua y salmuera. La capa orgánica entonces se separó, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se redujo a un aceite a presión reducida. El aceite resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (2 % --> 10 % de metanol/diclorometano) para proporcionar los compuestos 92a y 92b con un rendimiento de aproximadamente 80 %. LCMS y NMR de protones fueron congruentes con la estructura.

El compuesto 92a o 92b (6,7 mmoles) se trató con 20 mL de diclorometano y 20 mL de ácido trifluoroacético a temperatura ambiente durante 16 horas. La solución resultante se evaporó y luego se disolvió en metanol y se trató con resina DOWEX-OH durante 30 minutos. La solución resultante se filtró y se redujo a un aceite bajo presión reducida para proporcionar un rendimiento de 85-90 % de los compuestos 93a y 93b.

Los Compuestos 7 o 64 (9,6 mmoles) se trataron con HBTU (3,7 g, 9,6 mmoles) y *N*,*N*-diisopropiletilamina (5 mL) en DMF (20 mL) durante 15 minutos. A esto se agregó ya sea el compuesto 93a o el 93b (3 mmoles) y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 16 horas. En ese momento, se redujo la DMF en >75 % bajo presión reducida, y luego la

mezcla se disolvió en diclorometano. La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio, agua y salmuera. La capa orgánica entonces se separó, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se redujo a un aceite a presión reducida. El aceite resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (5 % --> 20 % de metanol/diclorometano) para proporcionar los compuestos 96a-d con un rendimiento de 20-40 %. LCMS y NMR de protones fueron congruentes con la estructura.

Los Compuestos 96a-d (0,75 mmoles) se hidrogenaron individualmente sobre níquel Raney durante 3 horas en etanol (75 mL). En ese momento, el catalizador se retiró mediante filtración con celite, y el etanol se retiró bajo presión reducida para proporcionar los compuestos 97a-d con un rendimiento de 80-90 %. LCMS y NMR de protones fueron congruentes con la estructura.

El Compuesto 23 (0,32 g, 0,53 mmoles) se trató con HBTU (0,2 g, 0,53 mmoles) y *N*,*N*-diisopropiletilamina (0,19 mL, 1,14 mmoles) en DMF (30 mL) durante 15 minutos. A esto se agregaron los compuestos 97a-d (0,38 mmoles) individualmente y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 16 horas. En ese momento se redujo la DMF en >75 % bajo presión reducida,

y luego la mezcla se disolvió en diclorometano. La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio, agua y salmuera. La capa orgánica entonces se separó, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se redujo a un aceite a presión reducida. El aceite resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (2 % --> 20 % de metanol/diclorometano) para proporcionar los compuestos 98a-d con un rendimiento de 30-40%. LCMS y NMR de protones fueron congruentes con la estructura.

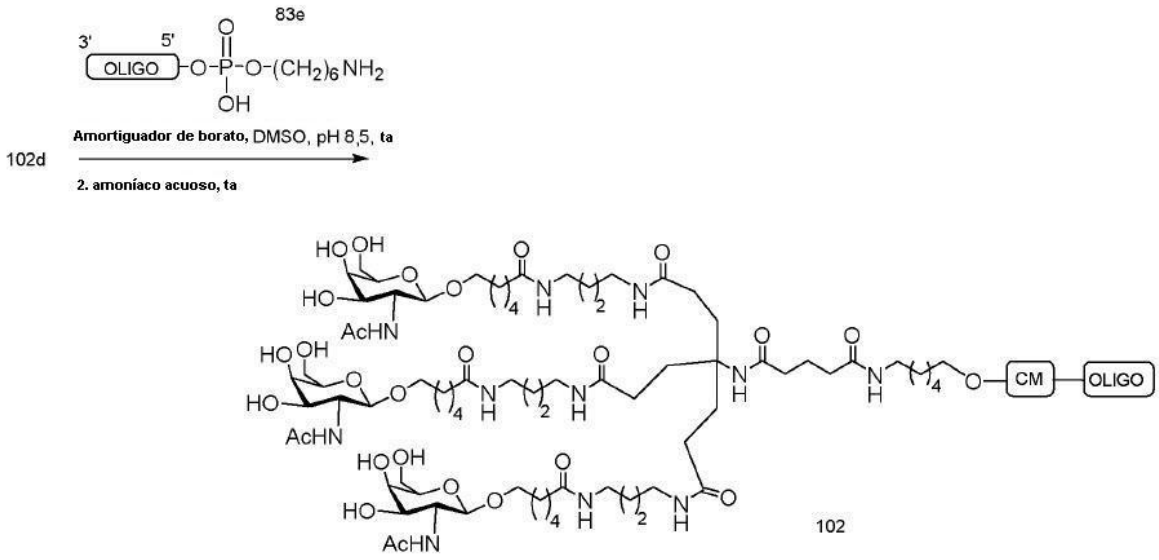
El Compuesto 99 (0,17 g, 0,76 mmoles) se trató con HBTU (0,29 g, 0,76 mmoles) y *N*,*N*-diisopropiletilamina (0,35 mL, 2,0 mmoles) en DMF (50 mL) durante 15 minutos. A esto se agregaron los compuestos 97a-d (0,51 mmoles) individualmente y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 16 horas. En ese momento, se redujo la DMF en >75 % bajo presión reducida, y luego la mezcla se disolvió en diclorometano. La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio, agua y salmuera. La capa orgánica entonces se separó, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se redujo a un aceite a presión reducida. El aceite resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (5 % --> 20 % de metanol/diclorometano) para proporcionar los compuestos 100a-d con un rendimiento de 40-60%. LCMS y NMR de protones fueron congruentes con la

estructura.

Los Compuestos 100a-d (0,16 mmoles) se hidrogenaron individualmente sobre 10 % de $Pd(OH)_2/C$ durante 3 horas en methnol/acetato de etilo (1:1, 50 mL). En ese momento, el catalizador se retiró mediante filtración con celite, y se retiraron los orgánicos bajo presión reducida para proporcionar los compuestos 101a-d con un rendimiento de 80-90 %. LCMS y NMR de protones fueron congruentes con la estructura.

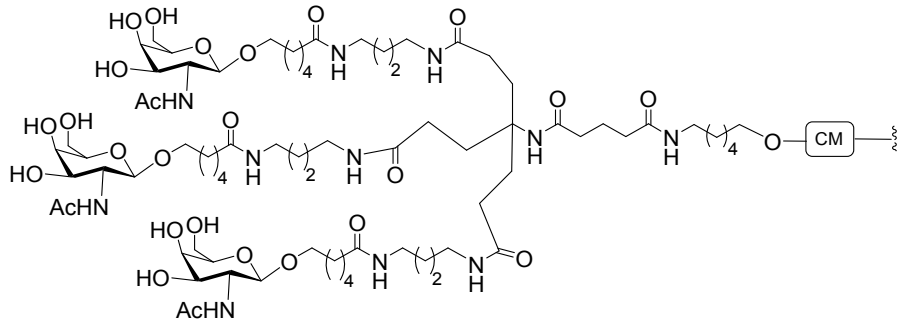
Los Compuestos 101a-d (0,15 mmoles) se disolvieron individualmente en DMF (15 mL) y piridina (0,016 mL, 0,2 mmoles). Se agregó por goteo trifluoroacetato de pentafluorofenilo (0,034 mL, 0,2 mmoles) bajo argón, la reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos. En ese momento se redujo la DMF en >75 % bajo presión reducida, y luego la mezcla se disolvió en diclorometano. La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio, agua y salmuera. La capa orgánica entonces se separó, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se redujo a un aceite a presión reducida. El aceite resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (2 % --> 5 % de metanol/diclorometano) para proporcionar los compuestos 102a-

d con un rendimiento de aproximadamente 80 %. LCMS y NMR de protones fueron congruentes con la estructura.

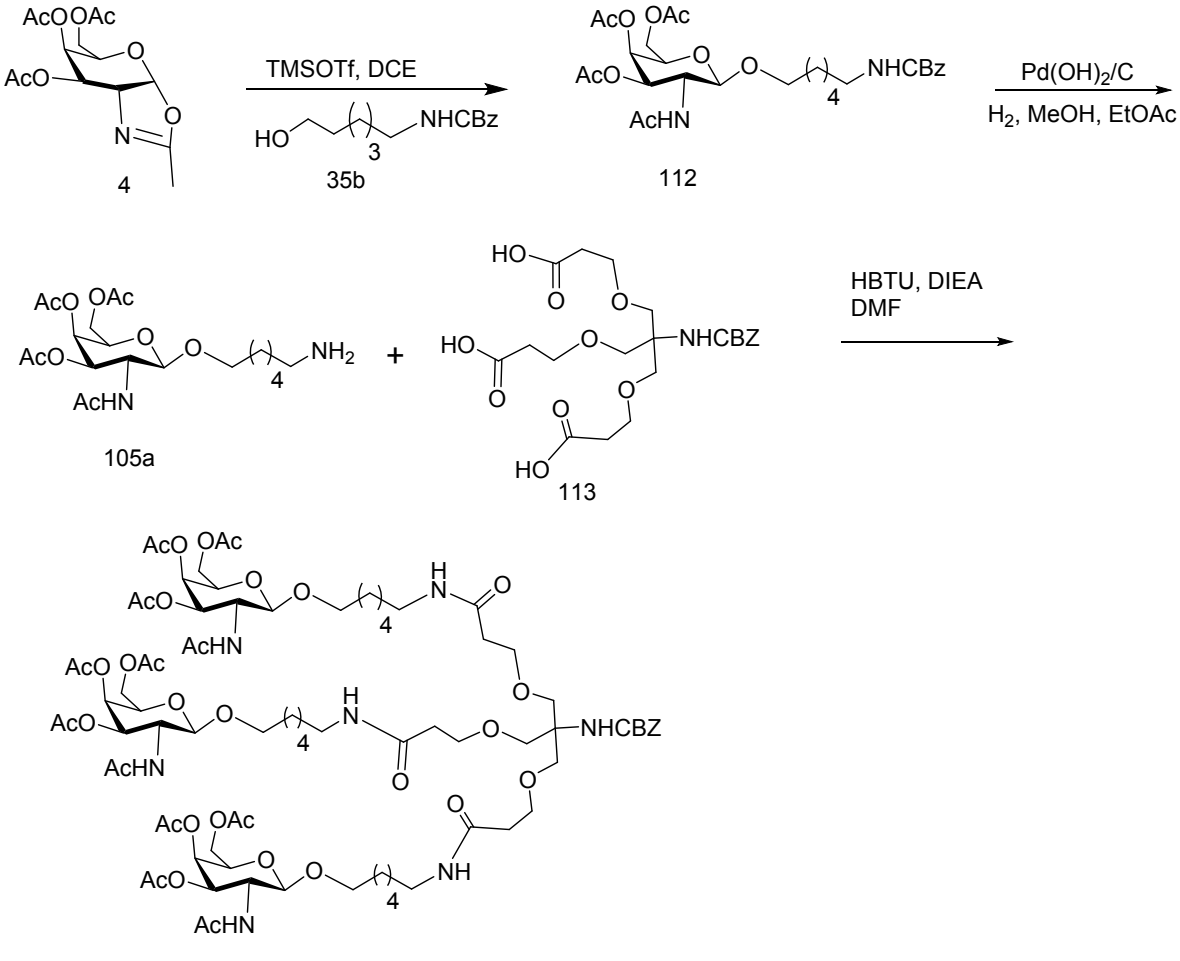


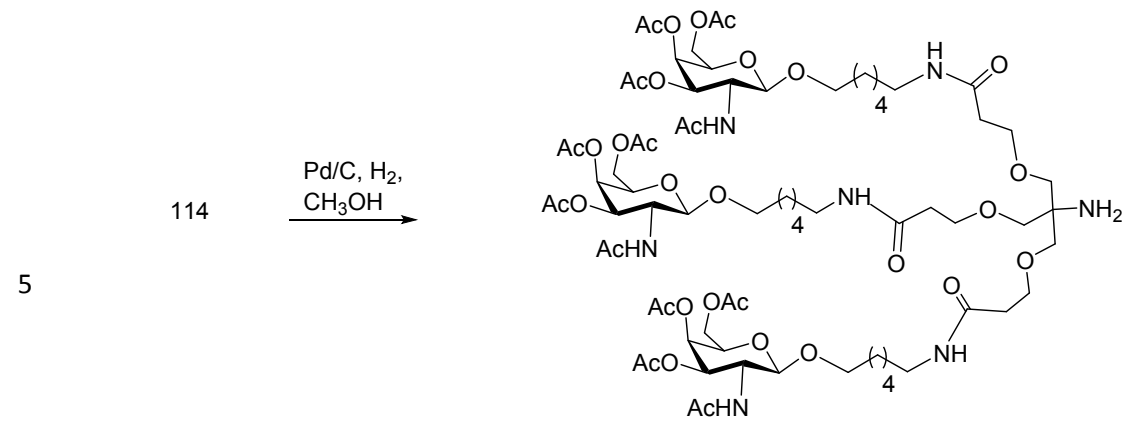
El Compuesto oligomérico 102, que comprende un grupo conjugado $GalNAc_3$-8, se preparó con los procedimientos generales ilustrados en el Ejemplo 46. La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-8 ($GalNAc_3$-8_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En una modalidad preferida, el resto escindible es -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-.

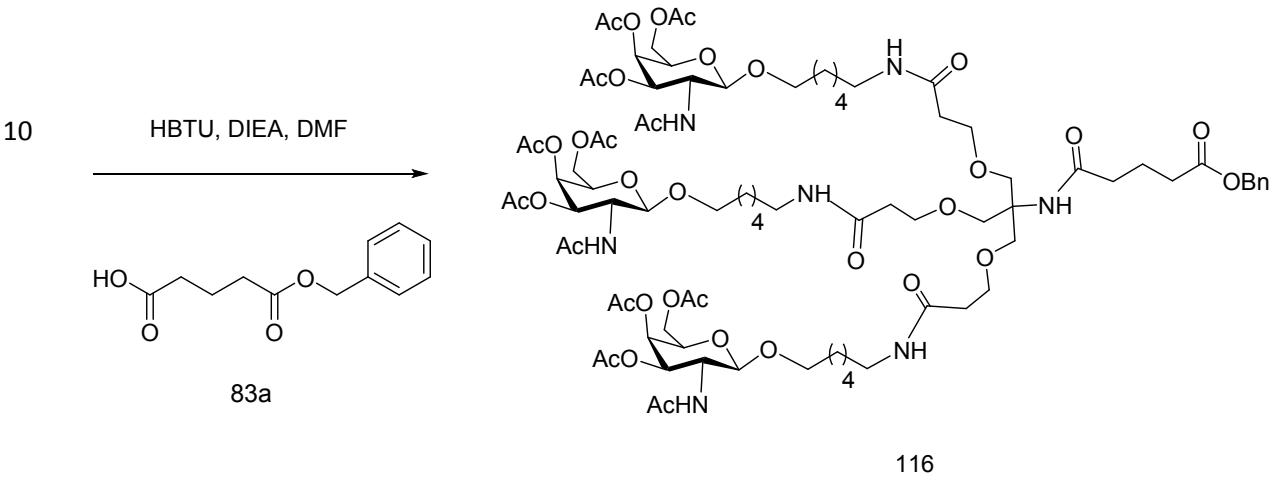
La estructura de $GalNAc_3$-8 ($GalNAc_3$-8_a-CM-) se muestra a continuación:



Ejemplo 48: Preparación del Oligonucleótido 119 que comprende $GalNAc_3$-7







El Compuesto 112 se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía (*J. Med. Chem.* 2004, *47*, 5798-5808).

El Compuesto 112 (5 g, 8,6 mmol) se disolvió en 1:1 metanol/acetato de etilo (22 mL/22 mL). Se agregó hidróxido de paladio en carbono (0,5 g). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente en hidrógeno durante 12 horas. La

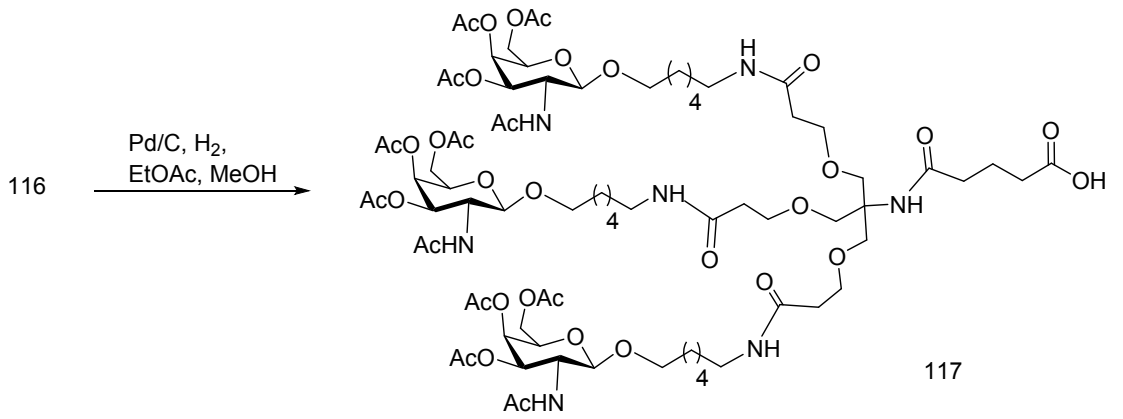
mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite y la almohadilla se lavó completamente con metanol/acetato de etilo 1:1. El filtrado y los lavados se combinaron y se concentraron hasta sequedad para proporcionar el Compuesto 105a (cuantitativo). La estructura se confirmó mediante LCMS.

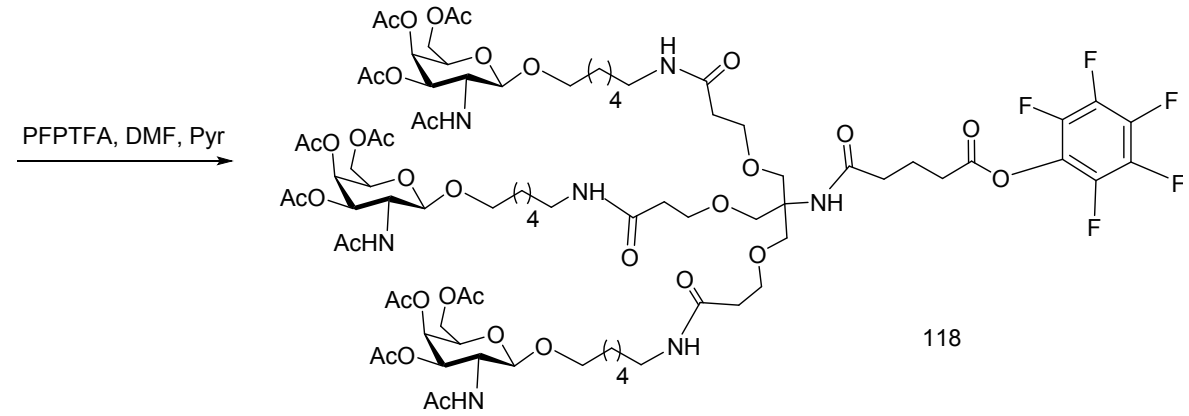
El Compuesto 113 (1,25 g, 2,7 mmol), HBTU (3,2 g, 8,4 mmol) y DIEA (2,8 mL, 16,2 mmol) se disolvieron en DMF anhidro (17 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. A esto se agregó una solución del Compuesto 105a (3,77 g, 8,4 mmol) en DMF anhidro (20 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. Se retiró el solvente a presión reducida para obtener un aceite. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (100 mL) y se lavó con solución de $NaHCO_3$ saturado acuoso (100 mL) y salmuera (100 mL). Se separó la fase orgánica y se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice y se eluyó con MeOH del 10 al 20 % en diclorometano para proporcionar el Compuesto 114 (1,45 g, 30 %). Se confirmó la estructura mediante análisis por LCMS y ^1H NMR

El Compuesto 114 (1,43 g, 0,8 mmol) se disolvió en 1:1

metanol/acetato de etilo (4 mL/4 mL). Se agregó paladio en carbono húmedo (0,14 g). La mezcla de reacción enjuagó con hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente en hidrógeno durante 12 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite. La almohadilla de celite se lavó con metanol/acetato de etilo (1:1). El filtrado y los lavados se combinaron y se evaporaron a presión reducida para proporcionar el Compuesto 115 (cuantitativo). Se confirmó la estructura mediante análisis por LCMS y ^{1}H NMR.

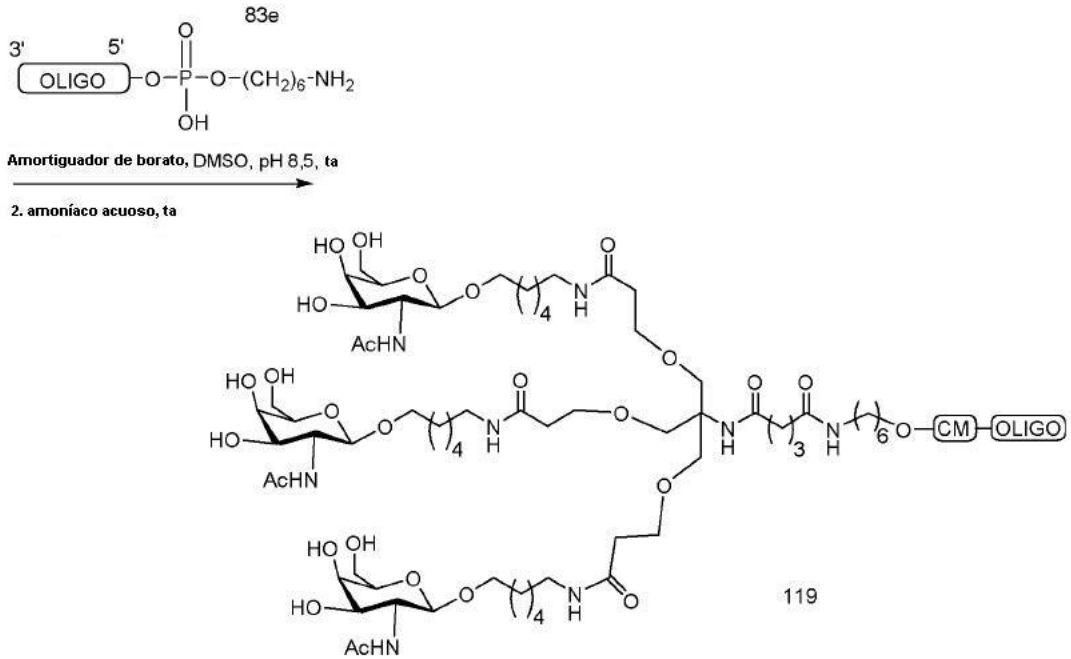
El Compuesto 83a (0,17 g, 0,75 mmol), HBTU (0,31 g, 0,83 mmol) y DIEA (0,26 mL, 1,5 mmol) se disolvieron en DMF anhidro (5 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. A esta solución del Compuesto 115 (1,22 g, 0,75 mmol) en DMF anhidro se le agregó y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. El solvente se retiró a presión reducida y el residuo se disolvió en CH_2Cl_2. La capa orgánica se lavó con solución de $NaHCO_3$ saturado acuoso y salmuera y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtró. La capa orgánica se concentró hasta sequedad y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice y se eluyó con MeOH del 3 al 15 % en diclorometano para proporcionar el Compuesto 116 (0,84 g, 61%). Se confirmó la estructura mediante análisis por ^{1}H NMR y LC MS.





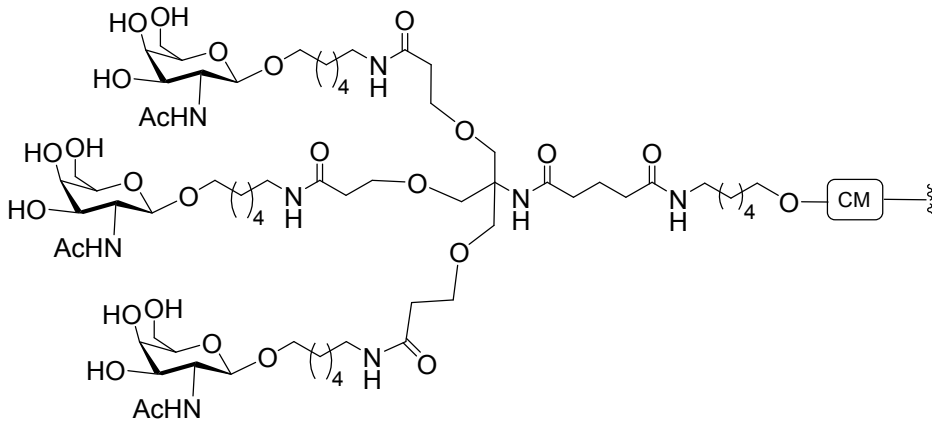
El Compuesto 116 (0,74 g, 0,4 mmol) se disolvió en 1:1 metanol/acetato de etilo (5 mL/5 mL). Se agregó paladio en carbono húmedo (0,074 g). La mezcla de reacción enjuagó con hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente en hidrógeno durante 12 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite. La almohadilla de celite se lavó con metanol/acetato de etilo (1:1). El filtrado y los lavados se combinaron y se evaporaron a presión reducida para proporcionar el compuesto 117 (0,73 g, 98 %). Se confirmó la estructura mediante análisis por LCMS y ^{1}H NMR.

El Compuesto 117 (0,63 g, 0,36 mmol) se disolvió en DMF anhidro (3 mL). A esta solución se agregó *N,N*-diisopropiletilamina (70 µL, 0,4 mmol) y trifluoroacetato de pentafluorofenilo (72 µL, 0,42 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas y se vertió en una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$. La mezcla se extrajo con diclorometano, se lavó con salmuera y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. La solución de diclorometano se concentró hasta sequedad y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice y se eluyó con MeOH del 5 al 10 % en diclorometano para proporcionar el compuesto 118 (0,51 g, 79%). La estructura se confirmó mediante LCMS y ^{1}H y ^{1}H y ^{19}F NMR.



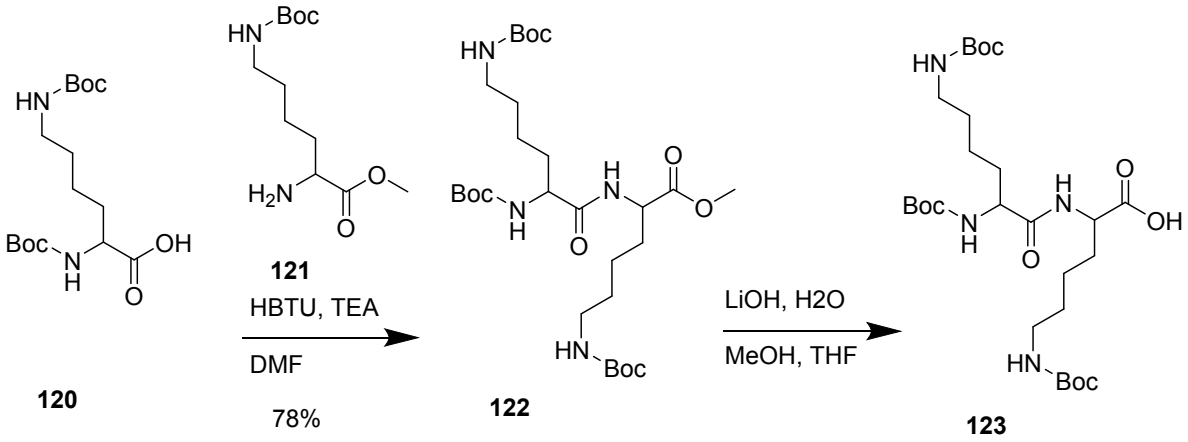
El Compuesto oligomérico 119, que comprende un grupo conjugado $GalNAc_3$-7, se preparó con los procedimientos generales ilustrados en el Ejemplo 46. La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-7 ($GalNAc_3$-7_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el resto escindible es -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-.

La estructura de $GalNAc_3$-7 ($GalNAc_3$-7_a-CM-) se muestra a continuación:



.

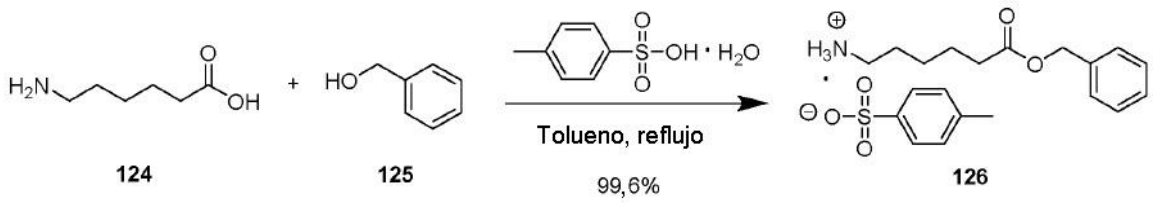
Ejemplo 49: Preparación del Oligonucleótido 132 que comprende $GalNAc_3$-5



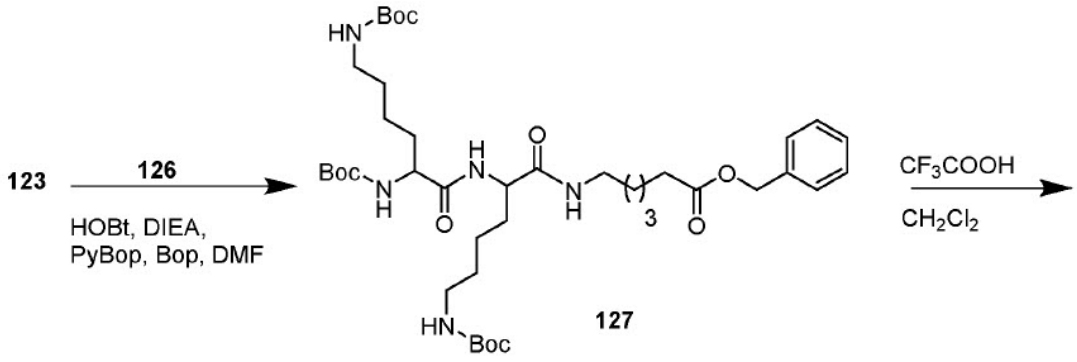
El Compuesto 120 (14,01 g, 40 mmol) y HBTU (14,06 g, 37 mmol) se disolvieron en DMF anhidra (80 mL). Se agregó trietilamina (11,2 mL, 80,35 mmol) y se agitó durante 5 min. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se agregó una solución del compuesto 121 (10 g, mmol) en DMF anhidra (20 mL). Se agregó trietilamina adicional (4,5 mL, 32,28 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 18 horas en una atmósfera de argón. La reacción se monitoreó mediante TLC (acetato de etilo:hexano 1:1; Rf = 0,47). Se retiró el solvente a presión reducida. El residuo se absorbió en EtOAc (300 mL) y se lavó con $NaHSO_4$ 1M (3 x 150 mL), solución de $NaHCO_3$ acuoso saturado (3 x 150 mL) y salmuera (2 x 100 mL). La capa orgánica se secó con Na_2SO_4. Se retiró el agente de secado mediante filtración y la capa orgánica se concentró mediante evaporación rotatoria. La mezcla en bruto se

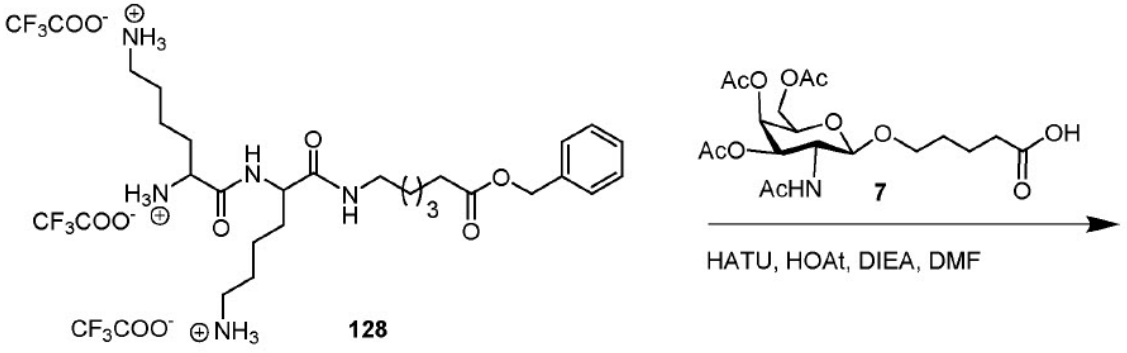
purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice y se eluyó usando 35 – 50 % de EtOAc en hexano para proporcionar un compuesto 122 (15,50 g, 78,13 %). Se confirmó la estructura mediante análisis por LCMS y ^{1}H NMR. Masa *m/z* 589,3 $[M + H]^{+}$.

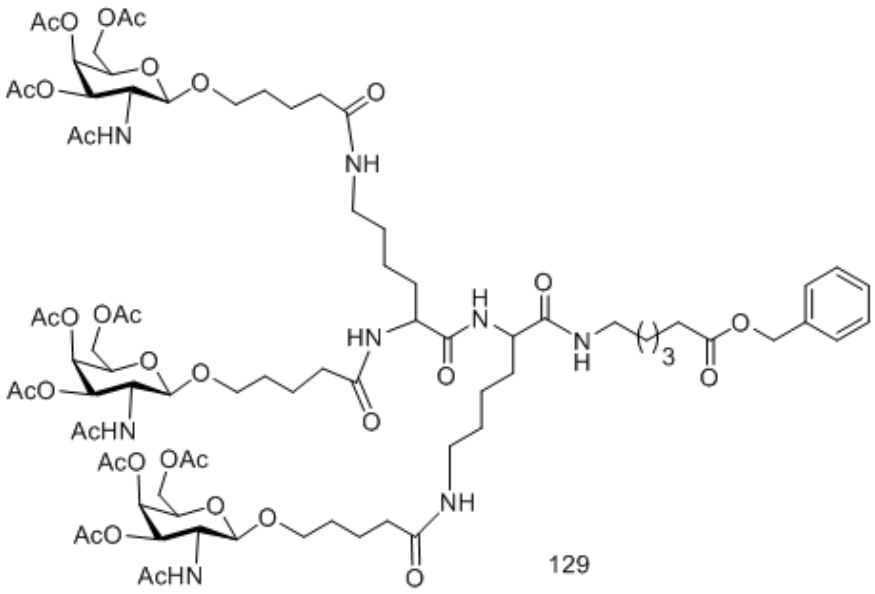
Una solución de LiOH (92,15 mmol) en agua (20 mL) y THF (10 mL) se agregó a una solución fría del Compuesto 122 (7,75 g, 13,16 mmol) disuelta en metanol (15 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 45 min, y se monitoreó mediante TLC (EtOAc:hexano; 1:1). La mezcla de reacción se concentró a presión reducida hasta la mitad del volumen. La solución restante se enfrió en un baño de hielo y se neutralizó mediante la adición de HCl concentrado. La mezcla de reacción se diluyó, se extrajo con EtOAc (120 mL) y se lavó con salmuera (100 mL). Una emulsión formada se aclaró luego de estar en reposo durante la noche. Se separó la capa orgánica y se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó para proporcionar el Compuesto 123 (8,42 g). Es probable que la sal residual sea la causa del exceso de masa. LCMS es congruente con la estructura. El producto se usó sin purificación adicional. M.W.cal:574.36; M.W.fd:575.3 $[M + H]^{+}$.



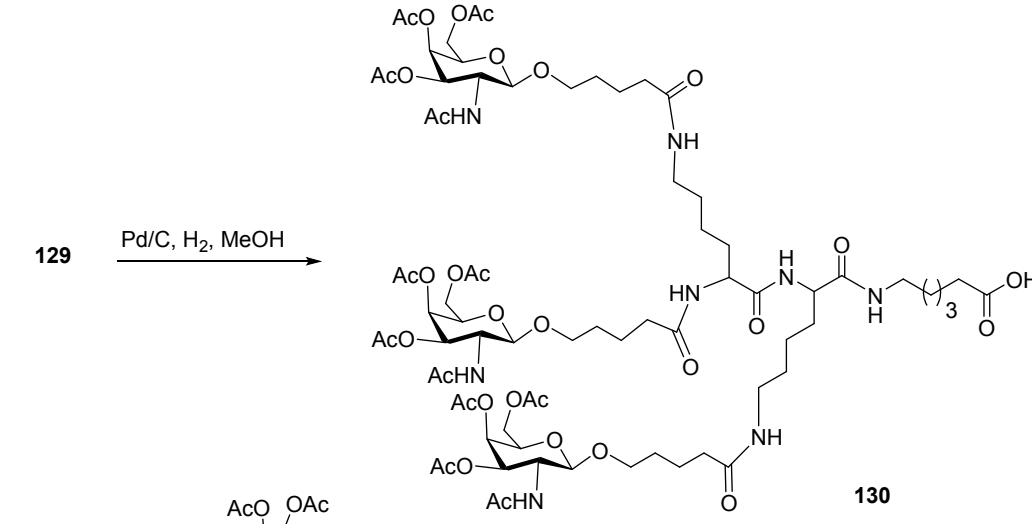
El Compuesto 126 se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía (*J. Am. Chem. Soc.* 2011, *133*, 958-963).







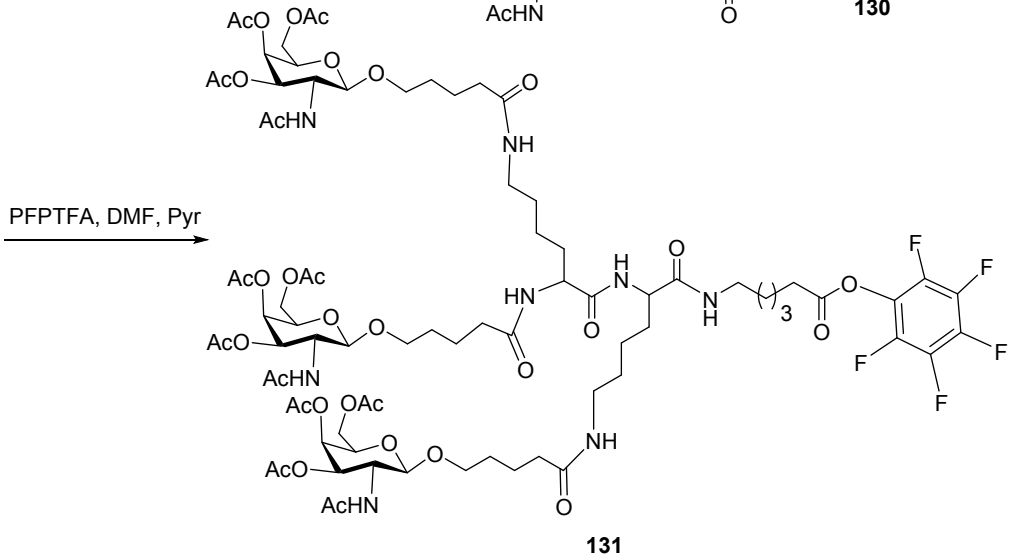
129



129

Pd/C, H_2, MeOH

130



PFPTFA, DMF, Pyr

131

El Compuesto 123 (7,419 g, 12,91 mmol), HOBt (3,49 g, 25,82 mmol) y el compuesto 126 (6,33 g, 16,14 mmol) se disolvieron en DMF (40 mL) y la mezcla de reacción resultante se enfrió en un baño de hielo. A esto se le agregó *N,N*-diisopropiletilamina (4,42 mL, 25,82 mmol), PyBop (8,7 g, 16,7 mmol) seguido por el reactivo de acoplamiento Bop (1,17 g, 2,66 mmol) bajo una atmósfera de argón. Se retiró el baño de hielo y la solución se dejó calentar hasta temperatura ambiente. La reacción se completó después de 1 hora según se determinó mediante TLC (DCM:MeOH:AA; 89:10:1). Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida. El residuo se disolvió en EtOAc (200 mL) y se lavó con $NaHSO_4$ 1 M (3 x 100 mL), $NaHCO_3$ acuoso saturado (3 x 100 mL) y salmuera (2 x 100 mL). Se separó la fase orgánica y se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice con un gradiente de 50 % de hexanos/EtOAC hasta 100 % de EtOAc para proporcionar el Compuesto 127 (9,4 g) como una espuma blanca. La LCMS y ^1H NMR fueron congruentes con la estructura. Masa *m/z* 778,4 $[M + H]^+$.

El ácido trifluoroacético (12 mL) se agregó a una solución del compuesto 127 (1,57 g, 2,02 mmol) en diclorometano (12

mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se coevaporó con tolueno (30 mL) bajo presión reducida hasta sequedad. El residuo obtenido se coevaporó dos veces con acetonitrilo (30 mL) y tolueno (40 mL) para proporcionar el Compuesto 128 (1,67 g) como sal de trifluoro acetato y se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional. La LCMS y ^{1}H NMR fueron coherentes con la estructura. Masa *m/z* 478,2 [M + H] $^{+}$.

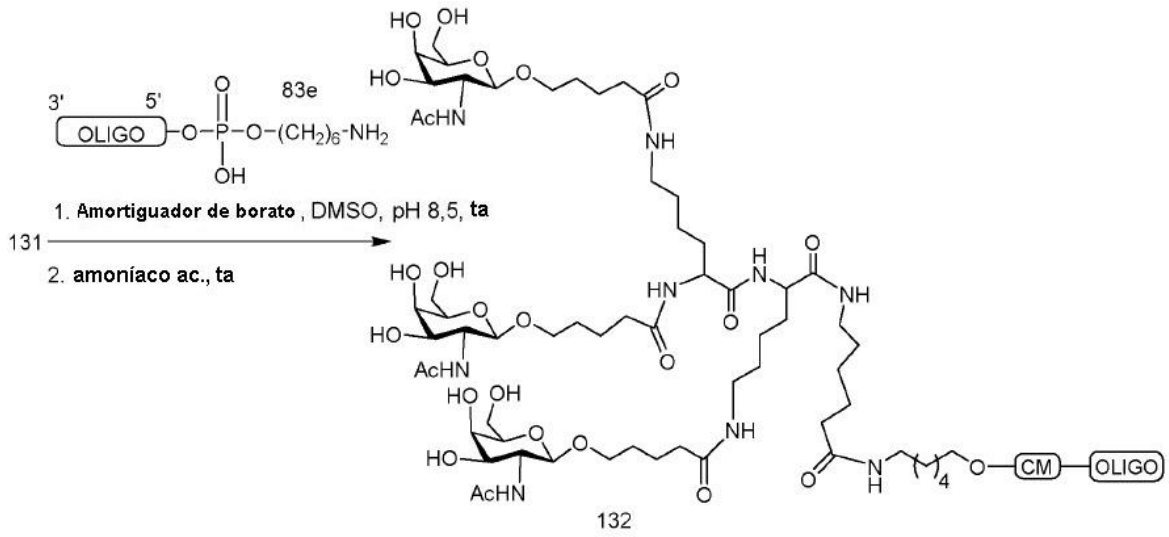
El Compuesto 7 (0,43 g, 0,963 mmol), HATU (0,35 g, 0,91 mmol), y HOAt (0,035 g, 0,26 mmol) se combinaron y se secaron durante 4 h sobre P_2O_5 bajo presión reducida en un matraz de fondo redondo y luego se disolvieron en DMF anhidro (1 mL) y se agitó durante 5 minutos. A esto se agregó una solución del compuesto 128 (0,20 g, 0,26 mmol) en DMF anhidro (0,2 mL) y *N*,*N*-diisopropiletilamina (0,2 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. La reacción se completó después de 30 min y se determinó mediante LCMS y TLC (7 % de MeOH/DCM). Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida. El residuo se disolvió en DCM (30 mL) y se lavó con $NaHSO_4$ 1 M (3 x 20 mL), $NaHCO_3$ acuoso saturado (3 x 20 mL) y salmuera (3 x 20 mL). Se separó la fase orgánica, se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de

gel de sílice usando MeOH del 5-15 % en diclorometano para proporcionar el Compuesto 129 (96,6 mg). La LC MS y ^{1}H NMR son coherentes con la estructura. Masa *m/z* 883,4 $[M + 2H]^+$.

El Compuesto 129 (0,09 g, 0,051 mmol) se disolvió en metanol (5 mL) en un matraz de centelleo de 20 mL. A esto se agregó una pequeña cantidad de 10 % de Pd/C (0,015 mg) y el recipiente de reacción se enjuagó con gas H_2. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de H_2 durante 18 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite y la almohadilla de celite se lavó con metanol. Los lavados de filtrado se agruparon y concentraron bajo presión reducida para proporcionar el Compuesto 130 (0,08 g). La LCMS y ^{1}H NMR fueron coherentes con la estructura. Se utilizó el producto sin purificación posterior. Masa *m/z* 838,3 $[M + 2H]^+$.

A un matraz de fondo redondo en punta de 10 mL se agregó el compuesto 130 (75,8 mg, 0,046 mmol), 0,37 M de piridina/DMF (200 µL) y una barra de agitación. A esta solución se agregó 0,7 M de trifluoroacetato de pentafluorofenilo/DMF (100 µL) por goteo con agitación. La reacción se completó después de 1 h según se determinó mediante LC MS. El solvente se retiró a presión reducida y el residuo se disolvió en $CHCl_3$ (~ 10 mL).

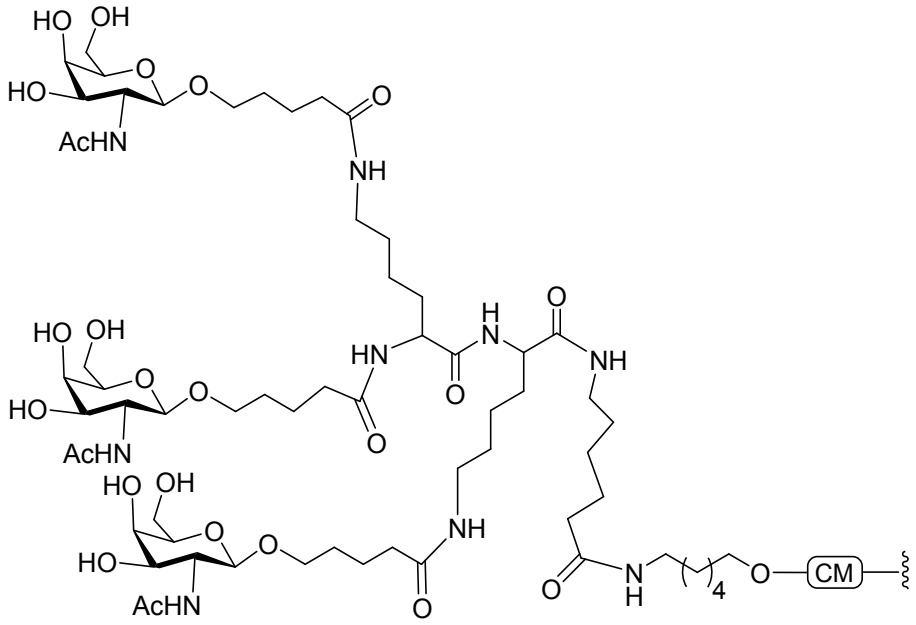
La capa orgánica se dividió contra $NaHSO_4$ (1 M, 10 mL), $NaHCO_3$ saturado acuoso (10 mL) y salmuera (10 mL) tres veces cada uno. Se separó la fase orgánica y se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró para proporcionar el Compuesto 131 (77,7 mg). LCMS es congruente con la estructura. Usado sin purificación adicional. Masa *m/z* 921,3 $[M + 2H]^+$.



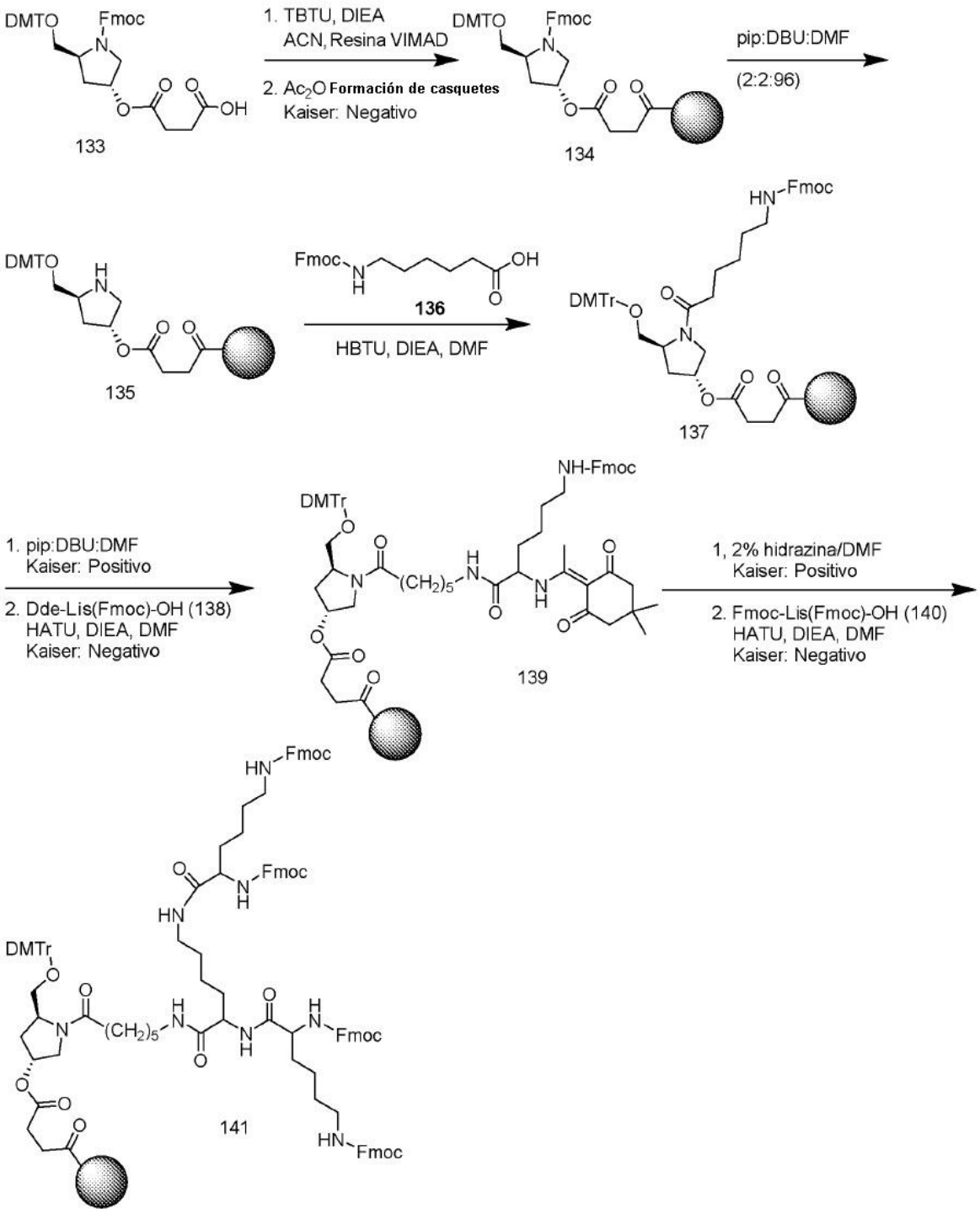
El Compuesto oligomérico 132, que comprende un grupo conjugado $GalNAc_3$-5, se preparó con los procedimientos generales ilustrados en el Ejemplo 46. La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-5 ($GalNAc_3$-5_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el resto escindible es -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-.

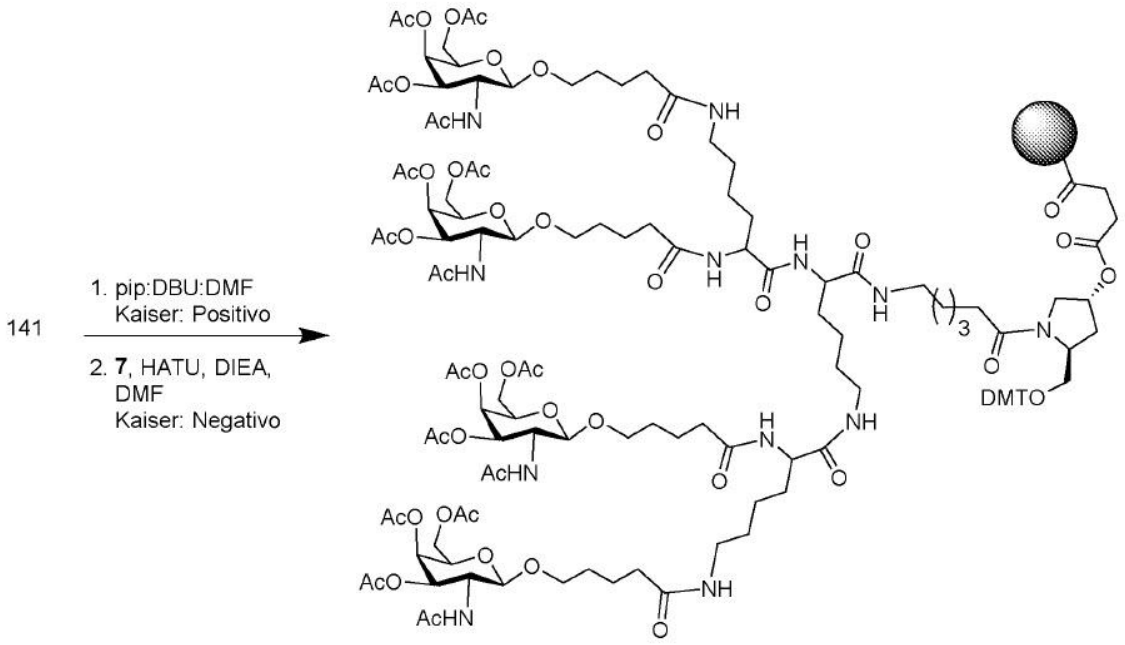
La estructura de $GalNAc_3$-5 ($GalNAc_3$-5_a-CM-) se muestra a

continuación:



Ejemplo 50: Preparación del Oligonucleótido 144 que comprende GalNAc$_4$-11


DMTO
Fmoc
1. TBTU, DIEA
ACN, Resina VIMAD
2. Ac2O Formación de casquetes
Kaiser: Negativo
pip:DBU:DMF
(2:2:96)
133
134
135
136
HBTU, DIEA, DMF
137
1. pip:DBU:DMF
Kaiser: Positivo
2. Dde-Lis(Fmoc)-OH (138)
HATU, DIEA, DMF
Kaiser: Negativo
139
1, 2% hidrazina/DMF
Kaiser: Positivo
2. Fmoc-Lis(Fmoc)-OH (140)
HATU, DIEA, DMF
Kaiser: Negativo
141



141

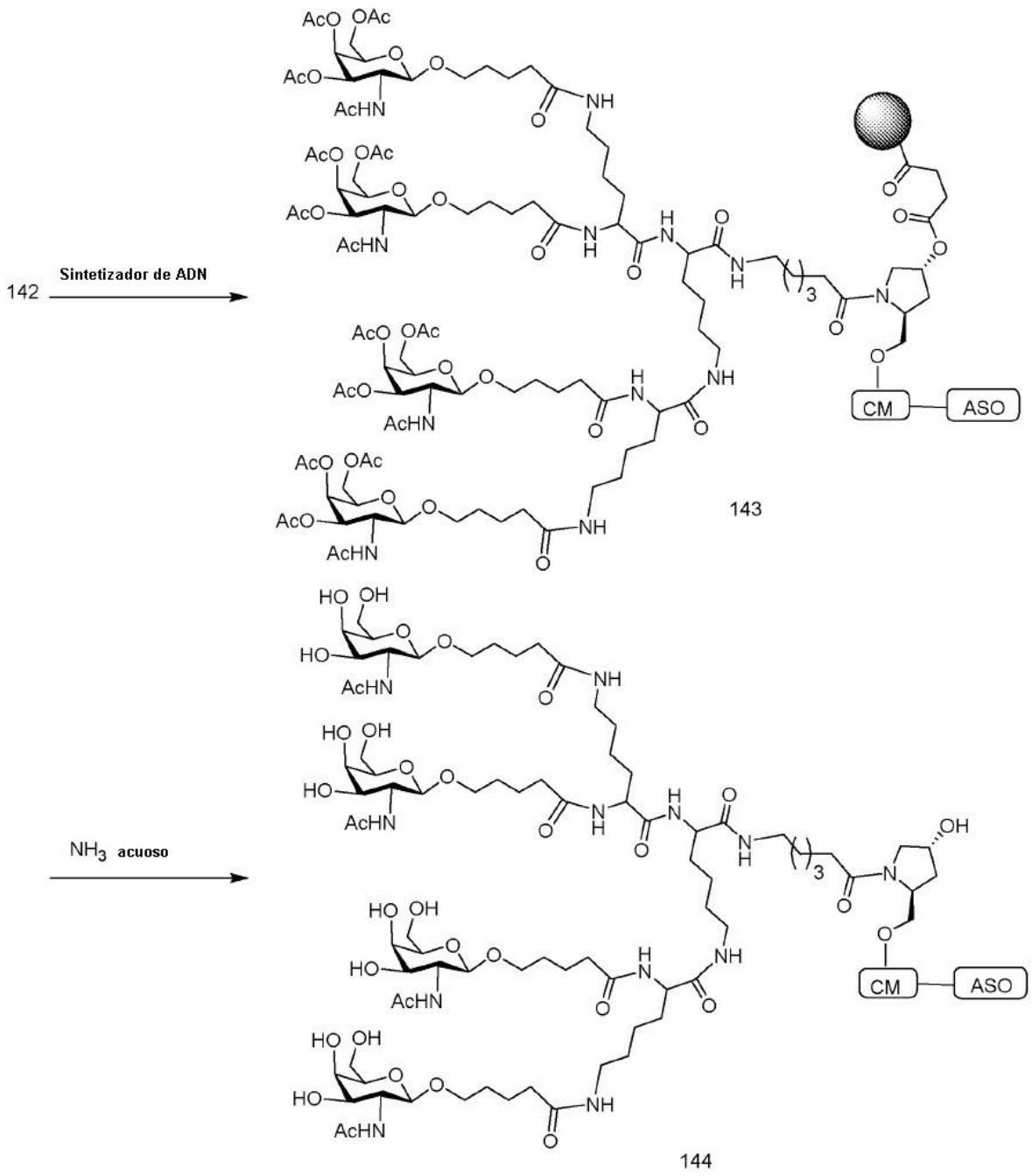
142

Síntesis del Compuesto 134. A un matraz Merrifield se le agregó resina VIMAD de aminometilo (2,5 g, 450 µmol/g) que se lavó con acetonitrilo, dimetilformamida, diclorometano y acetonitrilo. La resina se expandió en acetonitrilo (4 mL). El Compuesto 133 se preactivó en un matraz de fondo redondo de 100 mL mediante la adición de 20 (1,0 mmol, 0,747 g), TBTU (1,0 mmol, 0,321 g), acetonitrilo (5 mL) y DIEA (3,0 mmol, 0,5 mL). Esta solución se dejó agitar durante 5 min y luego se agregó al matraz Merrifield con agitación. La suspensión se dejó agitar durante 3 h. La mezcla de reacción se drenó y la resina se lavó con acetonitrilo, DMF y DCM. La nueva carga de resina se cuantificó mediante la medición de la

absorbancia del catión de DMT a 500 nm (coeficiente de extinción = 76000) en DCM y se determinó que era de 238 µmol/g. Se formaron casquetes en la resina mediante la suspensión en una solución de anhídrido acético durante diez minutos, tres veces.

El compuesto 141 unido al soporte sólido se sintetizó usando métodos de síntesis de péptidos de fase sólida basados en iteración de Fmoc. Una cantidad pequeña del soporte sólido se retiró y suspendió en amoníaco acuoso (28-30 % en peso) durante 6 h. El compuesto escindido se analizó usando LC-MS y la masa observada era coherente con la estructura. Masa *m/z* 1063,8 $[M + 2H]^+$.

El compuesto 142 unido al soporte sólido se sintetizó usando métodos de síntesis de péptidos de fase sólida.

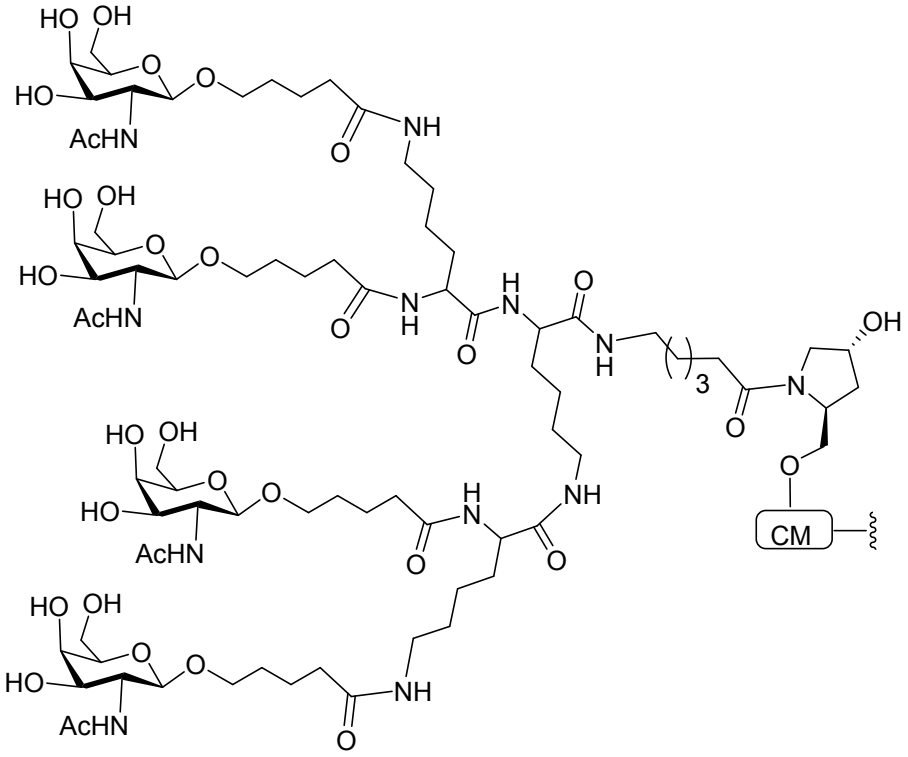


El compuesto 143 unido al soporte sólido se sintetizó usando síntesis de fase sólida estándar en un sintetizador de ADN.

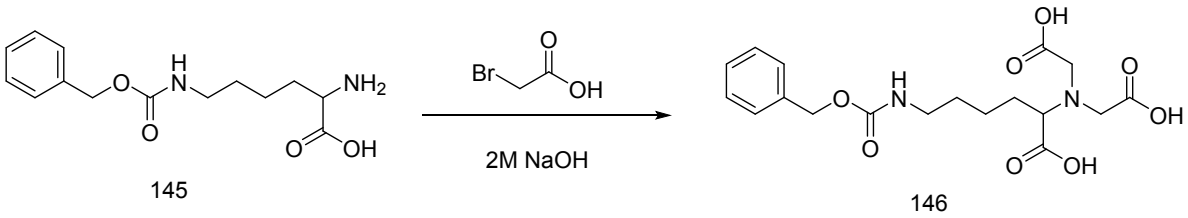
El compuesto 143 unido a soporte sólido se suspendió en amoníaco acuoso (28-30 % en peso) y se calentó a 55 °C durante 16 horas. La solución se enfrió y el soporte sólido se filtró. El filtrado se concentró y el residuo se disolvió en agua y se purificó mediante HPLC en una columna de intercambio aniónico fuerte. Las fracciones que contenían el compuesto 144 de longitud completa se agruparon y se desalaron. El compuesto oligomérico de conjugado $GalNAc_4$-11 resultante se analizó mediante LC-MS y la masa observada era congruente con la estructura.

La parte del conglomerado de $GalNAc_4$ del grupo conjugado $GalNAc_4$-11 ($GalNAc_4$-11_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el resto escindible es -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-.

La estructura de $GalNAc_4$-11 ($GalNAc_4$-11_a-CM) se muestra a continuación:

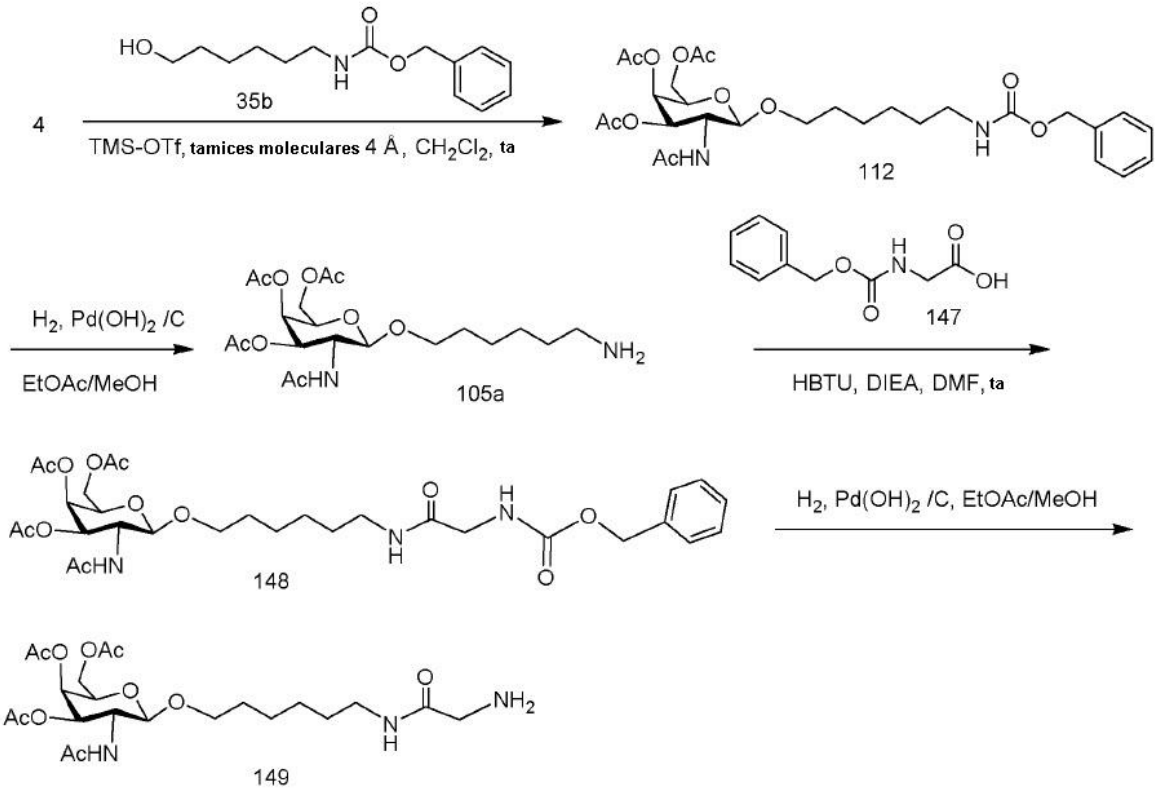


Ejemplo 51: Preparación del Oligonucleótido 155 que comprende $GalNAc_3$-6



145 146

El Compuesto 146 se sintetizó como se describe en la bibliografía (*Analytical Biochemistry* 1995, *229*, 54-60).



El compuesto 4 (15 g, 45,55 mmol) y el compuesto 35b (14,3 gramos, 57 mmol) se disolvieron en CH_2Cl_2 (200 ml). Se agregaron tamices moleculares (4 Å. 2 g, en polvo), y la reacción se dejó agitar durante 30 minutos bajo una atmósfera de nitrógeno. Se agregó TMS-OTf (4,1 ml, 22,77 mmol) y la reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante la noche. Al completar, la reacción se inactivó mediante el vertido en una solución de $NaHCO_3$ acuoso saturado (500 ml) y hielo molido (~ 150 g). La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró hasta un aceite naranja a presión reducida. El material en

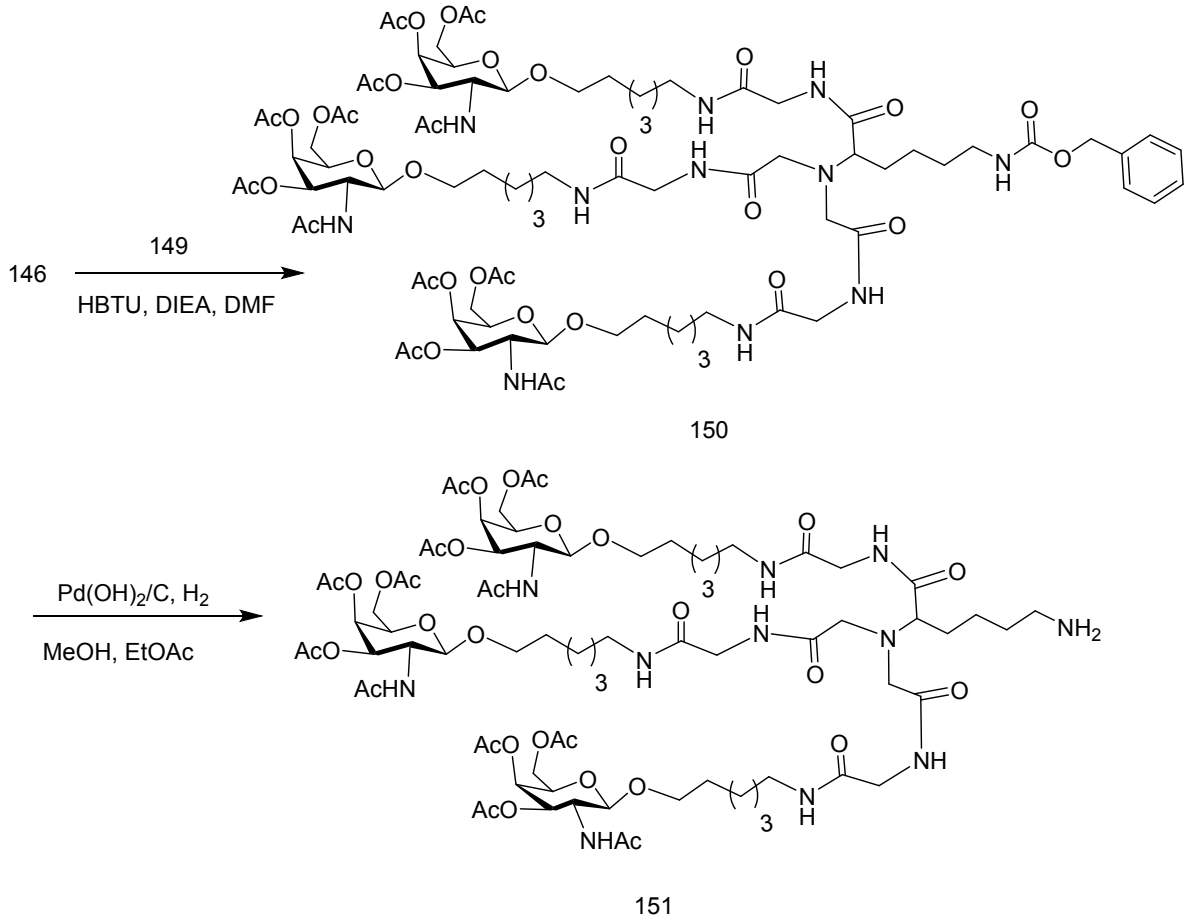
bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice y se eluyó con MeOH al 2-10 % en CH_2Cl_2 para proporcionar el Compuesto 112 (16,53 g, 63 %). La LCMS y ^1H NMR fueron coherentes con el compuesto previsto.

El Compuesto 112 (4,27 g, 7,35 mmol) se disolvió en 1:1 MeOH/EtOAc (40 ml). La mezcla de reacción se purgó mediante burbujeo de una corriente de argón a través de la solución durante 15 minutos. Se agregó catalizador de Pearlman (hidróxido de paladio en carbono, 400 mg), y se burbujeó hidrógeno a través de la solución durante 30 minutos. Tras completar (TLC MeOH al 10 % en CH_2Cl_2 y LCMS), el catalizador se retiró por filtración a través de una almohadilla de celite. El filtrado se concentró mediante evaporación rotatoria y se secó brevemente a alto vacío para proporcionar el Compuesto 105a (3,28 g). La LCMS y 1H NMR eran coherentes con el producto deseado.

El Compuesto 147 (2,31 g, 11 mmol) se disolvió en DMF anhidra (100 mL). Se agregó *N*,*N*-diisopropiletilamina (DIEA, 3,9 mL, 22 mmol), seguida de HBTU (4 g, 10,5 mmol). Se dejó agitar la mezcla de reacción durante ~ 15 minutos en nitrógeno. A esto se agregó una solución del compuesto 105a (3,3 g, 7,4 mmol) en DMF seca y se agitó durante 2 horas en una atmósfera de

nitrógeno. La reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con $NaHCO_3$ acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se separó, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentraron hasta alcanzar un jarabe anaranjado. El material en bruto se purificó mediante cromatografía en columna MeOH al 2-5 % en CH_2Cl_2 para proporcionar el Compuesto 148 (3,44 g, 73 %). La LCMS y ^1H NMR fueron coherentes con el producto previsto.

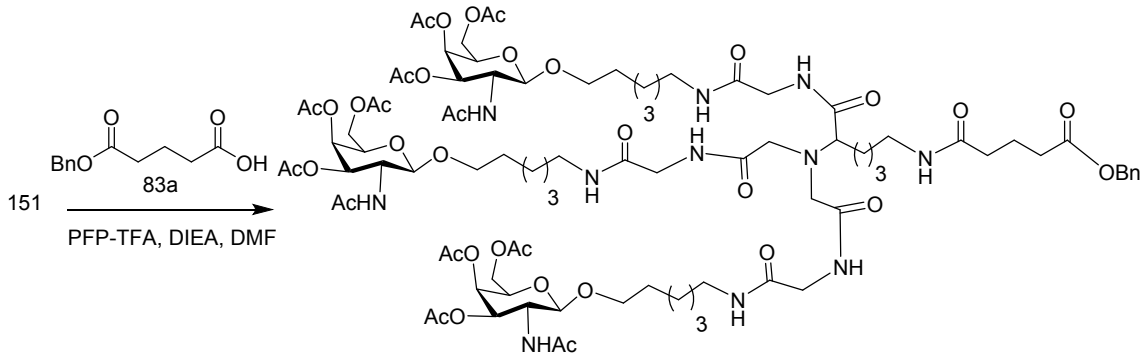
El Compuesto 148 (3,3 g, 5,2 mmol) se disolvió en 1:1 MeOH/EtOAc (75 ml). La mezcla de reacción se purgó mediante burbujeo de una corriente de argón a través de la solución durante 15 minutos. Se agregó el catalizador de Pearlman (hidróxido de paladio en carbono) (350 mg). Se burbujeó gas de hidrógeno a través de la solución durante 30 minutos. Tras completar (TLC MeOH al 10 % en DCM y LCMS), el catalizador se retiró por filtración a través de una almohadilla de celite. El filtrado se concentró mediante evaporación rotatoria y se secó brevemente a alto vacío para proporcionar el Compuesto 149 (2,6 g). La LCMS fue coherente con el producto deseado. El residuo se disolvió en DMF seca (10 ml) y se utilizó inmediatamente en la etapa siguiente.



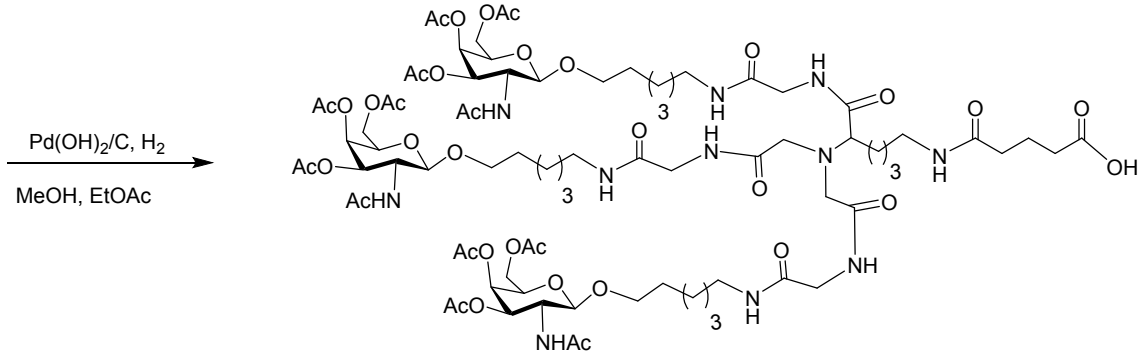
El Compuesto 146 (0,68 g, 1,73 mmol) se disolvió en DMF seca (20 ml). Se agregó a esto DIEA (450 µL, 2,6 mmol, 1,5 eq.) y HBTU (1,96 g, 0,5,2 mmol). Se dejó agitar la mezcla de reacción durante 15 minutos a temperatura ambiente en nitrógeno. Se agregó una solución del Compuesto 149 (2,6 g) en DMF anhidra (10 mL). El pH de la reacción se ajustó a pH = 9-10 mediante adición de DIEA (de ser necesario). Se dejó agitar a la reacción a temperatura ambiente en nitrógeno durante 2 horas. Tras completar la reacción, se diluyó con

EtOAc (100 mL) y se lavó con $NaHCO_3$ acuoso saturado, seguido por salmuera. La capa orgánica se separó, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice y se eluyó con MeOH al 2-10 % en CH_2Cl_2 para proporcionar el Compuesto 150 (0,62 g, 20 %). La LCMS y ^1H NMR fueron coherentes con el producto deseado.

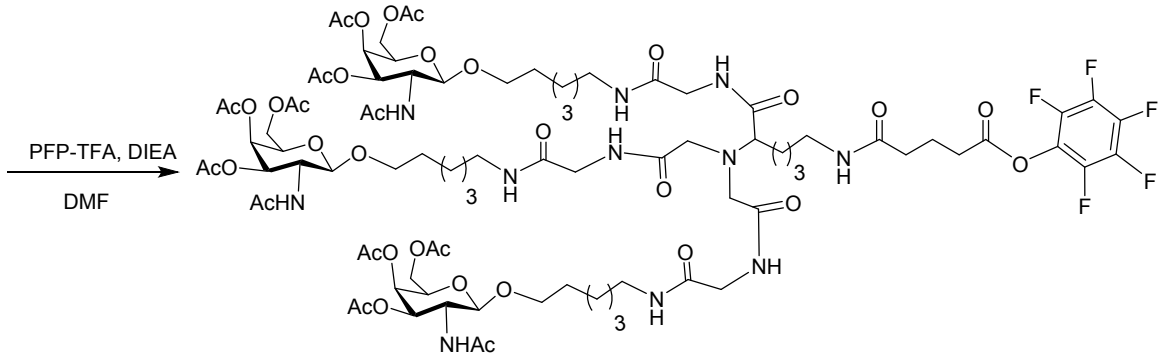
El Compuesto 150 (0,62 g) se disolvió en 1:1 MeOH/EtOAc (5 L). La mezcla de reacción se purgó mediante burbujeo de una corriente de argón a través de la solución durante 15 minutos. Se agregó el catalizador de Pearlman (hidróxido de paladio en carbono) (60 mg). Se burbujeó gas de hidrógeno a través de la solución durante 30 minutos. Tras completar (TLC MeOH al 10 % en DCM y LCMS), el catalizador se retiró por filtración (filtro de Teflón en punta de jeringa, 0,45 µm). El filtrado se concentró mediante evaporación rotatoria y se secó brevemente a alto vacío para proporcionar el Compuesto 151 (0,57 g). La LCMS fue coherente con el producto deseado. El producto se disolvió en 4 ml de DMF seca y se utilizó inmediatamente en la etapa siguiente.



152



153



154

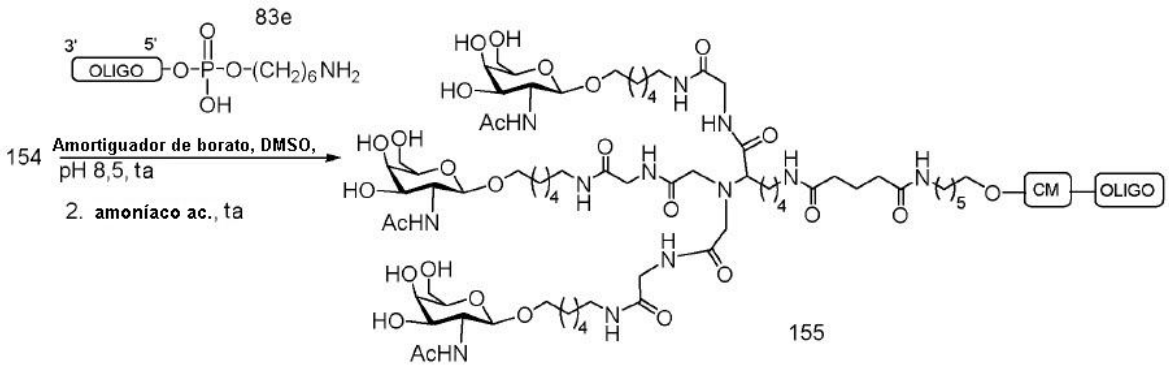
El Compuesto 83a (0,11 g, 0,33 mmol) se disolvió en DMF anhidra (5 mL) y se agregaron *N,N*-diisopropiletilamina (75 µL, 1 mmol) y PFP-TFA (90 µL, 0,76 mmol). La mezcla de reacción se tornó magenta con el contacto y gradualmente se

tornó anaranjada en los 30 minutos siguientes. Se monitoreó el progreso de la reacción mediante TLC y LCMS. Tras completar (formación del éster de PFP), se agregó una solución del compuesto 151 (0,57 g, 0,33 mmol) en DMF. El pH de la reacción se ajustó a pH = 9-10 mediante adición de *N,N*-diisopropiletilamina (de ser necesario). La mezcla de reacción se agitó en nitrógeno durante ~ 30 min. Tras completar, se quitó la mayoría del solvente a presión reducida. El residuo se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con $NaHCO_3$ acuoso saturado, seguido por salmuera. La fase orgánica se separó, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró hasta alcanzar un jarabe anaranjado. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (MeOH al 2-10 % en CH_2Cl_2) para proporcionar el Compuesto 152 (0,35 g, 55 %). La LCMS y ^1H NMR fueron coherentes con el producto deseado.

El Compuesto 152 (0,35 g, 0,182 mmol) se disolvió en 1:1 MeOH/EtOAc (10 mL). La mezcla de reacción se purgó mediante burbujeo de una corriente de argón a través de la solución durante 15 minutos. Se agregó el catalizador de Pearlman (hidróxido de paladio en carbono) (35 mg). Se burbujeó gas de hidrógeno a través de la solución durante 30 minutos. Tras completar (TLC MeOH al 10 % en DCM y LCMS), el catalizador se

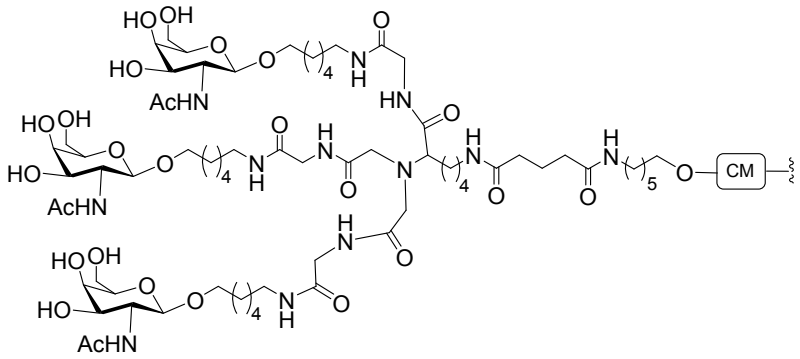
retiró por filtración (filtro de Teflón en punta de jeringa, 0,45 µm). El filtrado se concentró mediante evaporación rotatoria y se secó brevemente a alto vacío para proporcionar el Compuesto 153 (0,33 g, cuantitativo). La LCMS fue coherente con el producto deseado.

Se disolvió el Compuesto 153 (0,33 g, 0,18 mmol) en DMF anhidra (5 mL) con agitación en nitrógeno. A esto se agregó *N*,*N*-diisopropiletilamina (65 µL, 0,37 mmol) y PFP-TFA (35 µL, 0,28 mmol). La mezcla de reacción se agitó en nitrógeno durante ~ 30 min. La mezcla de reacción se tornó magenta al contacto y gradualmente se volvió anaranjada. El pH de la mezcla de reacción se mantuvo a pH = 9-10 mediante adición de más *N*,-Diisopropiletilamina. Se monitoreó el progreso de la reacción mediante TLC y LCMS. Tras completar, se quitó la mayoría del solvente a presión reducida. El residuo se diluyó con CH_2Cl_2 (50 mL) y se lavó con $NaHCO_3$ acuoso saturado, seguido por salmuera. La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró hasta alcanzar un jarabe anaranjado. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna y se eluyó con MeOH al 2-10 % en CH_2Cl_2 para proporcionar el Compuesto 154 (0,29 g, 79 %). La LCMS y ^{1}H NMR fueron coherentes con el producto deseado.

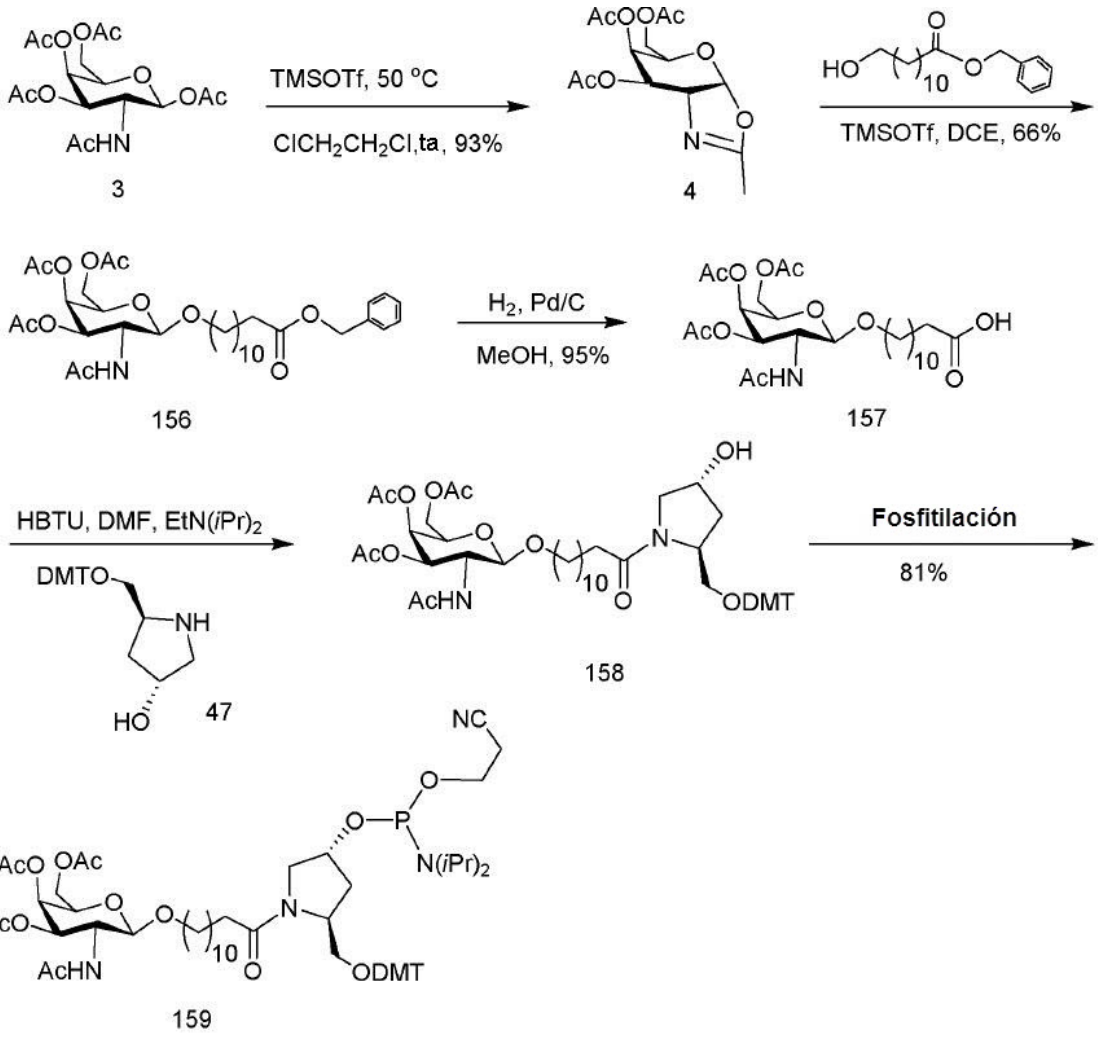


El Compuesto oligomérico 155, que comprende un grupo conjugado $GalNAc_3$-6, se preparó con los procedimientos generales ilustrados en el Ejemplo 46. La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-6 ($GalNAc_3$-6_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el resto escindible es -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-.

La estructura de $GalNAc_3$-6 ($GalNAc_3$-6_a-CM-) se muestra a continuación:



Ejemplo 52: Preparación del Oligonucleótido 160 que comprende $GalNAc_3$-9



El Compuesto 156 se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía (*J. Med. Chem.* 2004, *47*, 5798-5808).

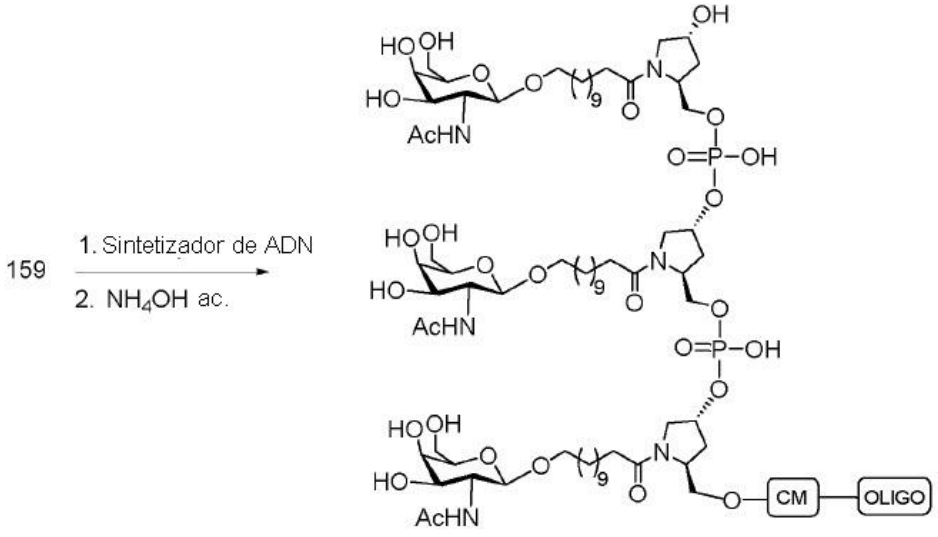
El Compuesto 156 (18,60 g, 29,28 mmol) se disolvió en metanol (200 mL). Se agregó paladio en carbono (6,15 g, 10 % en peso,

carga (base seca), polvo de matriz de carbono, húmedo). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente en hidrógeno durante 18 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite y la almohadilla de celite se lavó completamente con metanol. El filtrado combinado se lavó y concentró hasta estar seco. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice y se eluyó con metanol al 5-10 % en diclorometano para proporcionar el Compuesto 157 (14,26 g, 89 %). Masa *m/z* 544,1 $[M-H]^-$.

El Compuesto 157 (5 g, 9,17 mmol) se disolvió en DMF anhidra (30 mL). Se agregó HBTU (3,65 g, 9,61 mmol) y *N*,*N*-Diisopropiletilamina (13,73 mL, 78,81 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A esto se agregó una solución del compuesto 47 (2,96 g, 7,04 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas. La mezcla de reacción se vertió a una solución de $NaHCO_3$ acuoso saturado. La mezcla se extrajo con acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con salmuera y se secó (Na_2SO_4), filtró y evaporó. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice y se eluyó con acetato de etilo al 50 % en hexano para proporcionar el compuesto 158 (8,25g, 73,3 %). Se confirmó la estructura

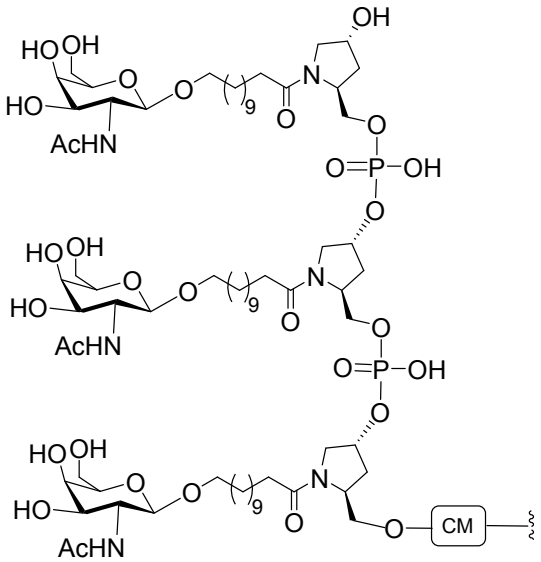
mediante análisis por ^{1}H NMR y MS.

El Compuesto 158 (7,2 g, 7,61 mmol) se secó en P_2O_5 a presión reducida. El compuesto secado se disolvió en DMF anhidro (50 mL). A esto se agregó 1H-tetrazol (0,43 g, 6,09 mmol), *N*-metilimidazol (0,3 mL, 3,81 mmol) y 2-cianoetil-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetraisopropil fosforodiamidita (3,65 mL, 11,50 mmol). La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de argón durante 4 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (200 mL). La mezcla de reacción se lavó con $NaHCO_3$ saturado y salmuera. Se separó la fase orgánica y se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice y se eluyó con acetato de etilo al 50-90 % en hexano para proporcionar el Compuesto 159 (7,82 g, 80,5 %). Se confirmó la estructura mediante análisis por ^{31}P NMR y LCMS.

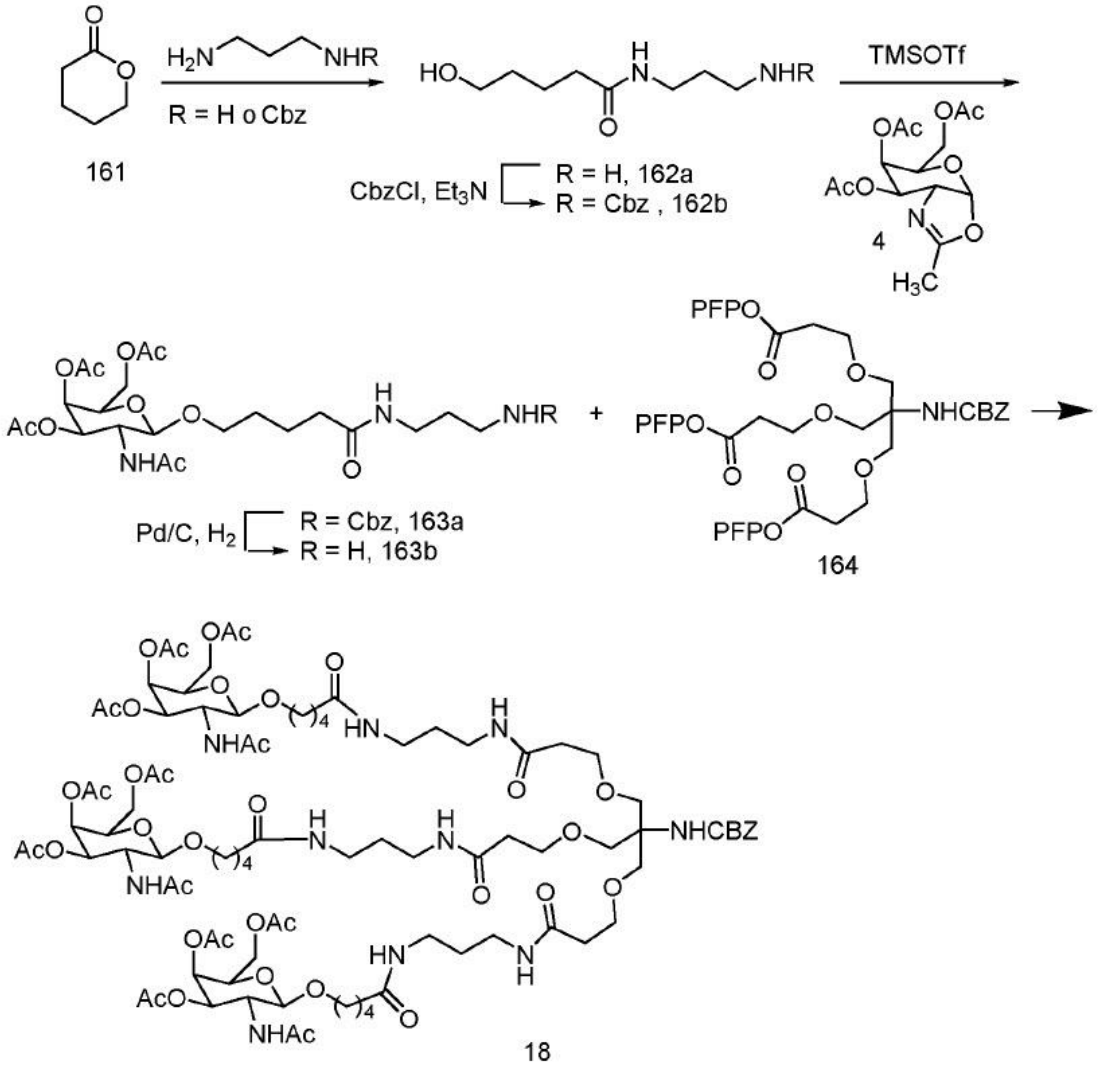


160

El Compuesto oligomérico 160 que comprende un grupo conjugado $GalNAc_3$-9 se preparó mediante procedimientos estándar de síntesis de oligonucleótidos. Se acoplaron tres unidades del compuesto 159 al soporte sólido, seguido por fosforamiditas de nucleótido. El tratamiento del compuesto oligomérico protegido con amoníaco acuoso proporcionó el compuesto 160. La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-9 ($GalNAc_3$-9_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el resto escindible es $-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-$. La estructura de $GalNAc_3$-9 ($GalNAc_3$-9_a-CM) se muestra a continuación:



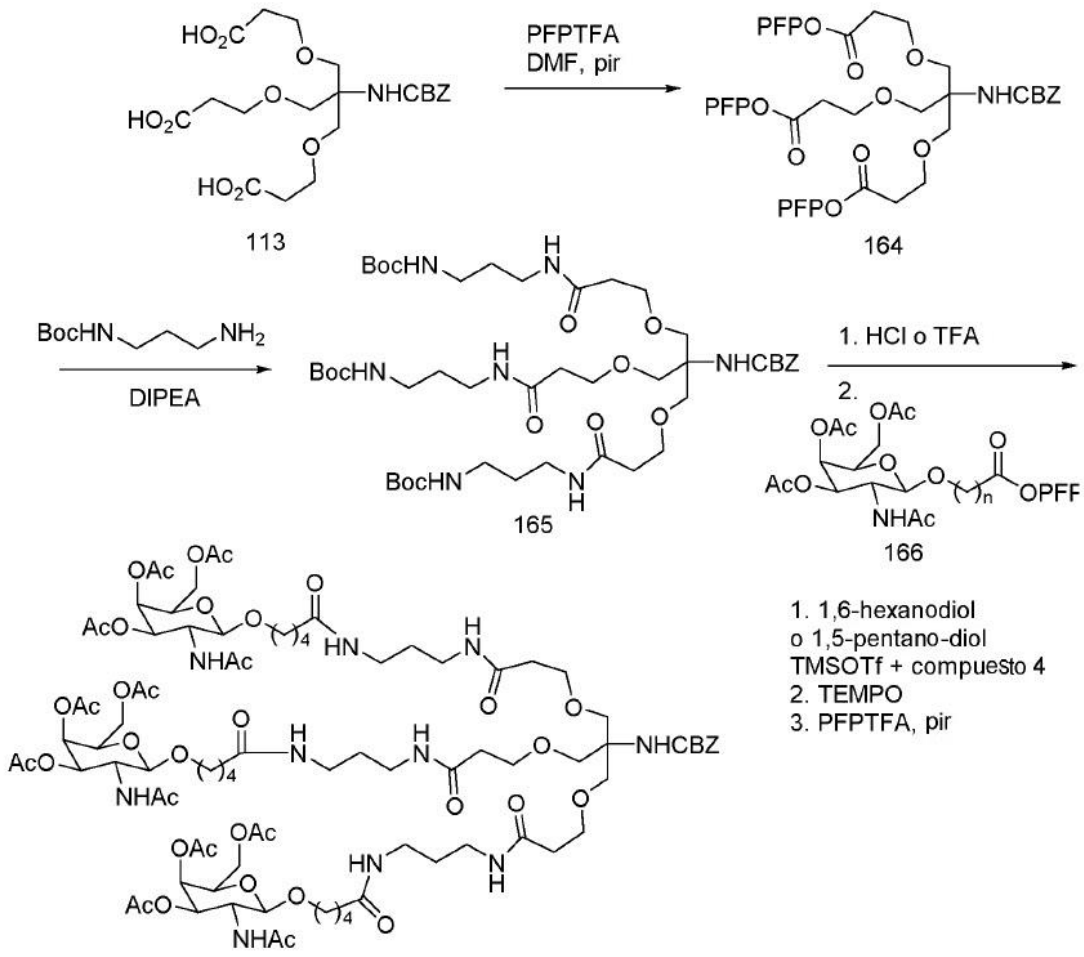
Ejemplo 53: Procedimiento alternativo para la preparación del Compuesto 18 ($GalNAc_3$-1a y $GalNAc_3$-3a)



Se hizo reaccionar a la lactona 161 con diamino propano (3-5 eq) o diamino propano protegido con Mono-Boc (1 eq) para proporcionar el alcohol 162a o 162b. Cuando se utilizó propanodiamina no protegida para la reacción antemencionada, se quitó el exceso de diamina mediante evaporación a alto vacío y el grupo amino libre en 162a se protegió con CbzCl

para proporcionar 162b como un sólido blanco tras purificación mediante cromatografía en columna. El alcohol 162b se hizo reaccionar adicionalmente con el compuesto 4 en presencia de TMSOTf para proporcionar 163a, el cual se convirtió en 163b mediante remoción del grupo Cbz mediante hidrogenación catalítica. El éster de pentafluorofenilo (PFP) 164 se preparó haciendo reaccionar el triácido 113 (ver Ejemplo 48) con PFPTFA (3,5 eq) y piridina (3,5 eq) en DMF (0,1 a 0,5 M). El triéster 164 se hizo reaccionar directamente con la amina 163b (3-4 eq) y DIPEA (3-4 eq) para proporcionar el Compuesto 18. El método antemencionado facilita de gran manera la purificación de intermedios y minimiza la formación de subproductos que se forman mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 4.

Ejemplo 54: Procedimiento alternativo para la preparación del Compuesto 18 ($GalNAc_3$-1a y $GalNAc_3$-3a)



18

El éster de triPFP 164 se preparó a partir del ácido 113 mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 53 antemencionado y se hizo reaccionar con diamina protegida con mono-Boc para proporcionar 165 en rendimiento esencialmente cuantitativo. Los grupos Boc se quitaron con ácido clorhídrico o ácido trifluoroacético para proporcionar la triamina que se hizo reaccionar con el ácido activado por PFP

166 en presencia de una base adecuada, tal como DIPEA, para proporcionar el Compuesto 18.

El ácido Gal-NAc 166 protegido por PFP se preparó a partir del ácido correspondiente mediante tratamiento con PFPTFA (1-1,2 eq) y piridina (1-1,2 eq) en DMF. El ácido precursor, en cambio, se preparó a partir del alcohol correspondiente mediante oxidación con TEMPO (0,2 eq) y BAIB en acetonitrilo y agua. El alcohol precursor se preparó a partir del intermedio de azúcar 4 mediante reacción con 1,6-hexanodiol (o 1,5-pentanodiol u otro diol para otros valores de n) (2-4 eq) y TMSOTf, utilizando condiciones descritas anteriormente en el ejemplo 47.

Ejemplo 55: Estudio dependiente de la dosis de oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado 3' o 5' (comparación de $GalNAc_3$-1, 3, 8 y 9) dirigidos a SRB-1 *in vivo*

Los oligonucleótidos enumerados a continuación se evaluaron en un estudio dependiente de la dosis en búsqueda de la inhibición antisentido de SRB-1 en ratones. Se incluyó ISIS 353382 sin conjugar como estándar. Cada uno de los grupos conjugados $GalNAc_3$ se unió al extremo 3' o 5' del

oligonucleótido respectivo mediante un nucleósido 2'-desoxiadenosina unido por fosfodiéster (resto escindible).

Tabla 39

ASO modificado dirigido a SRB-1

ASO	Secuencia (5' a 3')	Motivo	Conjugado	SEQ ID NO.
ISIS 353382 (original)	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{d}{}_{s}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	ninguno	830
ISIS 655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{d}{}_{s}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$**o$A_{do'}$-GalNAc$_3-1_a$**	5/10/5	**GalNAc$_3$-1**	830
ISIS 664078	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{d}{}_{s}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$**o$A_{do'}$-GalNAc$_3-9_a$**	5/10/5	**GalNAc$_3$-9**	830
ISIS 661161	**GalNAc$_3$-3$_a$-$_{o'}A_{do}$** $G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{d}{}_{s}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-3**	831
ISIS 665001	**GalNAc$_3$-8$_a$-$_{o'}A_{do}$** $G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{d}{}_{s}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-8**	831

Las mayúsculas indican la nucleobase para cada nucleósido y ^{m}C indica una 5-metilcitosina. Subíndices: "e" indica un nucleósido 2'-MOE modificado; "d" indica un β-D-2'-desoxirribonucleósido; "s" indica una unión internucleósido fosforotioato (PS); "o" indica una unión internucleósido fosfodiéster (PO); y "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. Los grupos conjugados están en negrita.

La estructura de $GalNAc_3$-1_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 9. La estructura de $GalNAc_3$-9 se mostró anteriormente en el Ejemplo 52. La estructura de $GalNAc_3$-3 se mostró anteriormente en el Ejemplo 39. La estructura de $GalNAc_3$-8 se mostró anteriormente en el Ejemplo 47.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones macho Balb/c de seis semanas (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una única vez con la dosificación que se muestra más adelante con ISIS 353382, 655861, 664078, 661161, 665001 o con solución salina. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones fueron sacrificados 72 horas después de la

administración final para determinar los niveles de ARNm de SRB-1 en el hígado mediante PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de SRB-1 para cada grupo de tratamiento, normalizados al control salino.

Tal como se ilustra en la Tabla 40, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de ARNm de SRB-1 de una forma dependiente de la dosis. En efecto, los oligonucleótidos antisentido que comprenden los conjugados $GalNAc_3$-1 y $GalNAc_3$-9 unidos por fosfodiéster en el extremo 3' (ISIS 655861 e ISIS 664078) y los conjugados $GalNAc_3$-3 y $GalNAc_3$-8 unidos en el extremo 5' (ISIS 661161 e ISIS 665001) mostraron una mejora sustancial de la potencia en comparación con el oligonucleótido antisentido no conjugado (ISIS 353382). Además, ISIS 664078, que comprende un conjugado $GalNAc_3$-9 en el extremo 3', era esencialmente equipotente en comparación con ISIS 655861, que comprende un conjugado $GalNAc_3$-1 en el extremo 3'. Los oligonucleótidos conjugados antisentido 5', ISIS 661161 e ISIS 665001, que comprenden un $GalNAc_3$-3 o $GalNAc_3$-9, respectivamente, tenían un aumento de potencia en comparación con los oligonucleótidos conjugados

antisentido 3' (ISIS 655861 e ISIS 664078).

Tabla 40

ASO que contienen $GalNAc_3$-1, 3, 8 o 9 dirigidos a SRB-1

N.° ISIS	**Dosificación (mg/kg)**	**ARNm de SRB-1 (% de solución salina)**	**Conjugado**
Solución salina	n/a	100	
353382	3	88	ninguno
	10	68	
	30	36	
655861	0,5	98	**$GalNac_3$-1** (3')
	1,5	76	
	5	31	
	15	20	
664078	0,5	88	**$GalNac_3$-9** (3')
	1,5	85	
	5	46	
	15	20	
661161	0,5	92	**$GalNac_3$-3** (5')
	1,5	59	
	5	19	
	15	11	

665001	0,5	100	**$GalNac_3$-8** (5')
	1,5	73	
	5	29	
	15	13	

Se midieron los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y transaminasa en hígado, en suero, con relación a ratones inyectados con solución salina, mediante protocolos estándar. También se evaluaron BUN y la bilirrubina total. El cambio de los pesos corporales se evaluó sin cambios significativos del grupo salino. Los valores de ALT, AST, bilirrubina total y BUN se muestran en la tabla a continuación.

Tabla 41

N.° ISIS	**Dosificación mg/kg**	**ALT**	**AST**	**Bilirrubina total**	**BUN**	**Conjugado**
Solución salina		24	59	0,1	37,52	
353382	3	21	66	0,2	34,65	ninguno
	10	22	54	0,2	34,2	
	30	22	49	0,2	33,72	

655861	0,5	25	62	0,2	30,65	**$GalNac_3$-1** (3')
	1,5	23	48	0,2	30,97	
	5	28	49	0,1	32,92	
	15	40	97	0,1	31,62	
664078	0,5	40	74	0,1	35,3	**$GalNac_3$-9** (3')
	1,5	47	104	0,1	32,75	
	5	20	43	0,1	30,62	
	15	38	92	0,1	26,2	
661161	0,5	101	162	0,1	34,17	**$GalNac_3$-3** (5')
	1,5 g	42	100	0,1	33,37	
	5 g	23	99	0,1	34,97	
	15	53	83	0,1	34,8	
665001	0,5	28	54	0,1	31,32	**$GalNac_3$-8** (5')
	1,5	42	75	0,1	32,32	
	5	24	42	0,1	31,85	
	15	32	67	0,1	31	

Ejemplo 56: Estudio dependiente de la dosis de oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado 3' o 5' (comparación de $GalNAc_3$-1, 2, 3, 5, 6, 7 y 10) dirigidos a SRB-1 *in vivo*

Los oligonucleótidos enumerados a continuación se evaluaron

en un estudio dependiente de la dosis en búsqueda de la inhibición antisentido de SRB-1 en ratones. Se incluyó ISIS 353382 sin conjugar como estándar. Cada uno de los varios grupos conjugados $GalNAc_3$ se unió en el extremo 5' del oligonucleótido respectivo mediante un nucleósido 2'-desoxiadenosina unido por fosfodiéster (resto escindible), salvo por ISIS 655861, que tenía el grupo conjugado $GalNAc_3$ unido en el extremo 3'.

Tabla 42

ASO modificado dirigido a SRB-1

ASO	Secuencia (5′ a 3′)	Motivo	**Conjugado**	SEQ ID NO.
ISIS 353382 (original)	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	Sin conjugado	829
ISIS 655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$**$_{o}A_{do'}$-GalNAc$_3-1_a$**	5/10/5	**GalNAc$_3$-1**	830

ISIS 664507	**$GalNAc_3$-2_a-$_{o'}A_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-2**	831
ISIS 661161	**$GalNAc_3$-3_a-$_{o'}A_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-3**	831
ISIS 666224	**$GalNAc_3$-5_a-$_{o'}A_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-5**	831
ISIS 666961	**$GalNAc_3$-6_a-$_{o'}A_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-6**	831
ISIS 666981	**$GalNAc_3$-7_a-$_{o'}A_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-7**	831

ISIS 666881	**$GalNAc_3$-10_a-$_{o'}A_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}_{s}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-10**	831

Las mayúsculas indican la nucleobase para cada nucleósido y ^{m}C indica una 5-metilcitosina. Subíndices: "e" indica un nucleósido 2'-MOE modificado; "d" indica un β-D-2'-desoxirribonucleósido; "s" indica una unión internucleósido fosforotioato (PS); "o" indica una unión internucleósido fosfodiéster (PO); y "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. Los grupos conjugados están en negrita.

La estructura de $GalNAc_3$-1_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 9. La estructura de $GalNAc_3$-2_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 37. La estructura de $GalNAc_3$-3_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 39. La estructura de $GalNAc_3$-5_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 49. La estructura de $GalNAc_3$-6_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 51. La estructura de $GalNAc_3$-7_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 48. La estructura de $GalNAc_3$-10_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 46.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones macho Balb/c de seis semanas (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una única vez con la dosificación que se muestra más adelante con ISIS 353382, 655861, 664507, 661161, 666224, 666961, 666981, 666881 o con solución salina. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones fueron sacrificados 72 horas después de la administración final para determinar los niveles de ARNm de SRB-1 en el hígado mediante PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de SRB-1 para cada grupo de tratamiento, normalizados al control salino.

Tal como se ilustra en la Tabla 43, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de ARNm de SRB-1 de una forma dependiente de la dosis. En efecto, los oligonucleótidos antisentido conjugados mostraron una mejora sustancial en la potencia, en comparación con el oligonucleótido antisentido no conjugado (ISIS 353382). Los

oligonucleótidos antisentido conjugados 5’ mostraron un ligero aumento de la potencia en comparación con el oligonucleótido antisentido conjugado 3'.

Tabla 43

N.° ISIS	**Dosificación (mg/kg)**	**ARNm de SRB-1 (% de solución salina)**	**Conjugado**
Solución salina	n/a	100,0	
353382	3	96,0	ninguno
	10	73,1	
	30	36,1	
655861	0,5	99,4	**$GalNac_3$-1** (3')
	1,5	81,2	
	5	33,9	
	15	15,2	
664507	0,5	102,0	**$GalNac_3$-2** (5')
	1,5	73,2	
	5	31,3	
	15	10,8	
661161	0,5	90,7	**$GalNac_3$-3** (5')
	1,5	67,6	
	5	24,3	
	15	11,5	

666224	0,5	96,1	**GalNac$_3$-5** (5')
	1,5	61,6	
	5	25,6	
	15	11,7	
666961	0,5	85,5	**GalNAc$_3$-6** (5')
	1,5	56,3	
	5	34,2	
	15	13,1	
666981	0,5	84,7	**GalNAc$_3$-7** (5')
	1,5	59,9	
	5	24,9	
	15	8,5	
666881	0,5	100,0	**GalNAc$_3$-10** (5')
	1,5	65,8	
	5	26,0	
	15	13,0	

Se midieron los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y transaminasa en hígado, en suero, con relación a ratones inyectados con solución salina, mediante protocolos estándar. También se evaluaron BUN y la bilirrubina total. El cambio de los pesos corporales se evaluó sin cambios significativos del grupo salino. Los

valores de ALT, AST, bilirrubina total y BUN se muestran en la Tabla 44 a continuación.

Tabla 44

N.° ISIS	**Dosificación mg/kg**	**ALT**	**AST**	**Bilirrubina total**	**BUN**	**Conjugado**
Solución salina		26	57	0,2	27	
353382	3	25	92	0,2	27	ninguno
	10	23	40	0,2	25	
	30	29	54	0,1	28	
655861	0,5	25	71	0,2	34	**$GalNac_3$-1** (3')
	1,5	28	60	0,2	26	
	5	26	63	0,2	28	
	15	25	61	0,2	28	
664507	0,5	25	62	0,2	25	**$GalNac_3$-2** (5')
	1,5	24	49	0,2	26	
	5	21	50	0,2	26	
	15	59	84	0,1	22	
661161	0,5	20	42	0,2	29	**$GalNac_3$-3** (5')
	1.5 g	37	74	0,2	25	
	5 g	28	61	0,2	29	
	15	21	41	0,2	25	

666224	0,5	34	48	0,2	21	**GalNac$_3$-5** (5')
	1,5	23	46	0,2	26	
	5	24	47	0,2	23	
	15	32	49	0,1	26	
666961	0,5	17	63	0,2	26	**GalNAc$_3$-6** (5')
	1,5	23	68	0,2	26	
	5	25	66	0,2	26	
	15	29	107	0,2	28	
666981	0,5	24	48	0,2	26	**GalNAc$_3$-7** (5')
	1,5	30	55	0,2	24	
	5	46	74	0,1	24	
	15	29	58	0,1	26	
666881	0,5	20	65	0,2	27	**GalNAc$_3$-10** (5')
	1,5	23	59	0,2	24	
	5	45	70	0,2	26	
	15	21	57	0,2	24	

Ejemplo 57: Duración del estudio de acción de oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado en la posición 3' dirigido a ApoC III *in vivo*

Los ratones fueron inyectados una vez con las dosis indicadas a continuación y se monitorearon en el transcurso de 42 días

para los niveles de ApoC-III y triglicéridos en plasma (TG en plasma). El estudio se realizó con 3 ratones transgénicos que expresan la APOC-III humana en cada grupo.

Tabla 45

ASO modificado dirigido a ApoC III

ASO	Secuencia (5′ a 3′)	Uniones	SEQ ID NO.
ISIS 304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	PS	821
ISIS 647535	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$- **$GalNAc_3$-$1_a$**	PS	822
ISIS 647536	$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$- **$GalNAc_3$-$1_a$**	PO/PS	822

Las mayúsculas indican la nucleobase para cada nucleósido y ^{m}C indica una 5-metilcitosina. Subíndices: “e” indica un nucleósido 2′-MOE modificado; “d” indica un β-D-2′-desoxirribonucleósido; “s” indica una unión internucleósido

fosforotioato (PS); "o" indica una unión internucleósido fosfodiéster (PO); y "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. Los grupos conjugados están en negrita.

La estructura de $GalNAc_3$-1_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 9.

Tabla 46

Niveles de ARNm de ApoC III (% de solución salina en el Día 1) y TG en plasma (% de solución salina en el Día 1)

ASO	Dosis	Objetivo	Día 3	Día 7	Día 14	Día 35	Día 42
Solución salina	0 mg/kg	ApoC-III	98	100	100	95	116
ISIS 304801	30 mg/kg	ApoC-III	28	30	41	65	74
ISIS 647535	10 mg/kg	ApoC-III	16	19	25	74	94
ISIS 647536	10 mg/kg	ApoC-III	18	16	17	35	51
Solución salina	0 mg/kg	TG en plasma	121	130	123	105	109

ISIS 304801	30 mg/kg	TG en plasma	34	37	50	69	69
ISIS 647535	10 mg/kg	TG en plasma	18	14	24	18	71
ISIS 647536	10 mg/kg	TG en plasma	21	19	15	32	35

Tal como puede observarse en la tabla que antecede, la duración de la acción aumentó con la adición del grupo conjugado en la posición 3' en comparación con el oligonucleótido no conjugado. Hubo un aumento adicional de la duración de la acción para el oligonucleótido PO/PS conjugado mixto 647536, en comparación con el oligonucleótido PS conjugado completo 647535.

Ejemplo 58: Estudio dependiente de la dosis de oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado en 3' (comparación de $GalNAc_3$-1 y $GalNAc_4$-11) dirigidos a SRB-1 *in vivo*

Los oligonucleótidos enumerados a continuación se evaluaron en un estudio dependiente de la dosis en búsqueda de la inhibición antisentido de SRB-1 en ratones. Se incluyó ISIS 440762 no conjugado como estándar no conjugado. Cada uno de

los grupos conjugados se unió al extremo 3' del oligonucleótido respectivo mediante un resto escindible nucleósido 2'-desoxiadenosina unido por fosfodiéster.

La estructura de $GalNAc_3$-1_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 9. La estructura de $GalNAc_3$-11_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 50.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones macho Balb/c de seis semanas (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una única vez con la dosificación que se muestra más adelante con ISIS 440762, 651900, 663748 o con solución salina. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones fueron sacrificados 72 horas después de la administración final para determinar los niveles de ARNm de SRB-1 en el hígado mediante PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de SRB-1 para cada grupo de tratamiento, normalizados al control salino.

Tal como se ilustra en la Tabla 47, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de ARNm de SRB-1 de una forma dependiente de la dosis. Los oligonucleótidos antisentido que comprenden los conjugados $GalNAc_3$-1 y $GalNAc_4$-11 unidos por fosfodiéster en el extremo 3' (ISIS 651900 e ISIS 663748) mostraron una mejora sustancial de la potencia en comparación con el oligonucleótido antisentido no conjugado (ISIS 440762). Los dos oligonucleótidos conjugados, $GalNAc_3$-1 y $GalNAc_4$-11, fueron equipotentes.

Tabla 47

ASO modificado dirigido a SRB-1

ASO	Secuencia (5’ a 3’)	Dosis mg/kg	% de control salino	SEQ ID NO.
Solución salina			100	
ISIS 440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	0,6	73,45	823
		2	59,66	
		6	23,50	

ISIS 651900	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ko}\mathbf{A_{do}}$'-**GalNAc$_3-1_a$**	0,2	62,75	824
		0,6	29,14	
		2	8,61	
		6	5,62	
ISIS 663748	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ko}\mathbf{A_{do}}$'-**GalNAc$_4-11_a$**	0,2	63,99	824
		0,6	33,53	
		2	7,58	
		6	5,52	

Las mayúsculas indican la nucleobase para cada nucleósido y ^{m}C indica una 5-metilcitosina. Subíndices: "e" indica un nucleósido 2'-MOE modificado; "k" indica un nucleósido bicíclico 6'-*(S)*-CH_3; "d" indica un β-D-2'-desoxirribonucleósido; "s" indica una unión internucleósido fosforotioato (PS); "o" indica una unión internucleósido fosfodiéster (PO); y "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. Los grupos conjugados están en negrita.

Se midieron los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y transaminasa en hígado, en suero, con relación a ratones inyectados con solución salina,

mediante protocolos estándar. También se evaluaron BUN y la bilirrubina total. El cambio de los pesos corporales se evaluó sin cambios significativos del grupo salino. Los valores de ALT, AST, bilirrubina total y BUN se muestran en la Tabla 48 a continuación.

Tabla 48

N.° ISIS	**Dosificación mg/kg**	**ALT**	**AST**	**Bilirrubina total**	**BUN**	**Conjugado**
Solución salina		30	76	0,2	40	
440762	0,60	32	70	0,1	35	ninguno
	2	26	57	0,1	35	
	6	31	48	0,1	39	
651900	0,2	32	115	0,2	39	**$GalNac_3$-1** (3')
	0,6	33	61	0,1	35	
	2	30	50	0,1	37	
	6	34	52	0,1	36	
663748	0,2	28	56	0,2	36	**$GalNac_4$-11** (3')
	0,6	34	60	0,1	35	
	2	44	62	0,1	36	
	6	38	71	0,1	33	

Ejemplo 59: Efectos de ASO conjugados con $GalNAc_3$-1 dirigidos a FXI *in vivo*

Los oligonucleótidos enumerados a continuación se evaluaron en un estudio de múltiples dosis en búsqueda de la inhibición antisentido de FXI en ratones. Se incluyó ISIS 404071 como estándar no conjugado. Cada uno de los grupos conjugados se unió al extremo 3' del oligonucleótido respectivo mediante un resto escindible nucleósido 2'-desoxiadenosina unido por fosfodiéster.

Tabla 49

ASO modificados dirigidos a FXI

ASO	Secuencia (5’ a 3’)	Uniones	SEQ ID NO.
ISIS 404071	$T_{es}G_{es}G_{es}T_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}G_{es}A_{es}G_{es}G_{e}$	PS	832
ISIS 656172	$T_{es}G_{es}G_{es}T_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}G_{es}A_{es}G_{es}G_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-**$GalNAc_3$-$1_a$**	PS	833
ISIS 656173	$T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-	PO/PS	833

Las mayúsculas indican la nucleobase para cada nucleósido y ^{m}C indica una 5-metilcitosina. Subíndices: "e" indica un nucleósido 2'-MOE modificado; "d" indica un β-D-2'-desoxirribonucleósido; "s" indica una unión internucleósido fosforotioato (PS); "o" indica una unión internucleósido fosfodiéster (PO); y "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. Los grupos conjugados están en negrita.

La estructura de $GalNAc_3$-1_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 9.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones macho Balb/c de seis semanas (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) dos veces por semana durante 3 semanas con la dosificación que se muestra más adelante con ISIS 404071, 656172, 656173 o con control tratado con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones fueron sacrificados 72 horas después de la administración final para determinar los niveles de ARNm de FXI en el hígado mediante PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los niveles de proteína FXI en plasma también se midieron con

ELISA. Los niveles de FXI de ARNm se determinaron en comparación con el ARN total (mediante RIBOGREEN®), antes de la normalización con el control tratado con PBS. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de FXI para cada grupo de tratamiento. Los datos se normalizaron al control tratado con PBS y se denota como "% PBS". Las ED_{50} se midieron mediante métodos similares tal como se describió anteriormente y se presentan a continuación.

Tabla 50

ARNm de Factor XI (% de solución salina)

ASO	Dosis mg/kg	% de control	Conjugado	Uniones
Solución salina		100	ninguno	
ISIS 404071	3	92	ninguno	PS
	10	40		
	30	15		
ISIS 656172	0,7	74	**$GalNAc_3$-1**	PS
	2	33		
	6	9		

ISIS 656173	0,7	49	**$GalNAc_3$-1**	PO/PS
	2	22		
	6	1		

Tal como se ilustra en la Tabla 50, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de ARNm de FXI de una forma dependiente de la dosis. Los oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado 3'-$GalNAc_3$-1 mostraron una mejora sustancial de la potencia en comparación con el oligonucleótido antisentido no conjugado (ISIS 404071). Se proporcionó adicionalmente una mejora de la potencia entre los dos oligonucleótidos conjugados mediante la sustitución de algunas de las uniones PS con PO (ISIS 656173).

Tal como se ilustra en la Tabla 50a, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de proteína de FXI de una forma dependiente de la dosis. Los oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado 3'-$GalNAc_3$-1 mostraron una mejora sustancial de la potencia en comparación con el oligonucleótido antisentido no conjugado (ISIS 404071). Se proporcionó adicionalmente una mejora de la potencia entre los dos oligonucleótidos conjugados mediante la sustitución de algunas de las uniones PS con PO (ISIS

656173).

Tabla 50a

Proteína de Factor XI (% de solución salina)

ASO	Dosis mg/kg	Proteína (% de control)	Conjugado	Uniones
Solución salina		100	ninguno	
ISIS 404071	3	127	ninguno	PS
	10	32		
	30	3		
ISIS 656172	0,7	70	**$GalNAc_3$-1**	PS
	2	23		
	6	1		
ISIS 656173	0,7	45	**$GalNAc_3$-1**	PO/PS
	2	6		
	6	0		

Se midieron los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y transaminasa en hígado, en suero, con relación a ratones inyectados con solución salina, mediante protocolos estándar. También se evaluaron CRE, BUN, la bilirrubina total y la albúmina total. El cambio de los

pesos corporales se evaluó sin cambios significativos del grupo salino. Los valores de ALT, AST, bilirrubina total y BUN se muestran en la tabla a continuación.

Tabla 51

N.° ISIS	Dosificación mg/kg	ALT	AST	Albúmina total	Bilirrubina total	CRE	BUN	Conjugado
Solución salina		71,8	84,0	3,1	0,2	0,2	22,9	
404071	3	152,8	176,0	3,1	0,3	0,2	23,0	ninguno
	10	73,3	121,5	3,0	0,2	0,2	21,4	
	30	82,5	92,3	3,0	0,2	0,2	23,0	
656172	0,7	62,5	111,5	3,1	0,2	0,2	23,8	**$GalNac_3$-1** (3')
	2	33,0	51,8	2,9	0,2	0,2	22,0	
	6	65,0	71,5	3,2	0,2	0,2	23,9	
656173	0,7	54,8	90,5	3,0	0,2	0,2	24,9	**$GalNac_3$-1** (3')
	2	85,8	71,5	3,2	0,2	0,2	21,0	
	6	114,0	101,8	3,3	0,2	0,2	22,7	

Ejemplo 60: Efectos de ASO conjugados dirigidos a SRB-1 *in vitro*

Los oligonucleótidos enumerados a continuación se evaluaron en un estudio de múltiples dosis en búsqueda de la inhibición antisentido de SRB-1 en hepatocitos primarios de ratón. Se incluyó ISIS 353382 como estándar no conjugado. Cada uno de los grupos conjugados se unió al extremo 3' o 5' del

oligonucleótido respectivo mediante un resto escindible nucleósido 2'-desoxiadenosina unido por fosfodiéster.

Tabla 52

ASO modificado dirigido a SRB-1

ASO	**Secuencia (5′ a 3′)**	**Motivo**	**Conjugado**	**SEQ ID NO.**
ISIS 353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	ninguno	829
ISIS 655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-1**	830
ISIS 655862	$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-1**	830
ISIS 661161	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}3_{a\text{-}o'}A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-3**	831
ISIS 665001	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}8_{a\text{-}o'}A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-8**	831
ISIS 664078	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}9_a}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-9**	830
ISIS 666961	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}6_{a}\text{-}_{o'}A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-6**	831

ISIS 664507	**$GalNAc_3$-2_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-2**	831
ISIS 666881	**$GalNAc_3$-10_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-10**	831
ISIS 666224	**$GalNAc_3$-5_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-5**	831
ISIS 666981	**$GalNAc_3$-7_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-7**	831

Las mayúsculas indican la nucleobase para cada nucleósido y ^{m}C indica una 5-metilcitosina. Subíndices: "e" indica un nucleósido 2'-MOE modificado; "d" indica un β-D-2'-desoxirribonucleósido; "s" indica una unión internucleósido fosforotioato (PS); "o" indica una unión internucleósido fosfodiéster (PO); y "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. Los grupos conjugados están en negrita.

La estructura de $GalNAc_3$-1_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 9. La estructura de $GalNAc_3$-3a se mostró anteriormente en el Ejemplo 39. La estructura de $GalNAc_3$-8a

se mostró anteriormente en el Ejemplo 47. La estructura de $GalNAc_3$-9a se mostró anteriormente en el Ejemplo 52. La estructura de $GalNAc_3$-6a se mostró anteriormente en el Ejemplo 51. La estructura de $GalNAc_3$-2a se mostró anteriormente en el Ejemplo 37. La estructura de $GalNAc_3$-10a se mostró anteriormente en el Ejemplo 46. La estructura de $GalNAc_3$-5a se mostró anteriormente en el Ejemplo 49. La estructura de $GalNAc_3$-7a se mostró anteriormente en el Ejemplo 48.

Tratamiento

Los oligonucleótidos enumerados anteriormente se evaluaron *in vitro* en células de hepatocitos primarios de ratón a una densidad de 25.000 células por pocillo y se trataron con el oligonucleótido modificado 0,03, 0,08, 0,24, 0,74, 2,22, 6,67 o 20 nM. Después del período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, se aisló el ARN de las células y se midieron los niveles de ARNm mediante PCR cuantitativa en tiempo real y los niveles de ARNm de SRB-1 se ajustaron de acuerdo al contenido de ARN total, según se midió mediante RIBOGREEN®.

Se calculó la IC_{50} usando los métodos estándar y los

resultados se presentan en la Tabla 53. Los resultados demuestran que, en condiciones de absorción libre en las cuales no se utilizaron técnicas de electroporación ni reactivos para promover artificialmente la entrada de los oligonucleótidos a las células, los oligonucleótidos que comprendían un conjugado GalNAc eran significativamente más potentes en los hepatocitos que el oligonucleótido original (ISIS 353382) que no comprende un conjugado GalNAc.

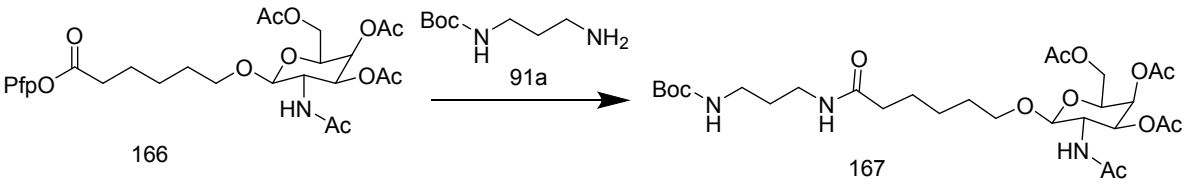
Tabla 53

ASO	**IC_{50} (nM)**	**Uniones internucleósido**	**Conjugado**	**SEQ ID NO.**
ISIS 353382	190[a]	PS	ninguno	829
ISIS 655861	11[a]	PS	**$GalNAc_3$-1**	830
ISIS 655862	3	PO/PS	**$GalNAc_3$-1**	830
ISIS 661161	15[a]	PS	**$GalNAc_3$-3**	831
ISIS 665001	20	PS	**$GalNAc_3$-8**	831

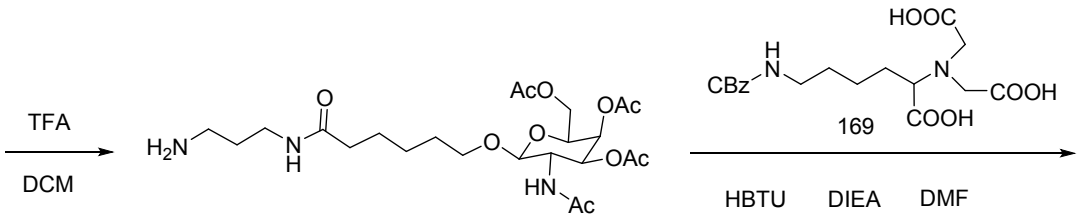
ISIS 664078	55	PS	**$GalNAc_3$-9**	830
ISIS 666961	22[a]	PS	**$GalNAc_3$-6**	831
ISIS 664507	30	PS	**$GalNAc_3$-2**	831
ISIS 666881	30	PS	**$GalNAc_3$-10**	831
ISIS 666224	30[a]	PS	**$GalNAc_3$-5**	831
ISIS 666981	40	PS	**$GalNAc_3$-7**	831

[a]Promedio de múltiples rondas.

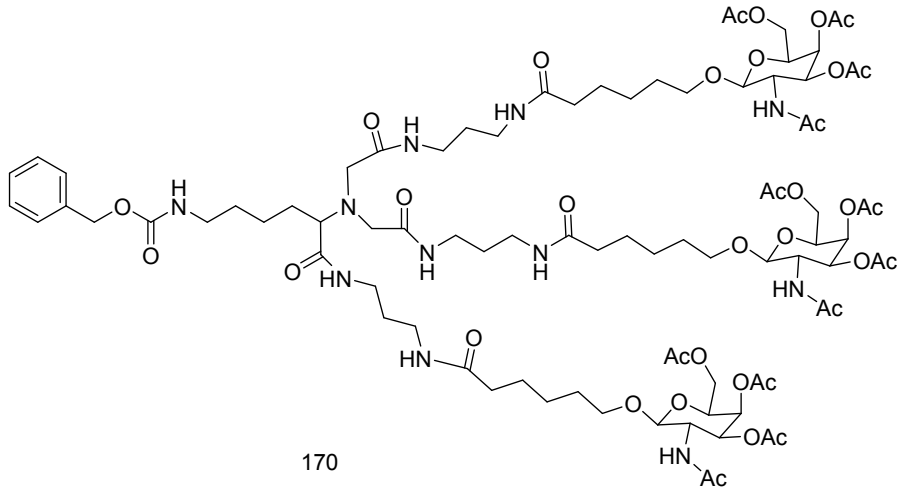
Ejemplo 61: Preparación del compuesto oligomérico 175 que comprende $GalNAc_3$-12



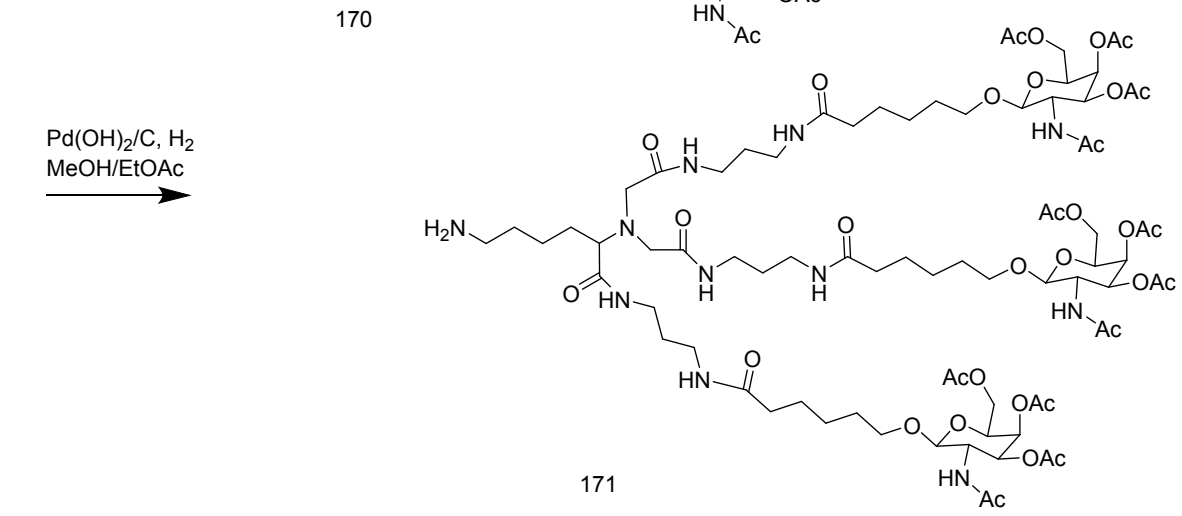
166 167



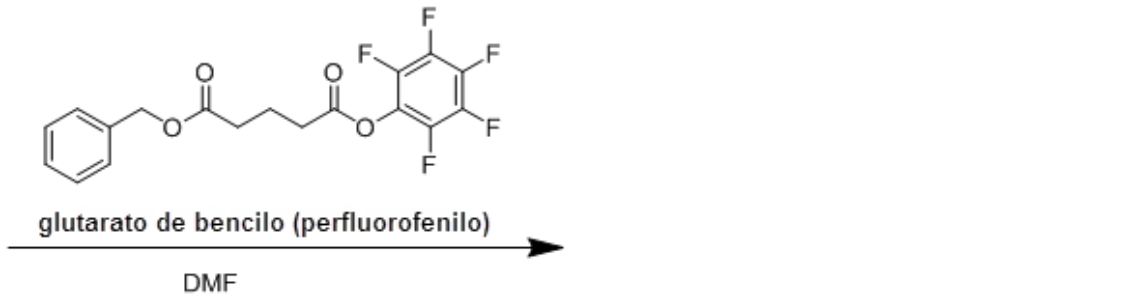
168 169

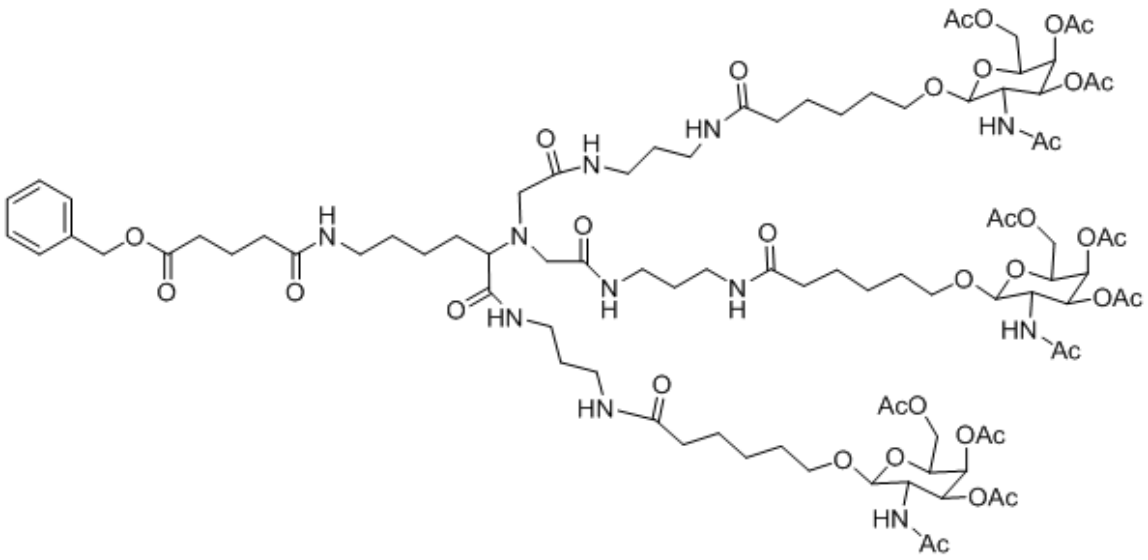


170

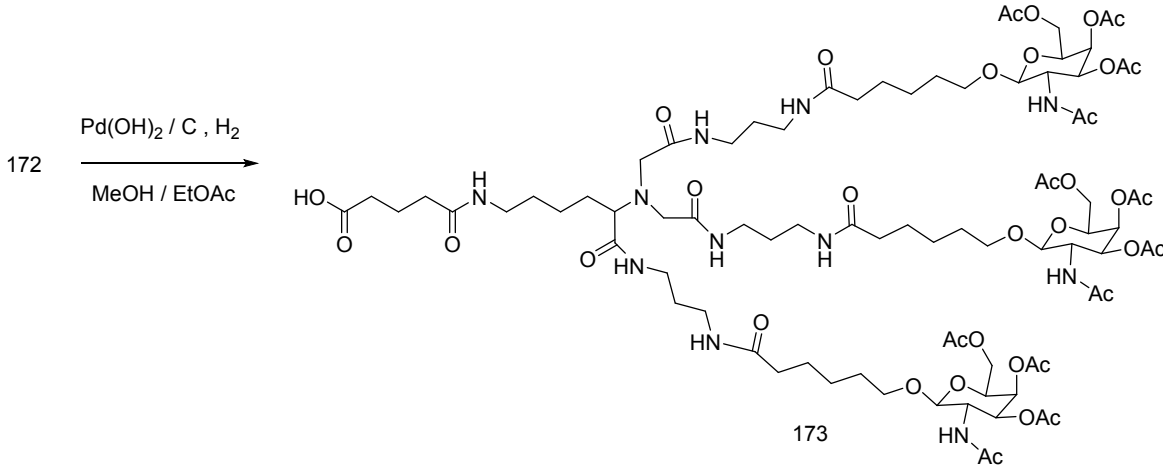


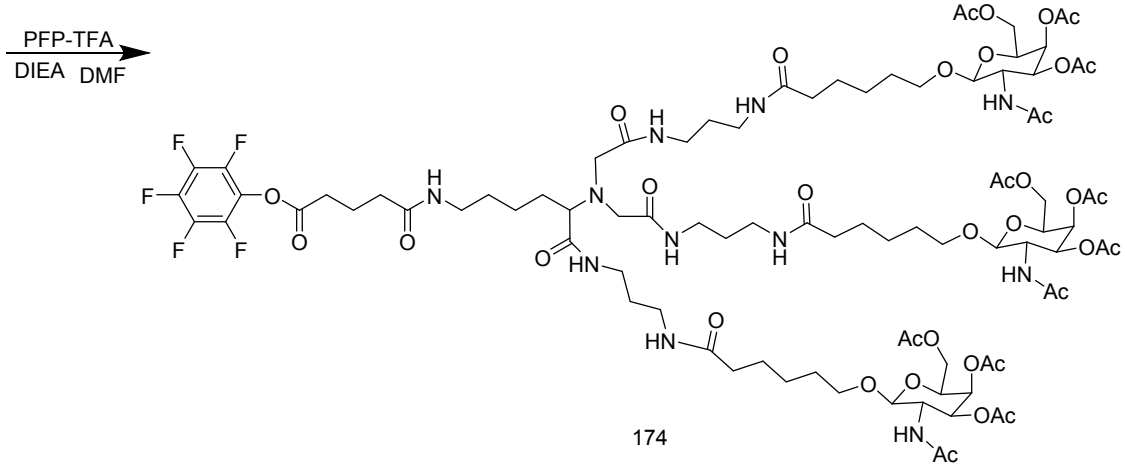
171

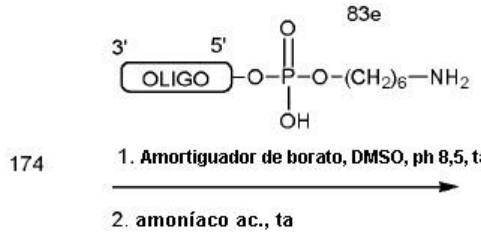


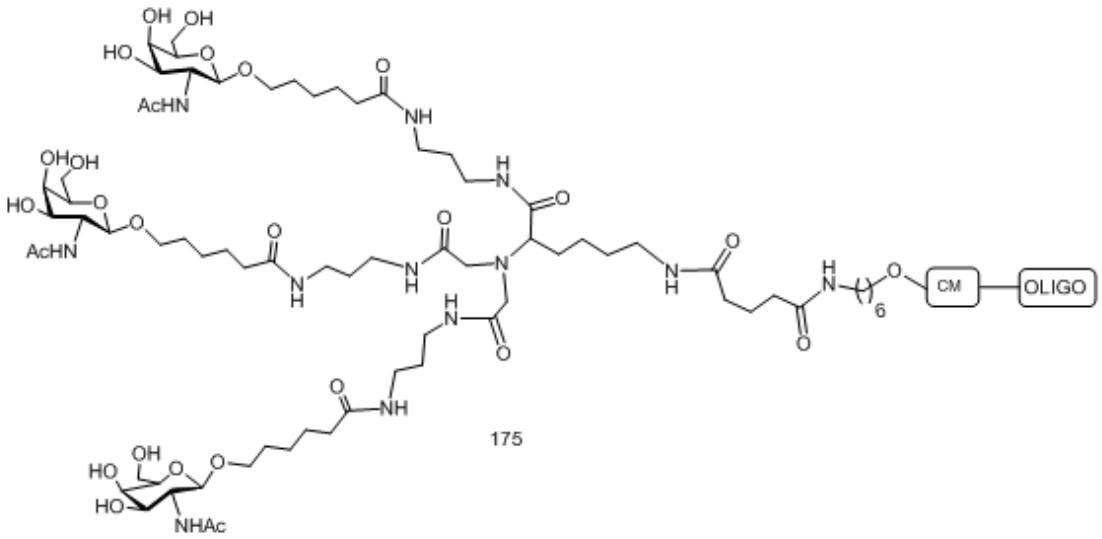


172


172
Pd(OH)2 / C , H2
MeOH / EtOAc
173

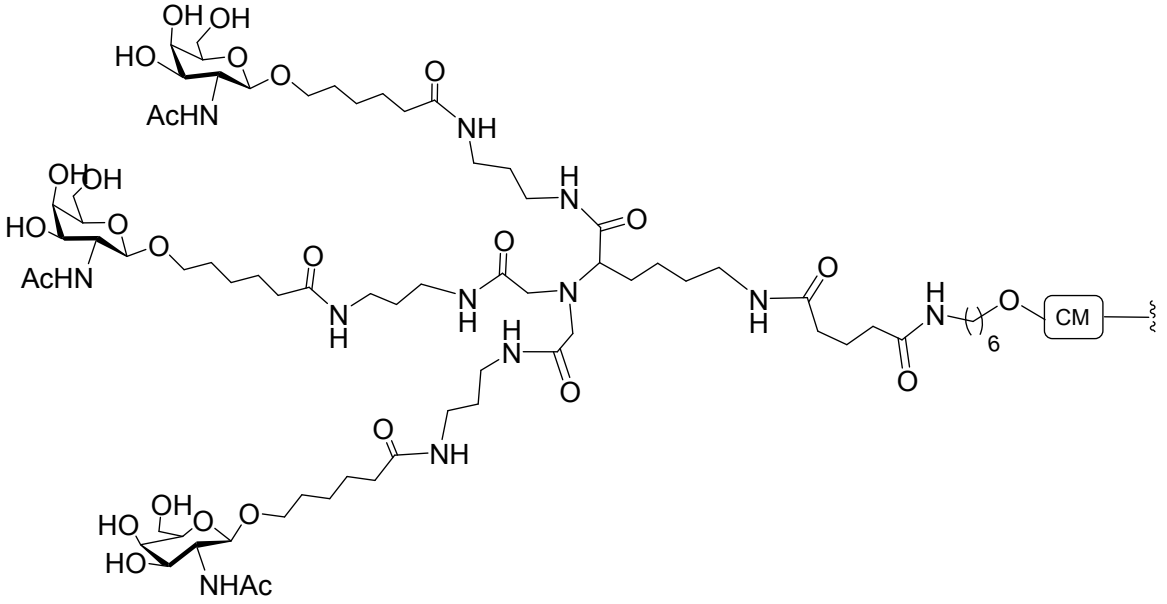

PFP-TFA
DIEA DMF
174


83e
3'
5'
OLIGO
OH
174
1. Amortiguador de borato, DMSO, ph 8,5, ta
2. amoníaco ac., ta

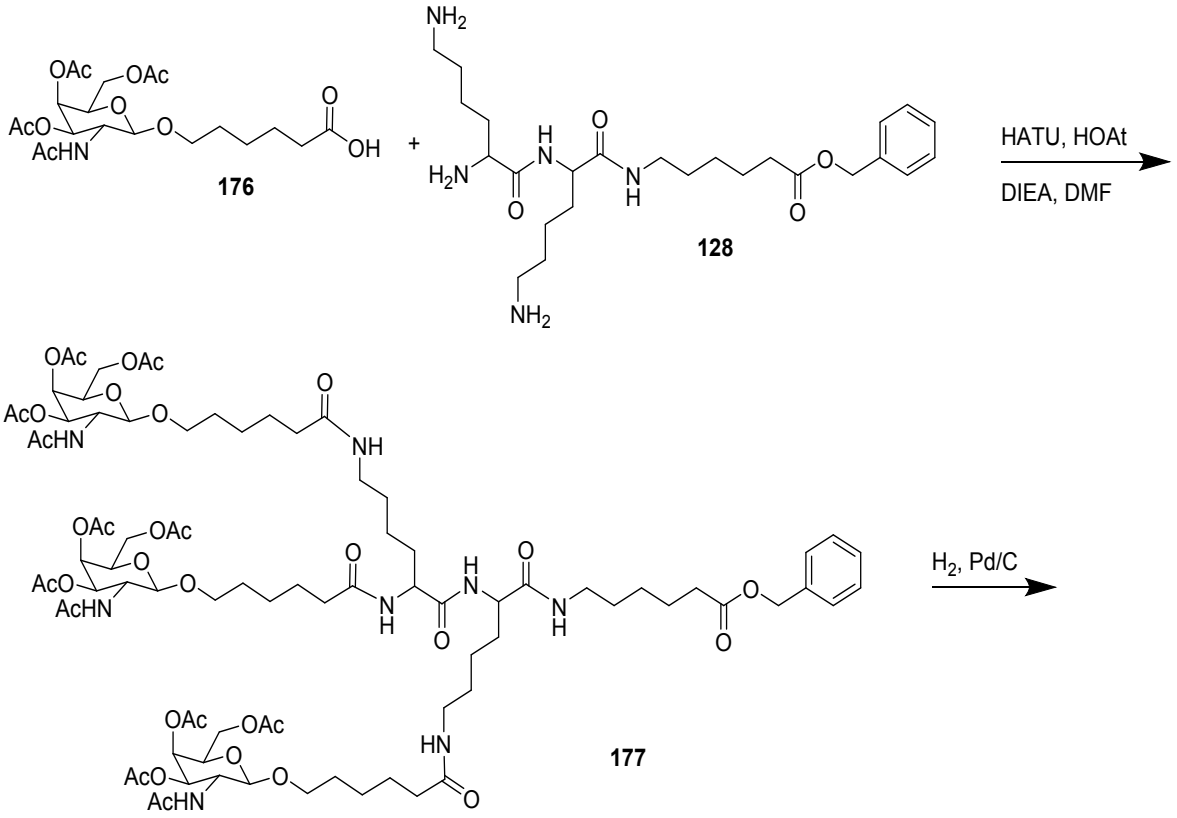


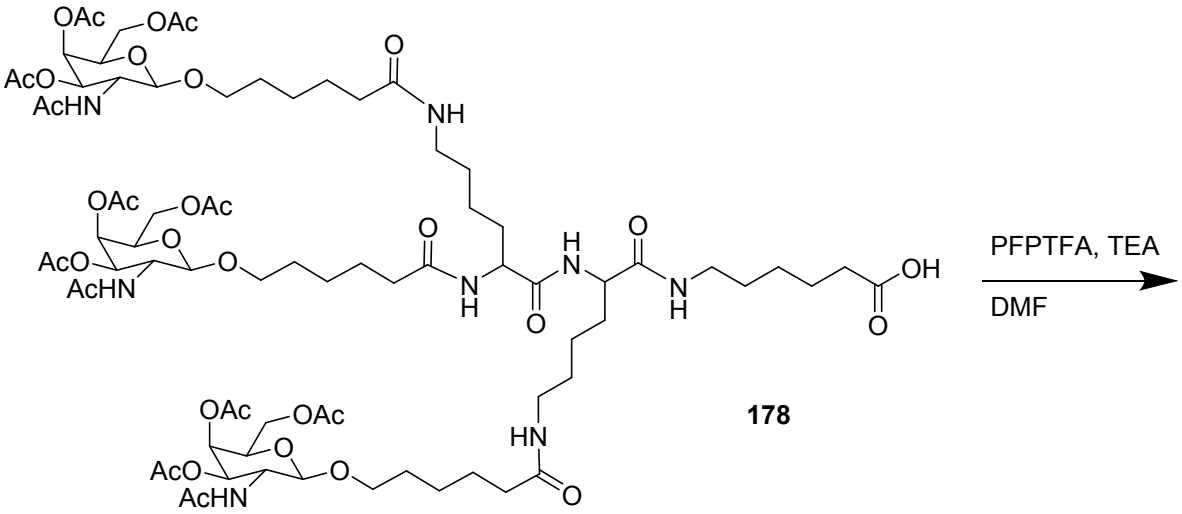
175

El Compuesto 169 está disponible en el mercado. El Compuesto 172 fue preparado mediante adición de glutarato de bencilo (perfluorofenilo) al compuesto 171. El glutarato de bencilo (perfluorofenilo) se preparó mediante adición de PFP-TFA y DIEA a ácido 5-(benciloxi)-5-oxopentanoico en DMF. El Compuesto oligomérico 175, que comprende un grupo conjugado $GalNAc_3$-12, se preparó a partir del Compuesto 174 con los procedimientos generales ilustrados en el Ejemplo 46. La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-12 ($GalNAc_3$-12_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el resto escindible es -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. La estructura de $GalNAc_3$-12 ($GalNAc_3$-12_a-CM-) se muestra a continuación:

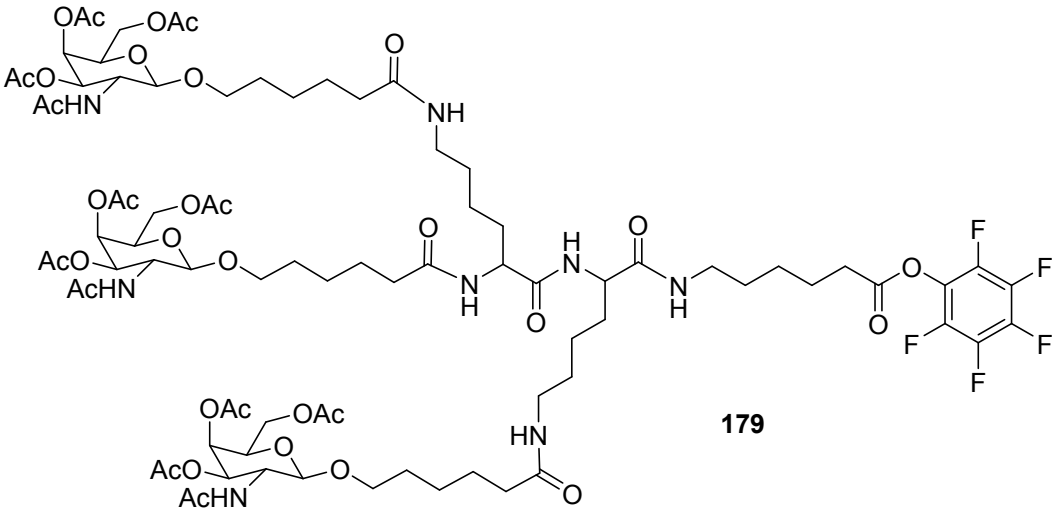


Ejemplo 62: Preparación del compuesto oligomérico 180 que comprende GalNAc$_3$-13

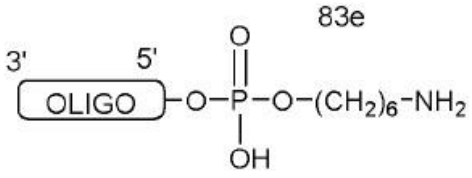




178

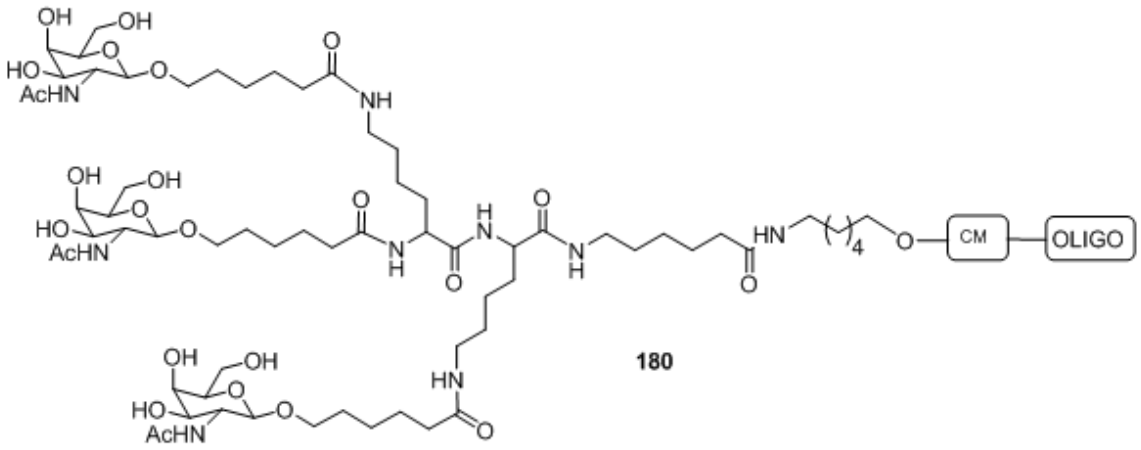


179



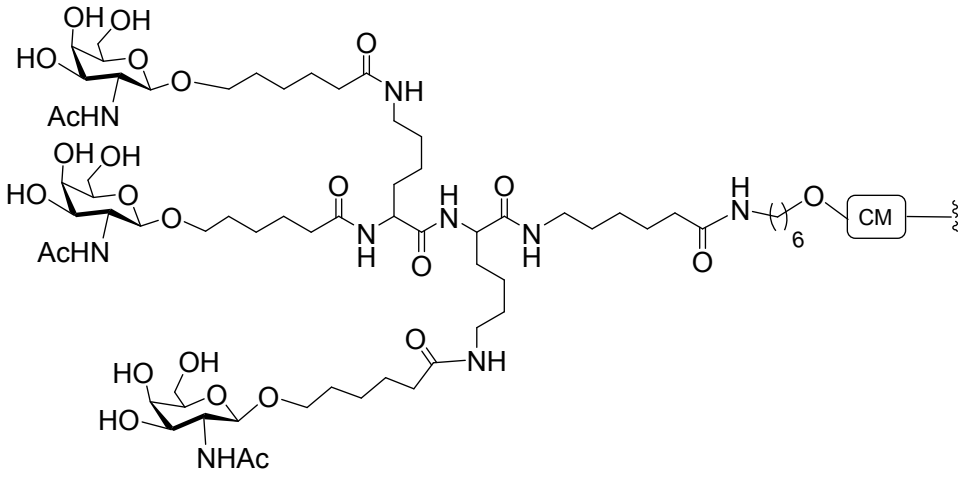
1. **Amortiguador de borato, DMSO, ph 8,5, ta**

2. **amoníaco ac., ta**

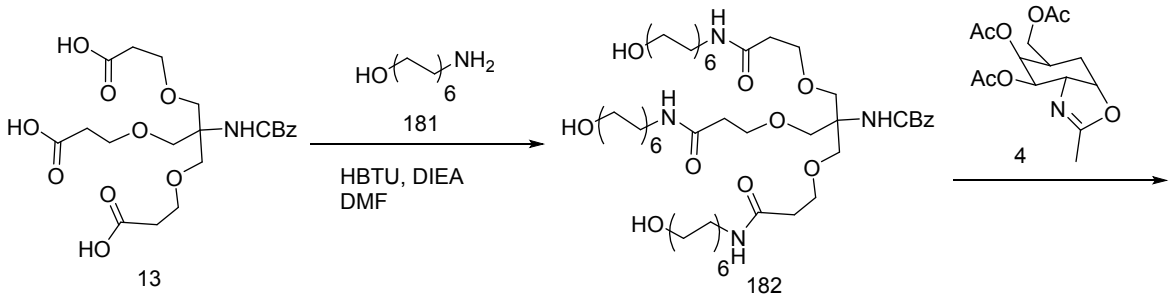


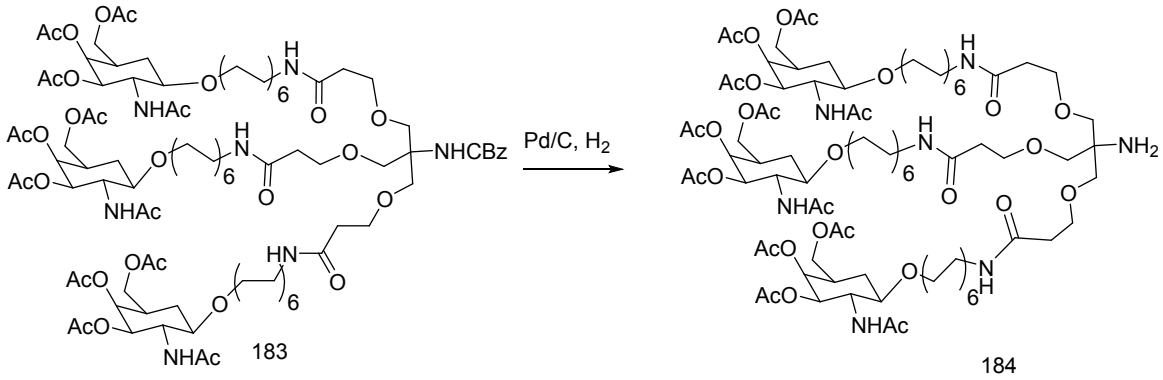
180

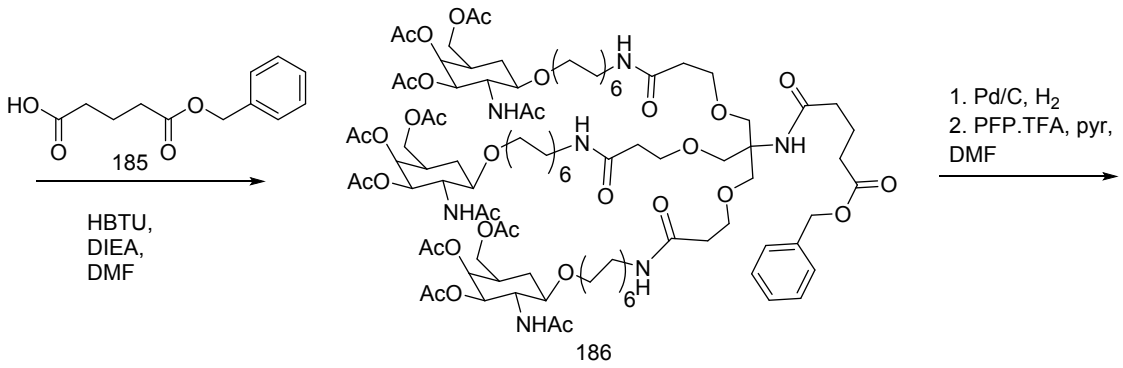
El Compuesto 176 se preparó utilizando el procedimiento general ilustrado en el Ejemplo 2. El Compuesto oligomérico 180, que comprende un grupo conjugado $GalNAc_3$-13, se preparó a partir del Compuesto 177 con los procedimientos generales ilustrados en el Ejemplo 49. La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-13 ($GalNAc_3$-13_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el resto escindible es $-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-$. La estructura de $GalNAc_3$-13 ($GalNAc_3$-13_a-CM-) se muestra a continuación:

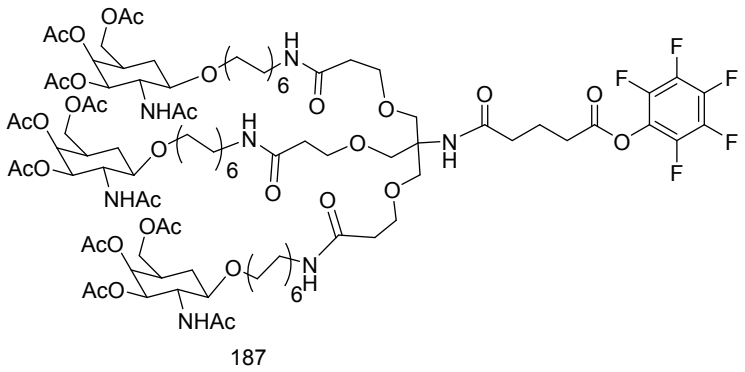


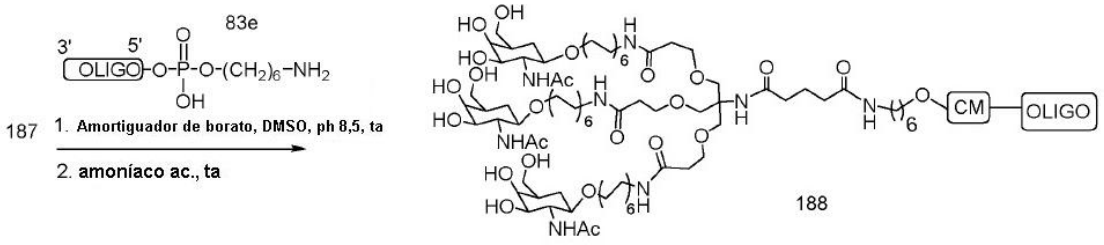
Ejemplo 63: Preparación del compuesto oligomérico 188 que comprende GalNAc$_3$-14


HO
NHCBz
13
181
HBTU, DIEA
DMF
182
4

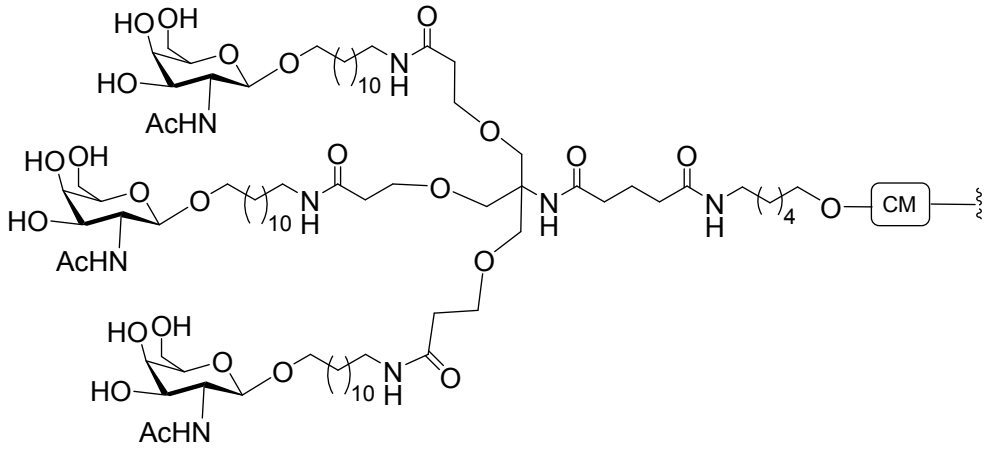

NHCBz
183
Pd/C, H2
NH2
184


185
HBTU,
DIEA,
DMF
186
1. Pd/C, H2
2. PFP.TFA, pyr,
DMF

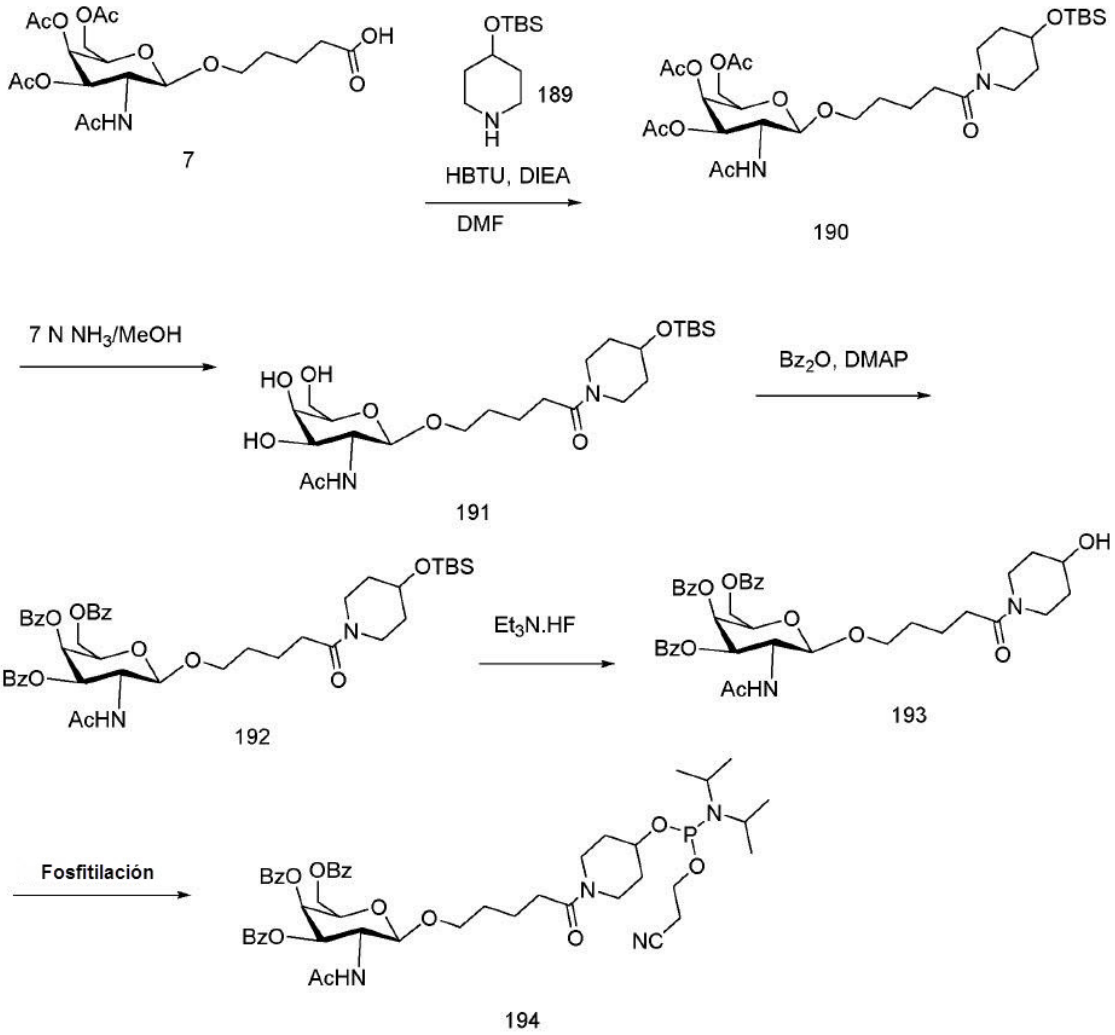

187

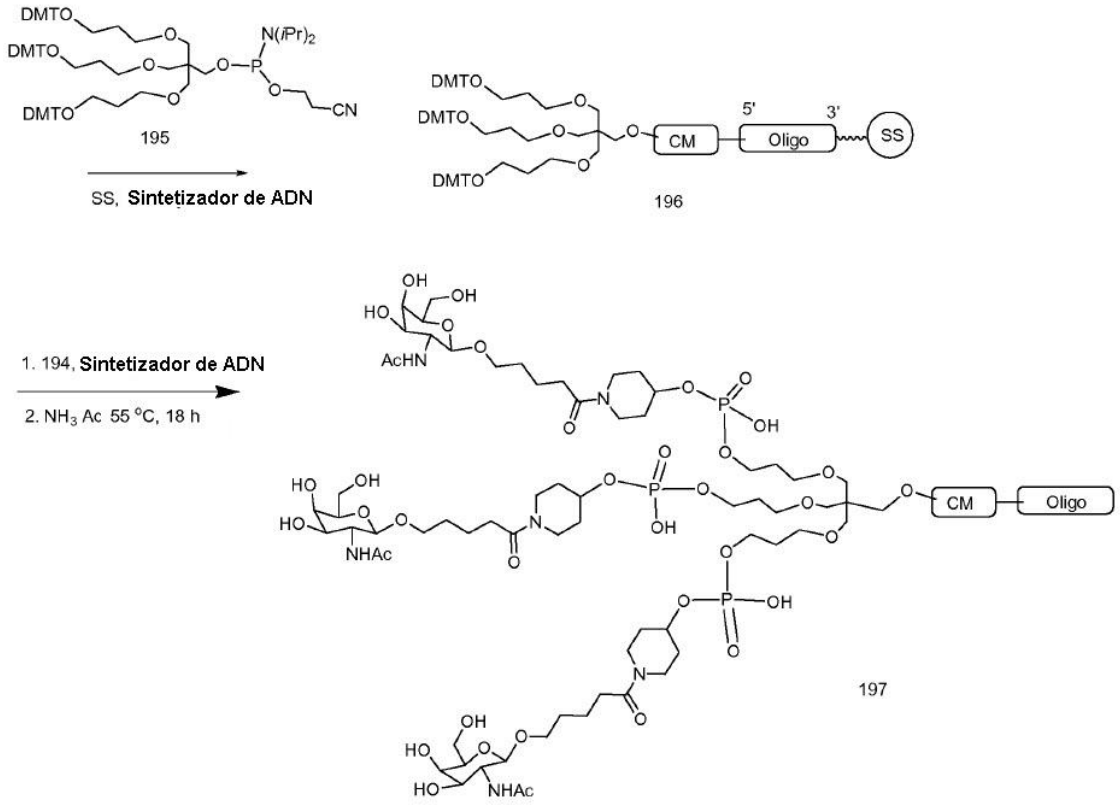


Los Compuestos 181 y 185 están disponibles en el mercado. El Compuesto oligomérico 188, que comprende un grupo conjugado $GalNAc_3$-14, se preparó a partir del Compuesto 187 con los procedimientos generales ilustrados en el Ejemplo 46. La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-14 ($GalNAc_3$-14_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el resto escindible es $-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-$. La estructura de $GalNAc_3$-14 ($GalNAc_3$-14_a-CM-) se muestra a continuación:



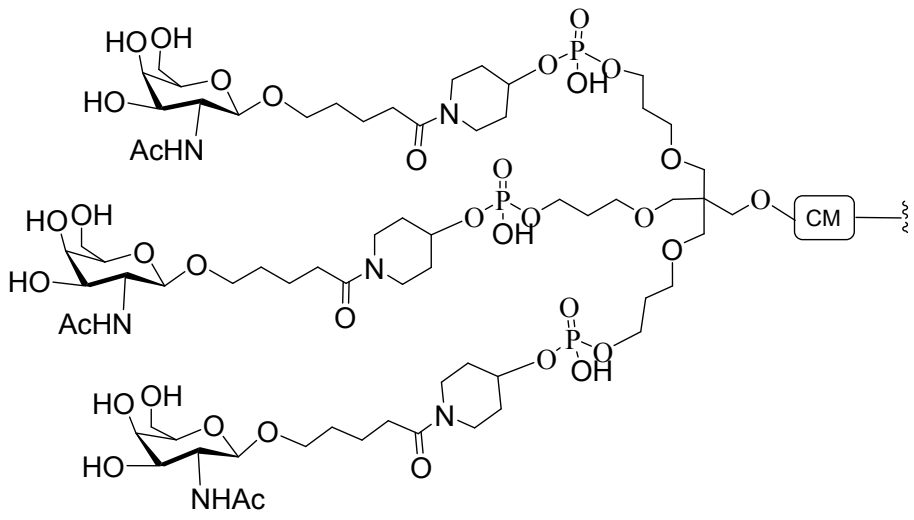
Ejemplo 64: Preparación del compuesto oligomérico 197 que comprende GalNAc$_3$-15





El Compuesto 189 está disponible en el mercado. El Compuesto 195 se preparó utilizando el procedimiento general ilustrado en el Ejemplo 31. El Compuesto oligomérico 197, que comprende un grupo conjugado $GalNAc_3$-15, se preparó a partir de los Compuestos 194 y 195 con los procedimientos estándar de síntesis de oligonucleótidos. La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-15 ($GalNAc_3$-15_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el resto escindible es $-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-$. La estructura de $GalNAc_3$-15 ($GalNAc_3$-15_a-CM-) se muestra a

continuación:



Ejemplo 65: Estudio dependiente de la dosis de oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado 5' (comparación de $GalNAc_3$-3, 12, 13, 14 y 15) dirigidos a SRB-1 *in vivo*

Los oligonucleótidos enumerados a continuación se evaluaron en un estudio dependiente de la dosis en búsqueda de la inhibición antisentido de SRB-1 en ratones. Se incluyó ISIS 353382 sin conjugar como estándar. Cada uno de los grupos conjugados $GalNAc_3$ se unió al extremo 5' del oligonucleótido respectivo mediante un nucleósido 2'-desoxiadenosina unido por fosfodiéster (resto escindible).

Tabla 54

ASO modificado dirigido a SRB-1

N.° ISIS	Secuencias (5′ a 3′)	Conjugado	SEQ ID NO.
353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T$ $_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	ninguno	829
661161	**$GalNAc_3$-3_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}\ T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-3	831
671144	**$GalNAc_3$-12_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}\ T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-12	831
670061	**$GalNAc_3$-13_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}\ T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-13	831
671261	**$GalNAc_3$-14_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}\ T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-14	831
671262	**$GalNAc_3$-15_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}\ T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-15	831

Las mayúsculas indican la nucleobase para cada nucleósido y ^{m}C indica una 5-metilcitosina. Subíndices: “e” indica un nucleósido 2′-MOE modificado; “d” indica un β-D-2′-

desoxirribonucleósido; "s" indica una unión internucleósido fosforotioato (PS); "o" indica una unión internucleósido fosfodiéster (PO); y "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. Los grupos conjugados están en negrita.

La estructura de $GalNAc_3$-3_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 39. La estructura de $GalNAc_3$-12a se mostró anteriormente en el Ejemplo 61. La estructura de $GalNAc_3$-13a se mostró anteriormente en el Ejemplo 62. La estructura de $GalNAc_3$-14a se mostró anteriormente en el Ejemplo 63. La estructura de $GalNAc_3$-15a se mostró anteriormente en el Ejemplo 64.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones C57bl6 de seis a ocho semanas (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una o dos veces con la dosificación que se muestra más adelante con ISIS 353382, 661161, 671144, 670061, 671261, 671262 o con solución salina. Los ratones que recibieron dos dosificaciones, recibieron la segunda dosis tres días después de la primera dosis. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones fueron sacrificados 72 horas después de la administración final para determinar los niveles de ARNm de

SRB-1 en el hígado mediante PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de SRB-1 para cada grupo de tratamiento, normalizados al control salino.

Tal como se ilustra en la Tabla 55, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de ARNm de SRB-1 de una forma dependiente de la dosis. No se observaron diferencias significativas en la inactivación de objetivos entre animales que recibieron una única dosis y animales que recibieron dos dosis (ver ISIS 353382, dosificaciones de 30 y 2 x 15 mg/kg; e ISIS 661161, dosificaciones de 5 y 2 x 2,5 mg/kg). Los oligonucleótidos antisentido que comprenden los conjugados $GalNAc_3$-3, 12, 13, 14, y 15 unidos por fosfodiéster mostraron una mejora sustancial de la potencia en comparación con el oligonucleótido antisentido no conjugado (ISIS 335382).

Tabla 55

ARNm de SRB-1 (% de solución salina)

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ARNm de SRB-1 (% de solución salina)	ED_{50} (mg/kg)	Conjugado
Solución salina	n/a	100,0	n/a	n/a
353382	3	85,0	22,4	ninguno
	10	69,2		
	30	34,2		
	2 x 15	36,0		
661161	0,5	87,4	2,2	$GalNAc_3$-3
	1,5	59,0		
	5	25,6		
	2 x 2,5	27,5		
	15	17,4		
671144	0,5	101,2	3,4	$GalNAc_3$-12
	1,5	76,1		
	5	32,0		
	15	17,6		

670061	0,5	94,8	2,1	$GalNAc_3$-13
	1,5	57,8		
	5	20,7		
	15	13,3		
671261	0,5	110,7	4,1	$GalNAc_3$-14
	1,5	81,9		
	5	39,8		
	15	14,1		
671262	0,5	109,4	9,8	$GalNAc_3$-15
	1,5	99,5		
	5	69,2		
	15	36,1		

Se midieron los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y transaminasa en hígado, en suero, con relación a ratones inyectados con solución salina, mediante protocolos estándar. También se evaluaron BUN y la bilirrubina total. El cambio de los pesos corporales se evaluó sin diferencias significativas del grupo salino (no se muestran los datos). Los valores de ALT, AST, bilirrubina total y BUN se muestran en la Tabla 56 a continuación.

Tabla 56

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bilirrubina total (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Conjugado
Solución salina	n/a	28	60	0,1	39	n/a
353382	3	30	77	0,2	36	ninguno
	10	25	78	0,2	36	
	30	28	62	0,2	35	
	2 x 15	22	59	0,2	33	
661161	0,5	39	72	0,2	34	$GalNAc_3$-3
	1,5	26	50	0,2	33	
	5	41	80	0,2	32	
	2 x 2,5	24	72	0,2	28	
	15	32	69	0,2	36	
671144	0,5	25	39	0,2	34	$GalNAc_3$-12
	1,5	26	55	0,2	28	
	5	48	82	0,2	34	
	15	23	46	0,2	32	
670061	0,5	27	53	0,2	33	$GalNAc_3$-13
	1,5	24	45	0,2	35	
	5	23	58	0,1	34	
	15	24	72	0,1	31	
671261	0,5	69	99	0,1	33	$GalNAc_3$-14
	1,5	34	62	0,1	33	
	5	43	73	0,1	32	
	15	32	53	0,2	30	

671262	0,5	24	51	0,2	29	$GalNAc_3$-15
	1,5	32	62	0,1	31	
	5	30	76	0,2	32	
	15	31	64	0,1	32	

Ejemplo 66: Efecto de varios restos escindibles sobre la inhibición antisentido *in vivo* mediante oligonucleótidos dirigidos a SRB-1 que comprenden un conglomerado de 5′-$GalNAc_3$

Los oligonucleótidos enumerados a continuación se evaluaron en un estudio dependiente de la dosis en búsqueda de la inhibición antisentido de SRB-1 en ratones. Cada uno de los grupos conjugados $GalNAc_3$ se unió al extremo 5' del oligonucleótido respectivo mediante un nucleósido unido por fosfodiéster (resto escindible (CM)).

Tabla 57

ASO modificado dirigido a SRB-1

N.° ISIS	Secuencias (5′ a 3′)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO.
661161	**$GalNAc_3$-3_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-3a	A_d	831
670699	**$GalNAc_3$-3_a-** $_{o'}\mathbf{T_{do}}G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-3a	T_d	834
670700	**$GalNAc_3$-3_a-** $_{o'}\mathbf{A_{eo}}G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-3a	A_e	831
670701	**$GalNAc_3$-3_a-** $_{o'}\mathbf{T_{eo}}G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-3a	T_e	834
671165	**$GalNAc_3$-13_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-13a	A_d	831

Las mayúsculas indican la nucleobase para cada nucleósido y ^{m}C indica una 5-metilcitosina. Subíndices: "e" indica un nucleósido 2'-MOE modificado; "d" indica un β-D-2'-desoxirribonucleósido; "s" indica una unión internucleósido fosforotioato (PS); "o" indica una unión internucleósido fosfodiéster (PO); y "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. Los grupos conjugados están en negrita.

La estructura de $GalNAc_3$-3_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 39. La estructura de $GalNAc_3$-13a se mostró anteriormente en el Ejemplo 62.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones C57bl6 de seis a ocho semanas (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una vez con la dosificación que se muestra más adelante con ISIS 661161, 670699, 670700, 670701, 671165 o con solución salina. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones fueron sacrificados 72 horas después de la administración final para determinar los niveles de ARNm de SRB-1 en el hígado mediante PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los

resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de SRB-1 para cada grupo de tratamiento, normalizados al control salino.

Tal como se ilustra en la Tabla 58, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de ARNm de SRB-1 de una forma dependiente de la dosis. Todos los oligonucleótidos antisentido que comprenden varios restos escindibles mostraban potencias similares.

Tabla 58

ARNm de SRB-1 (% de solución salina)

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ARNm de SRB-1 (% de solución salina)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM
Solución salina	n/a	100,0	n/a	n/a
661161	0,5	87,8	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1,5	61,3		
	5	33,8		
	15	14,0		

670699	0,5	89,4	$GalNAc_3$-3a	T_d
	1,5	59,4		
	5	31,3		
	15	17,1		
	0,5	79,0		
	1,5	63,3		
	5	32,8		
	15	17,9		
	0,5	79,1		
	1,5	59,2		
	5	35,8		
	15	17,7		
	0,5	76,4		
	1,5	43,2		
	5	22,6		
	15	10,0		

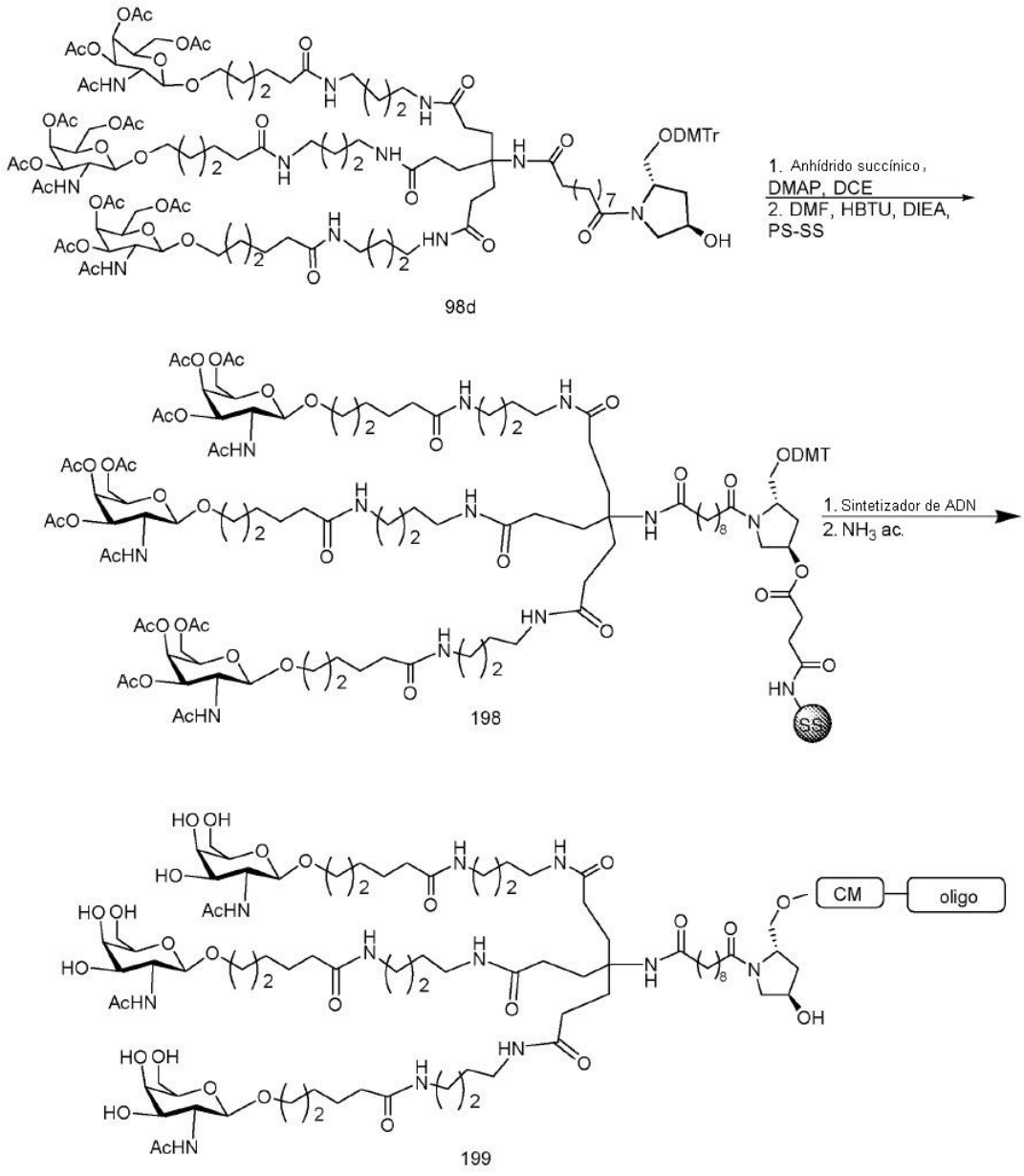
Se midieron los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y transaminasa en hígado, en suero, con relación a ratones inyectados con solución salina, mediante protocolos estándar. También se evaluaron BUN y la bilirrubina total. El cambio de los pesos corporales se evaluó sin diferencias significativas del grupo salino (no se

muestran los datos). Los valores de ALT, AST, bilirrubina total y BUN se muestran en la Tabla 56 a continuación.

Tabla 59

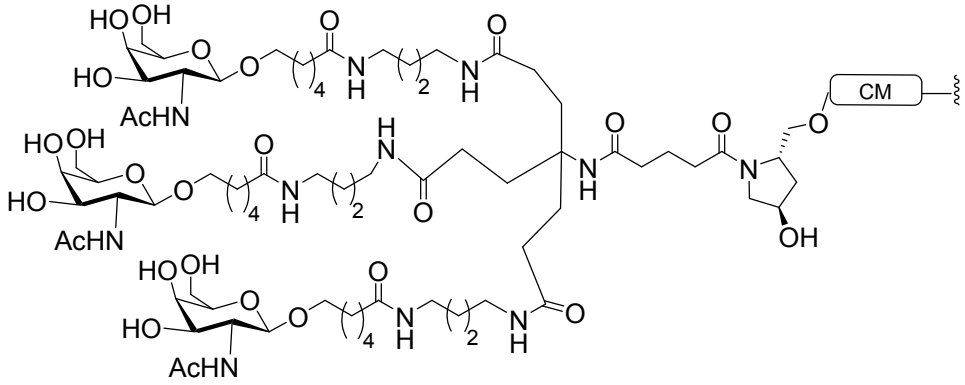
N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bilirrubina total (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM
Solución salina	n/a	24	64	0,2	31	n/a	n/a
661161	0,5	25	64	0,2	31	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1,5	24	50	0,2	32		
	5	26	55	0,2	28		
	15	27	52	0,2	31		
670699	0,5	42	83	0,2	31	$GalNAc_3$-3a	T_d
	1,5	33	58	0,2	32		
	5	26	70	0,2	29		
	15	25	67	0,2	29		
670700	0,5	40	74	0,2	27	$GalNAc_3$-3a	A_e
	1,5	23	62	0,2	27		
	5	24	49	0,2	29		
	15	25	87	0,1	25		
670701	0,5	30	77	0,2	27	$GalNAc_3$-3a	T_e
	1,5	22	55	0,2	30		
	5	81	101	0,2	25		
	15	31	82	0,2	24		
671165	0,5	44	84	0,2	26	$GalNAc_3$-13a	A_d
	1,5	47	71	0,1	24		
	5	33	91	0,2	26		
	15	33	56	0,2	29		

Ejemplo 67: Preparación del compuesto oligomérico 199 que comprende GalNAc$_3$-16

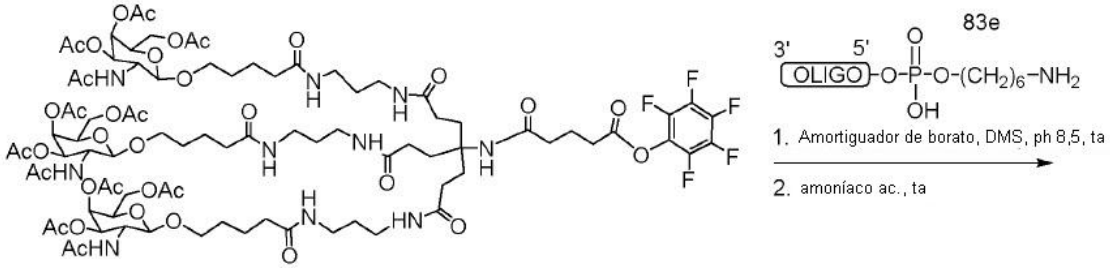


El Compuesto oligomérico 199, que comprende un grupo conjugado GalNAc$_3$-16, se preparó con los procedimientos generales ilustrados en los Ejemplos 7 y 9. La parte del conglomerado de GalNAc$_3$ del grupo conjugado GalNAc$_3$-16

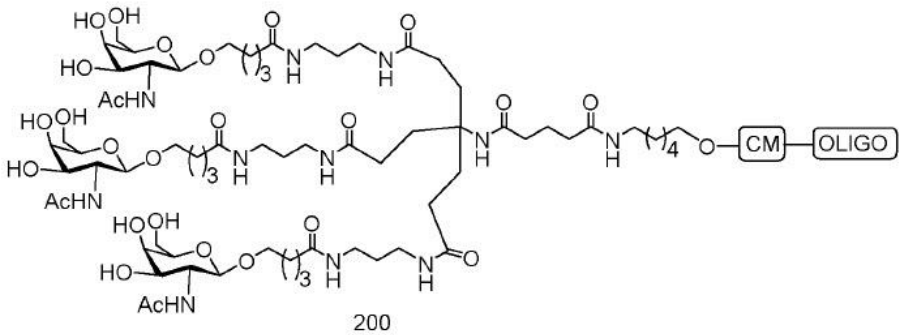
($GalNAc_3$-16_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el resto escindible es -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. La estructura de $GalNAc_3$-16 ($GalNAc_3$-16_a-CM-) se muestra a continuación:



Ejemplo 68: Preparación del compuesto oligomérico 200 que comprende $GalNAc_3$-17

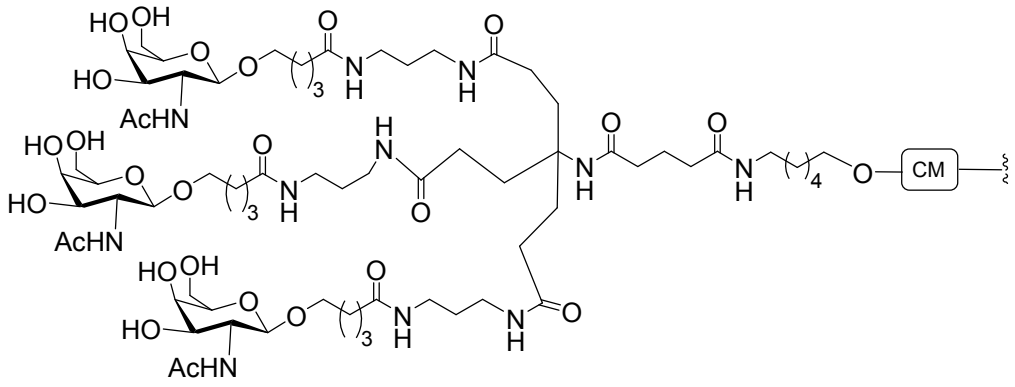


102a

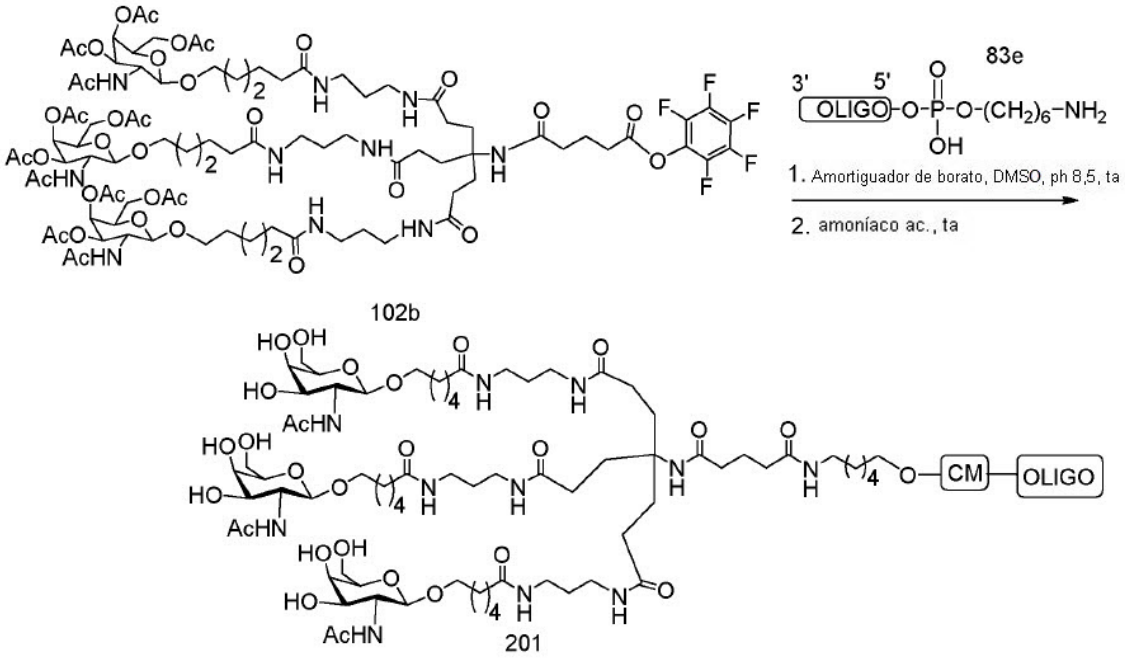


200

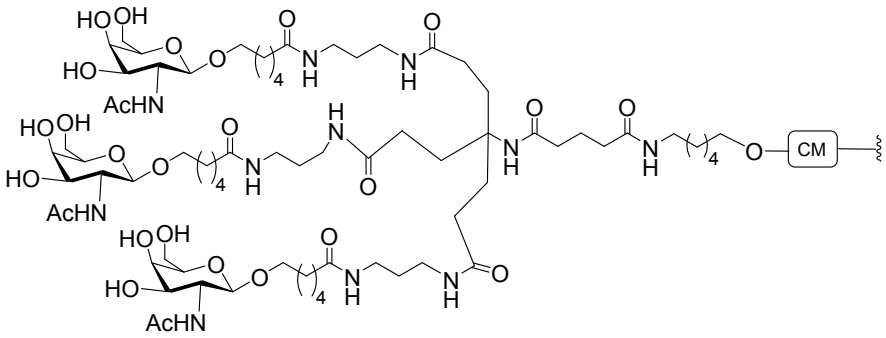
El Compuesto oligomérico 200, que comprende un grupo conjugado $GalNAc_3$-17, se preparó con los procedimientos generales ilustrados en el Ejemplo 46. La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-17 ($GalNAc_3$-17_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el resto escindible es -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. La estructura de $GalNAc_3$-17 ($GalNAc_3$-17_a-CM-) se muestra a continuación:



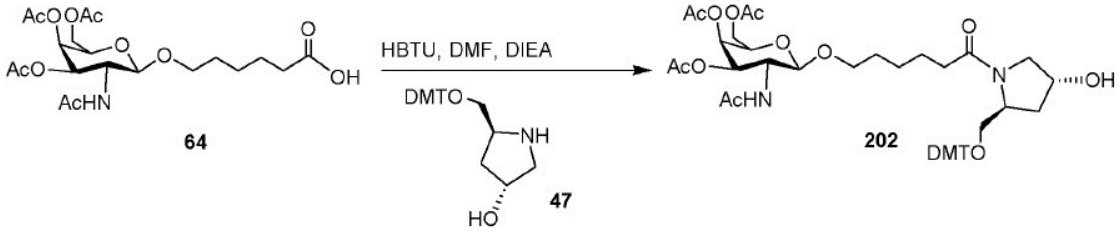
Ejemplo 69: Preparación del compuesto oligomérico 201 que comprende $GalNAc_3$-18

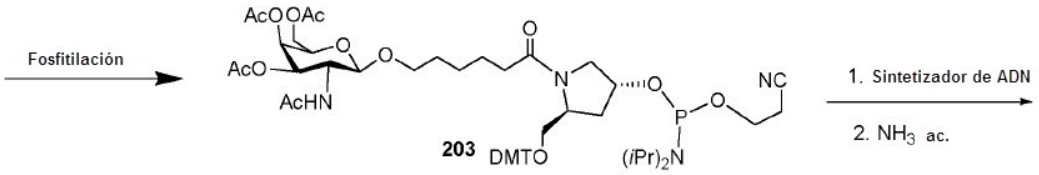


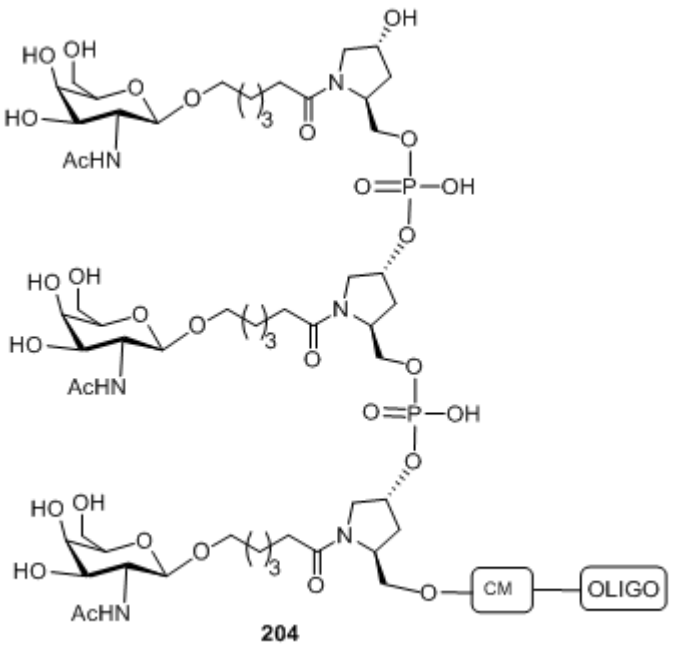
El Compuesto oligomérico 201, que comprende un grupo conjugado $GalNAc_3$-18, se preparó con los procedimientos generales ilustrados en el Ejemplo 46. La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-18 ($GalNAc_3$-18_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el resto escindible es -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. La estructura de $GalNAc_3$-18 ($GalNAc_3$-18_a-CM-) se muestra a continuación:



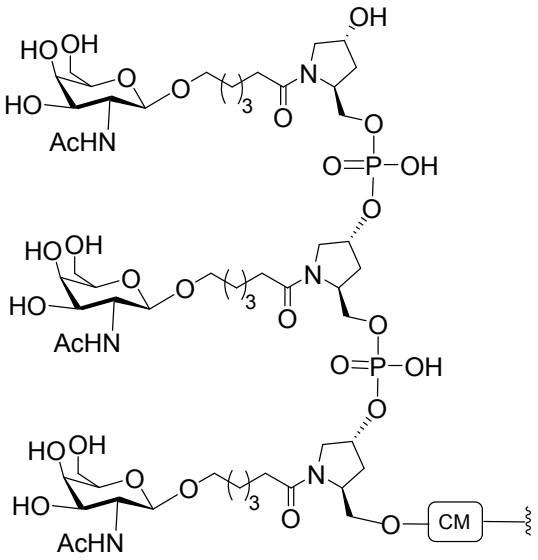
Ejemplo 70: Preparación del compuesto oligomérico 204 que comprende $GalNAc_3$-19



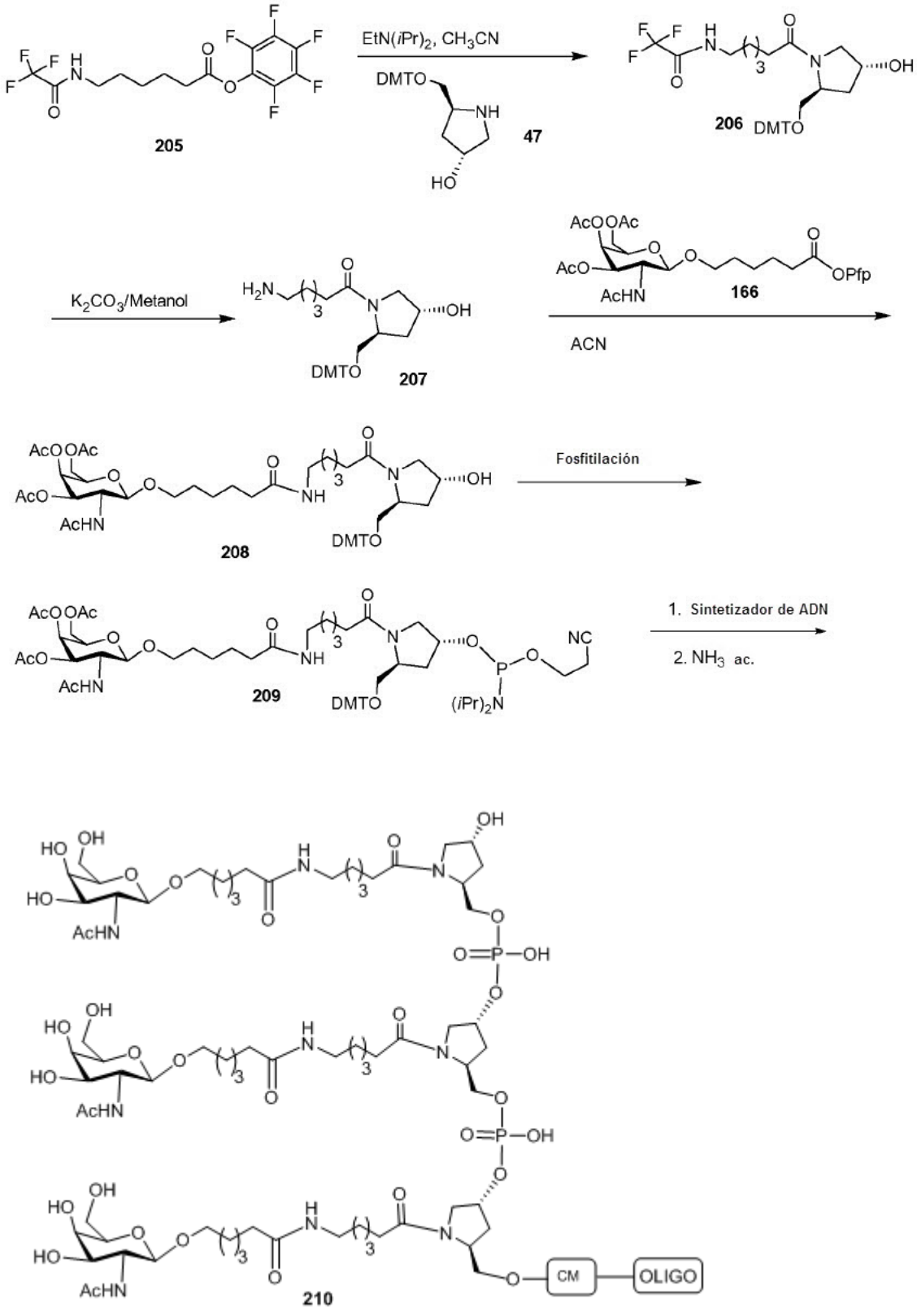




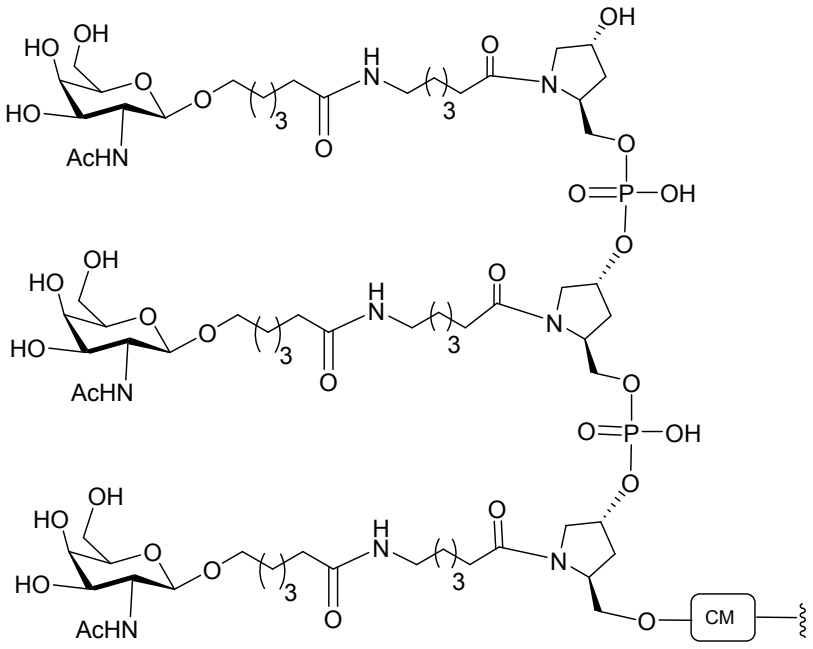
El Compuesto oligomérico 204, que comprende un grupo conjugado $GalNAc_3$-19, se preparó a partir del Compuesto 64 con los procedimientos generales ilustrados en el Ejemplo 52. La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-19 ($GalNAc_3$-19_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el resto escindible es $-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-$. La estructura de $GalNAc_3$-19 ($GalNAc_3$-19_a-CM-) se muestra a continuación:



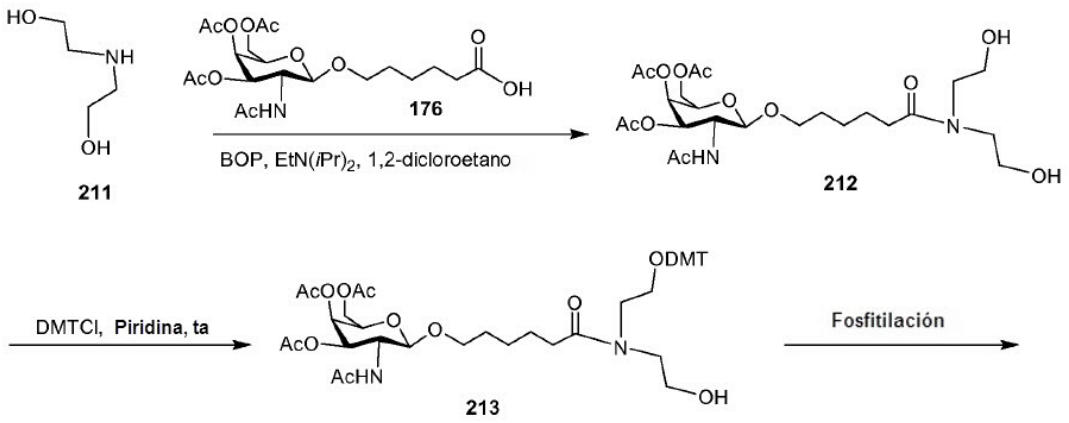
Ejemplo 71: Preparación del compuesto oligomérico 210 que comprende $GalNAc_3$-20

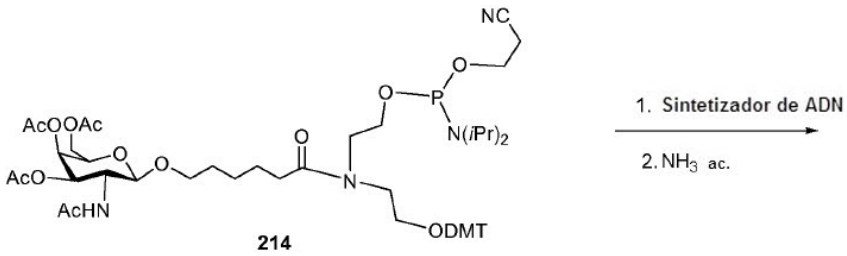

EtN(iPr)2, CH3CN
DMTO
NH
HO
47
205
206
DMTO
K2CO3/Metanol
207
ACN
166
Fosfitilación
208
209
1. Sintetizador de ADN
2. NH3 ac.
210
CM
OLIGO

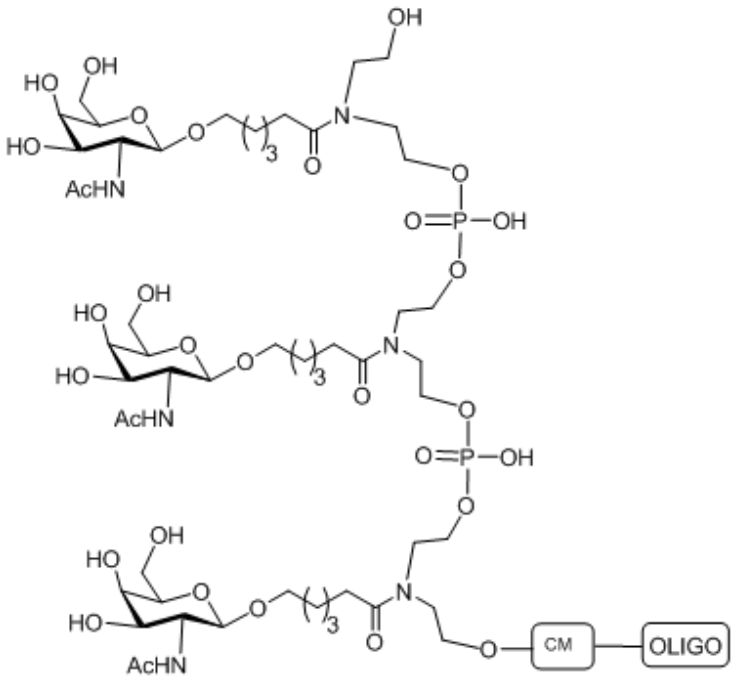
El Compuesto 205 se preparó agregando PFP-TFA y DIEA a ácido 6-(2,2,2-trifluoroacetamido)hexanoico en acetonitrilo, el cual se preparó agregando anhídrido tríflico a ácido 6-aminohexanoico. La mezcla de reacción se calentó a 80 °C y luego se disminuyó a t.a. El Compuesto oligomérico 210, que comprende un grupo conjugado $GalNAc_3$-20, se preparó a partir del Compuesto 208 con los procedimientos generales ilustrados en el Ejemplo 52. La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-20 ($GalNAc_3$-20_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el resto escindible es $-P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-$. La estructura de $GalNAc_3$-20 ($GalNAc_3$-20_a-CM-) se muestra a continuación:



Ejemplo 72: Preparación del compuesto oligomérico 215 que comprende $GalNAc_3$-21

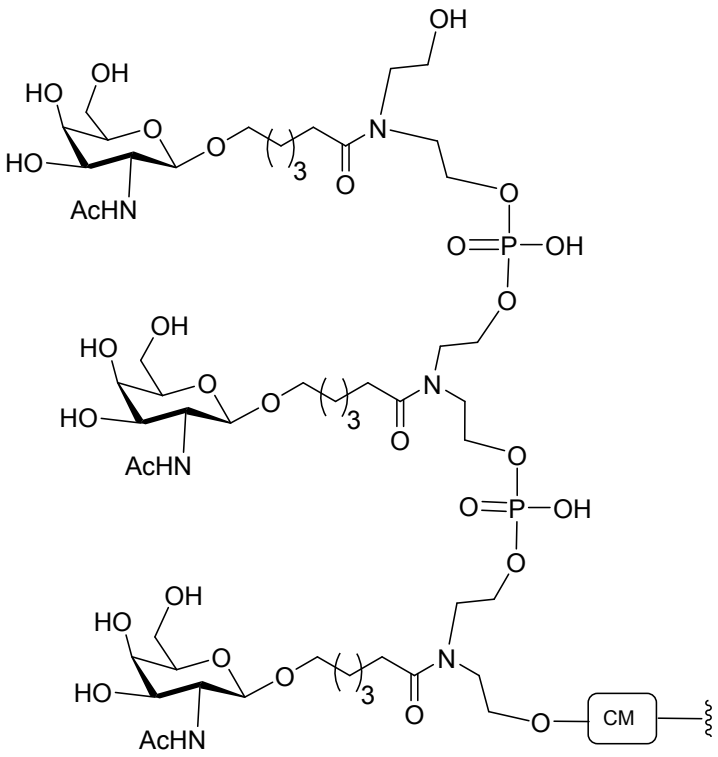




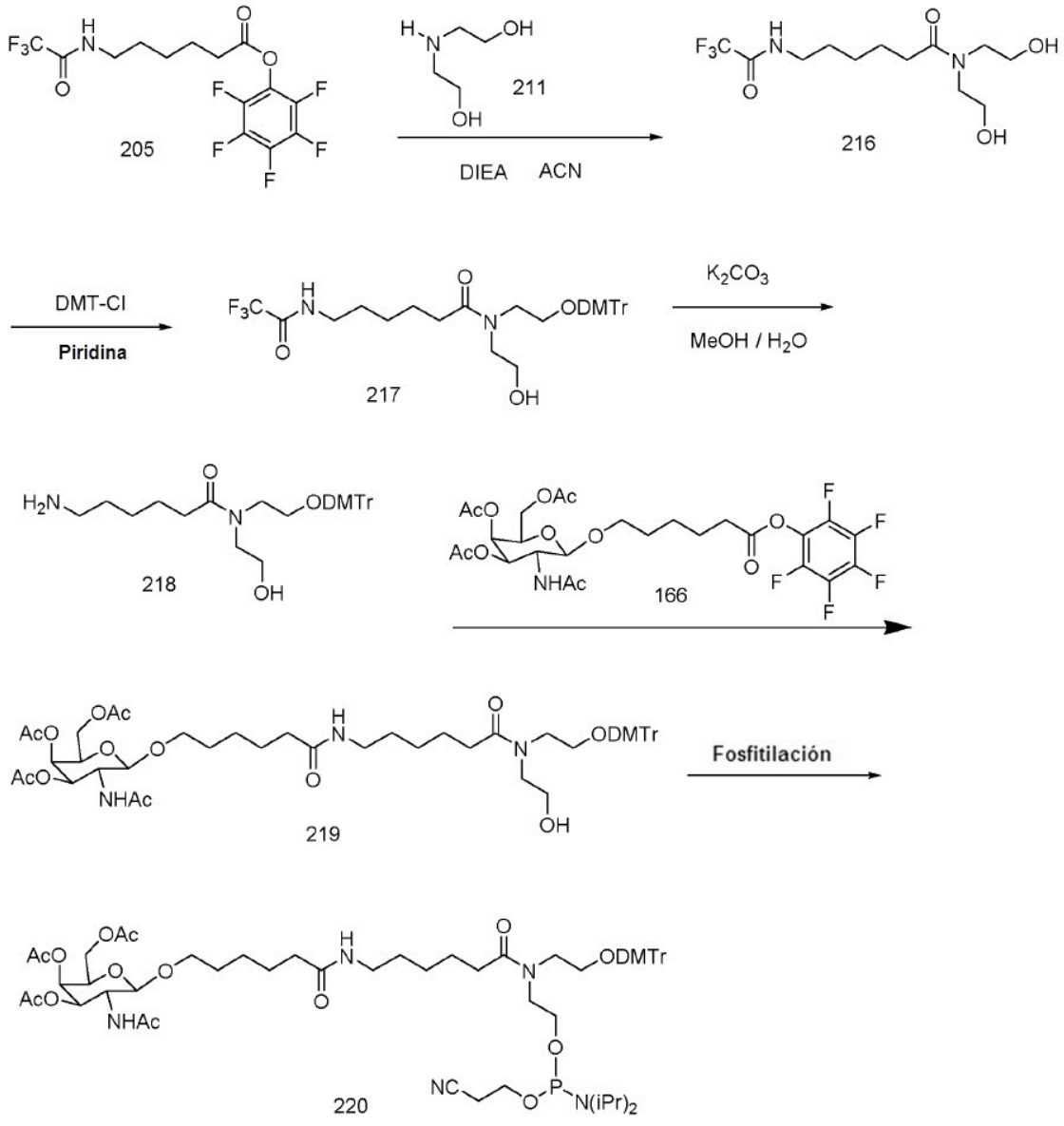


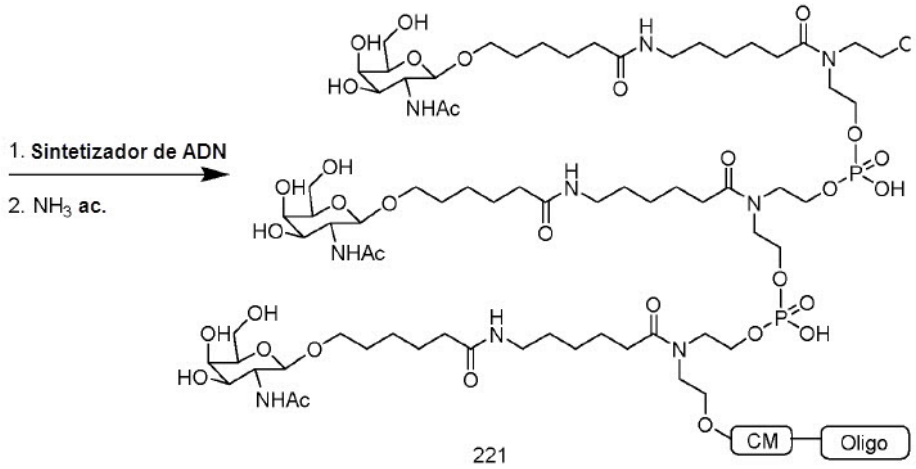
215

El Compuesto 211 está disponible en el mercado. El Compuesto oligomérico 215, que comprende un grupo conjugado $GalNAc_3$-21, se preparó a partir del Compuesto 213 con los procedimientos generales ilustrados en el Ejemplo 52. La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-21 ($GalNAc_3$-21_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el resto escindible es -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. La estructura de $GalNAc_3$-21 ($GalNAc_3$-21_a-CM-) se muestra a continuación:



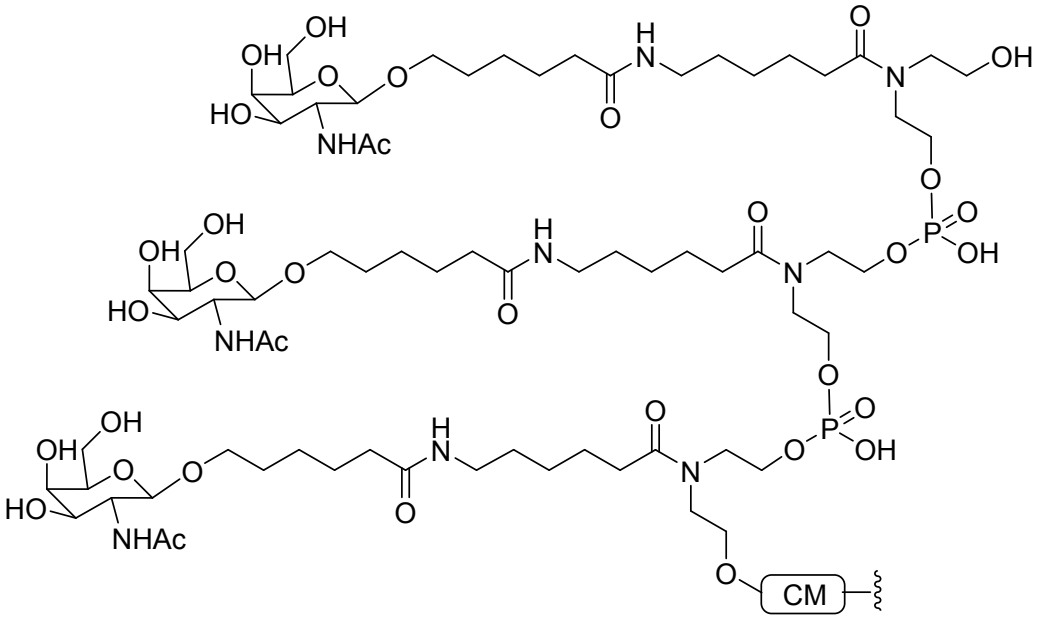
Ejemplo 73: Preparación del compuesto oligomérico 221 que comprende $GalNAc_3$-22





221

El Compuesto 220 se preparó a partir del compuesto 219 utilizando tetrazolida de diisopropilamonio. El Compuesto oligomérico 221, que comprende un grupo conjugado $GalNAc_3$-21, se preparó a partir del Compuesto 220 con el procedimiento general ilustrado en el Ejemplo 52. La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-22 ($GalNAc_3$-22_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el resto escindible es -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. La estructura de $GalNAc_3$-22 ($GalNAc_3$-22_a-CM-) se muestra a continuación:



Ejemplo 74: Efecto de varios restos escindibles sobre la inhibición antisentido *in vivo* mediante oligonucleótidos dirigidos a SRB-1 que comprenden un conjugado de 5′-$GalNAc_3$

Los oligonucleótidos enumerados a continuación se evaluaron en un estudio dependiente de la dosis en búsqueda de la inhibición antisentido de SRB-1 en ratones. Cada uno de los grupos conjugados $GalNAc_3$ se unió al extremo 5' del oligonucleótido respectivo.

Tabla 60

ASO modificado dirigido a SRB-1

N.° ISIS	Secuencias (5’ a 3’)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO.
353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	n/a	n/a	829
661161	**$GalNAc_3$-3_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-3a	A_d	831
666904	**$GalNAc_3$-3_a-** $_{o'}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-3a	PO	829
675441	**$GalNAc_3$-17_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-17a	A_d	831
675442	**$GalNAc_3$-18_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-18a	A_d	831

En todas las tablas, las mayúsculas indican la nucleobase para cada nucleósido y ^{m}C indica una 5-metilcitosina. Subíndices: “e” indica un nucleósido 2’-MOE modificado; “d”

indica un β-D-2’-desoxirribonucleósido; “s” indica una unión internucleósido fosforotioato (PS); “o” indica una unión internucleósido fosfodiéster (PO); y “o’” indica -O-P(=O)(OH)-. Los grupos conjugados están en negrita.

La estructura de $GalNAc_3$-3_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 39. La estructura de $GalNAc_3$-17a se mostró anteriormente en el Ejemplo 68, y la estructura de $GalNAc_3$-18a se mostró en el Ejemplo 69.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones C57BL/6 de seis a ocho semanas (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una vez con la dosificación que se muestra más adelante con un oligonucleótido enumerado en la Tabla 60 o con solución salina. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones fueron sacrificados 72 horas después de la administración final para determinar los niveles de ARNm de SRB-1 mediante PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de SRB-1 para cada grupo de

tratamiento, normalizados al control salino.

Tal como se ilustra en la Tabla 61, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de ARNm de SRB-1 de una forma dependiente de la dosis. Los oligonucleótidos antisentido que comprenden un conjugado de GalNAc mostraron potencias similares y fueron significativamente más potentes que el oligonucleótido principal sin el conjugado de GalNAc.

Tabla 61

ARNm de SRB-1 (% de solución salina)

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ARNm de SRB-1 (% de solución salina)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM
Solución salina	n/a	100,0	n/a	n/a
353382	3	79,38	n/a	n/a
	10	68,67		
	30	40,70		
661161	0,5	79,18	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1,5	75,96		
	5	30,53		
	15	12,52		

666904	0,5	91,30	$GalNAc_3$-3a	PO
	1,5	57,88		
	5	21,22		
	15	16,49		
675441	0,5	76,71	$GalNAc_3$-17a	A_d
	1,5	63,63		
	5	29,57		
	15	13,49		
675442	0,5	95,03	$GalNAc_3$-18a	A_d
	1,5	60,06		
	5	31,04		
	15	19,40		

Se midieron los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y transaminasa en hígado, en suero, con relación a ratones inyectados con solución salina, mediante protocolos estándar. También se evaluaron BUN y la bilirrubina total. El cambio de los pesos corporales se evaluó sin cambios significativos del grupo salino (no se muestran los datos). Los valores de ALT, AST, bilirrubina total y BUN se muestran en la Tabla 62 a continuación.

Tabla 62

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bilirrubina total (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM
Solución salina	n/a	26	59	0,16	42	n/a	n/a
353382	3	23	58	0,18	39	n/a	n/a
	10	28	58	0,16	43		
	30	20	48	0,12	34		
661161	0,5	30	47	0,13	35	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1,5	23	53	0,14	37		
	5	26	48	0,15	39		
	15	32	57	0,15	42		
666904	0,5	24	73	0,13	36	$GalNAc_3$-3a	PO
	1,5	21	48	0,12	32		
	5	19	49	0,14	33		
	15	20	52	0,15	26		
675441	0,5	42	148	0,21	36	$GalNAc_3$-17a	A_d
	1,5	60	95	0,16	34		
	5	27	75	0,14	37		
	15	24	61	0,14	36		
675442	0,5	26	65	0,15	37	$GalNAc_3$-18a	A_d
	1,5	25	64	0,15	43		
	5	27	69	0,15	37		
	15	30	84	0,14	37		

Ejemplo 75: Análisis farmacocinético de oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado en la posición 5'

La PK de los ASO en las Tablas 54, 57 y 60 anteriores se evaluó usando muestras de hígado que se obtuvieron siguiendo los procedimientos de tratamiento descritos en los Ejemplos 65, 66 y 74. Las muestras de hígado se cortaron en trozos y se extrajeron usando protocolos estándar y se analizaron mediante IP-HPLC-MS junto con un estándar interno. El nivel combinado de tejidos (µg/g) de todos los metabolitos se midió mediante la integración de picos UV adecuados, y el nivel de tejido de ASO de longitud completa que carece del conjugado ("original", que es Isis n.° 353382 en este caso) se midió usando cromatogramas de iones extraídos (EIC, por sus siglas en inglés) adecuados.

Tabla 63

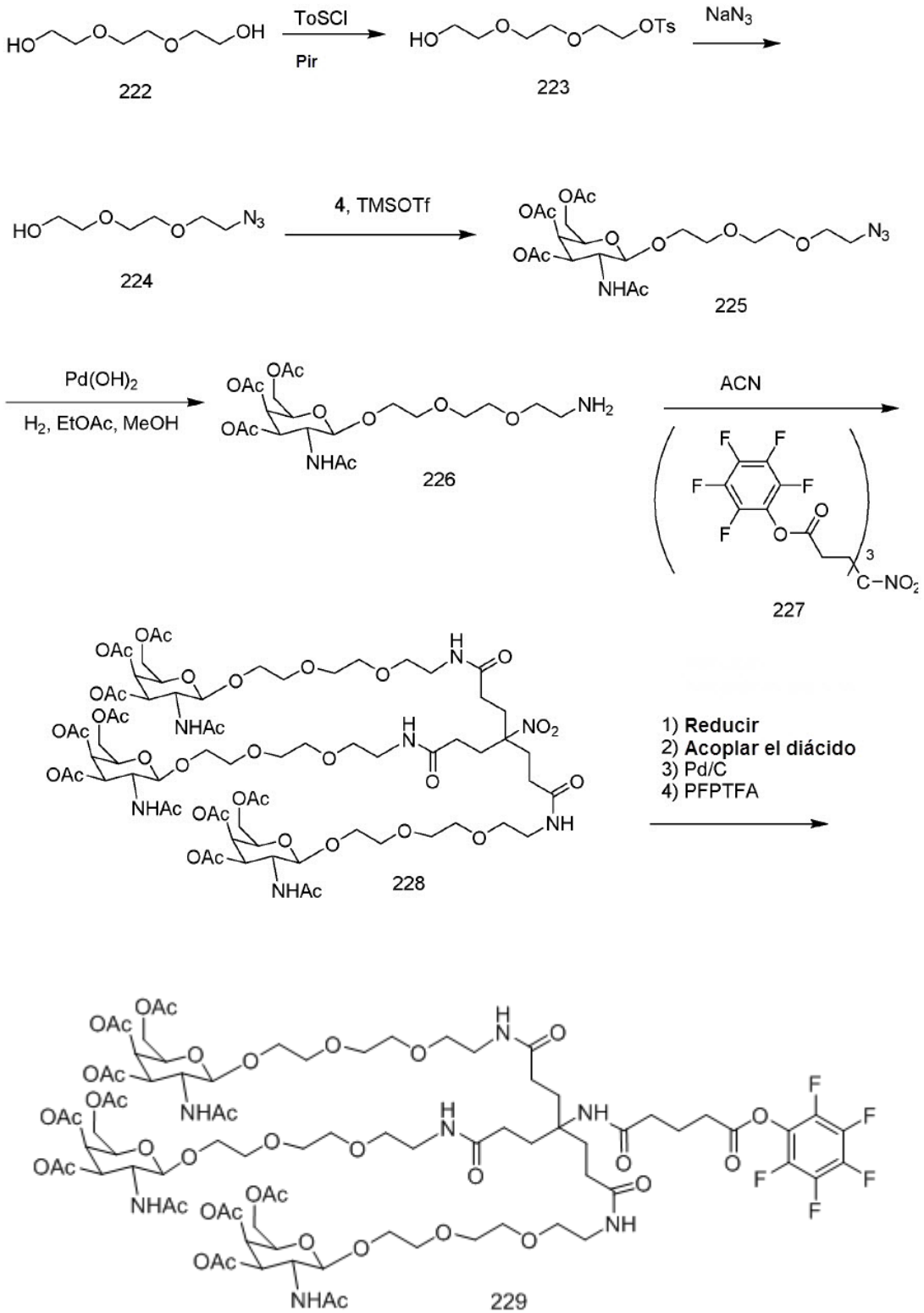
Análisis PK en el hígado

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	Nivel de tejido total por UV (µg/g)	Nivel de tejido ASO original por EIC (µg/g)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM
353382	3	8,9	8,6	n/a	n/a
	10	22,4	21,0		
	30	54,2	44,2		
661161	5	32,4	20,7	$GalNAc_3$-3a	A_d
	15	63,2	44,1		
671144	5	20,5	19,2	$GalNAc_3$-12a	A_d
	15	48,6	41,5		
670061	5	31,6	28,0	$GalNAc_3$-13a	A_d
	15	67,6	55,5		
671261	5	19,8	16,8	$GalNAc_3$-14a	A_d
	15	64,7	49,1		
671262	5	18,5	7,4	$GalNAc_3$-15a	A_d
	15	52,3	24,2		
670699	5	16,4	10,4	$GalNAc_3$-3a	T_d
	15	31,5	22,5		
670700	5	19,3	10,9	$GalNAc_3$-3a	A_e
	15	38,1	20,0		

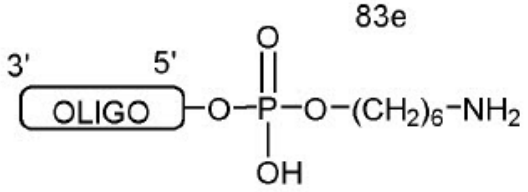
670701	5	21,8	8,8	$GalNAc_3$-3a	T_e
	15	35,2	16,1		
671165	5	27,1	26,5	$GalNAc_3$-13a	A_d
	15	48,3	44,3		
666904	5	30,8	24,0	$GalNAc_3$-3a	PO
	15	52,6	37,6		
675441	5	25,4	19,0	$GalNAc_3$-17a	A_d
	15	54,2	42,1		
675442	5	22,2	20,7	$GalNAc_3$-18a	A_d
	15	39,6	29,0		

Los resultados en la Tabla 63 anterior muestran que hubo mayores niveles de tejido hepático de los oligonucleótidos que contenían un grupo conjugado $GalNAc_3$ del oligonucleótido original no comprende un grupo conjugado $GalNAc_3$ (ISIS 353382) 72 horas después de la administración de oligonucleótidos, particularmente cuando se toma en consideración las diferencias en la dosificación entre los oligonucleótidos con y sin un grupo conjugado $GalNAc_3$. Además, después de 72 horas, 40-98 % de cada oligonucleótido que comprende un grupo conjugado $GalNAc_3$ fue metabolizado al compuesto original, lo cual indica que los grupos conjugados $GalNAc_3$ se escindieron de los oligonucleótidos.

Ejemplo 76: Preparación del compuesto oligomérico 230 que comprende $GalNAc_3$-23

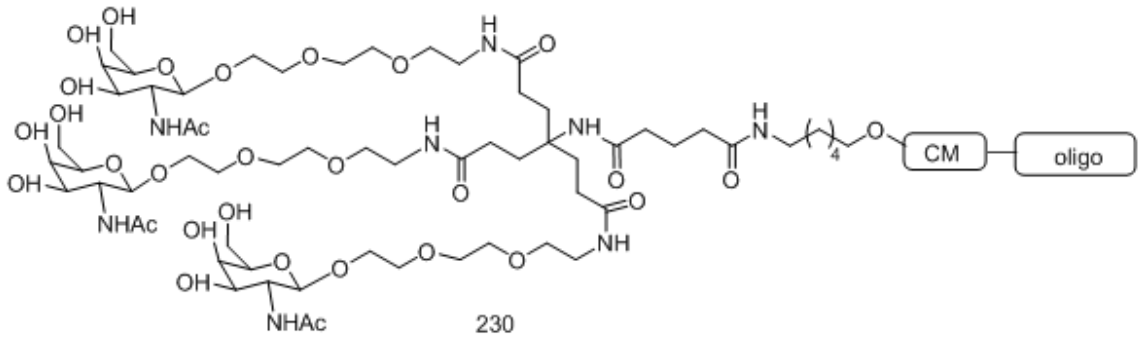


83e



1. Amortiguador de borato, DMSO, pH 8,5, ta

2. amoníaco ac., ta



230

El Compuesto 222 está disponible en el mercado. 44,48 ml (0,33 mol) del compuesto 222 se trataron con cloruro de tosilo (25,39 g, 0,13 mol) en piridina (500 mL) durante 16 horas. La reacción entonces se evaporó hasta formar un aceite, de disolvió en EtOAc y se lavó con agua, $NaHCO_3$ saturado, salmuera y se secó con Na_2SO_4. Se concentró acetato de etilo hasta la sequedad y se purificó mediante cromatografía en columna, se eluyó con EtOAc/hexanos (1:1) seguido por metanol al 10 % en CH_2Cl_2 para proporcionar el compuesto 223 como un aceite incoloro. LCMS y NMR fueron congruentes con la estructura. Se trataron 10 g (32,86 mmol)

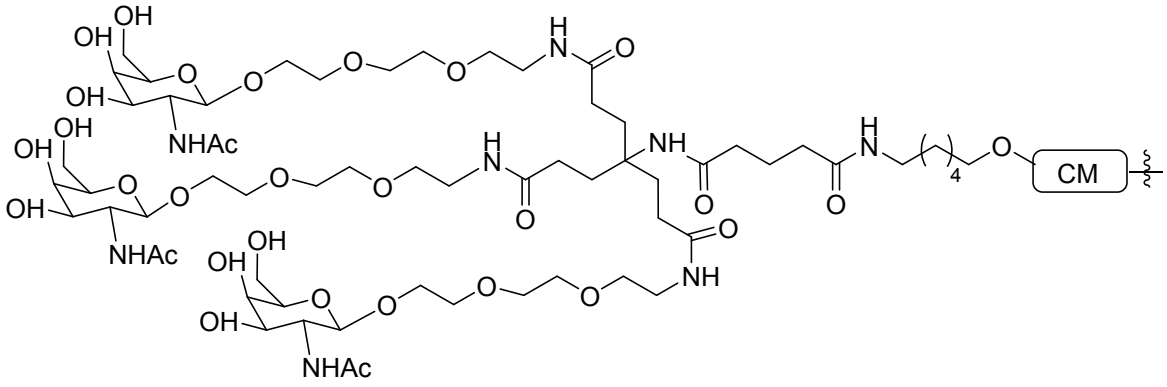
de 1-tosiltrietilenglicol (compuesto 223) con azida sódica (10,68 g, 164,28 mmol) en DMSO (100 mL) a temperatura ambiente durante 17 horas. La mezcla de reacción entonces se vertió en agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua tres veces y se secó en Na_2SO_4. La capa orgánica se concentró hasta sequedad para proporcionar 5,3 g del compuesto 224 (92 %). LCMS y NMR fueron congruentes con la estructura. 1-azidotrietilenglicol (compuesto 224, 5,53 g, 23,69 mmol) y el compuesto 4 (6 g, 18,22 mmol) se trataron con tamices moleculares 4A (5 g), y TMSOTf (1,65 ml, 9,11 mmol) en diclorometano (100 mL) bajo una atmósfera inerte. Después de 14 horas, la reacción se filtró para retirar los tamices y la capa orgánica se lavó con $NaHCO_3$ saturado, agua, salmuera y se secó con Na_2SO_4. La capa orgánica se concentró hasta sequedad y se purificó mediante cromatografía en columna, se eluyó con un gradiente de 2 a 4 % de metanol en diclorometano para proporcionar el compuesto 225. LCMS y NMR fueron congruentes con la estructura. El compuesto 225 (11,9 g, 23,59 mmol) se hidrogenó en EtOAc/metanol (4:1, 250 mL) en un catalizador de Pearlman. Después de 8 horas, el catalizador se retiró por filtración y los solventes se retiraron hasta sequedad para proporcionar el compuesto 226. LCMS y NMR fueron congruentes con la estructura.

Para generar el compuesto 227, se trató una solución de ácido nitrometantrispropiónico (4,17 g, 15,04 mmol) y base de Hunig (10,3 ml, 60,17 mmol) en DMF (100 mL) por goteo con acetato de pentaflourotrifluoro (9,05 ml, 52,65 mmol). Después de 30 minutos, la reacción se vertió en agua helada y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua, salmuera y se secó en Na_2SO_4. La capa orgánica se concentró hasta sequedad y luego se recristalizó a partir de heptano para proporcionar el compuesto 227 como un sólido blanco. LCMS y NMR fueron congruentes con la estructura. El compuesto 227 (1,5 g, 1,93 mmol) y el compuesto 226 (3,7 g, 7,74 mmol) se agitaron a temperatura ambiente en acetonitrilo (15 mL) durante 2 horas. La reacción se evaporó hasta sequedad y se purificó mediante cromatografía en columna, se eluyó con un gradiente de 2 a 10 % de metanol en diclorometano para proporcionar el compuesto 228. LCMS y NMR fueron congruentes con la estructura. El compuesto 228 (1,7 g, 1,02 mmol) se trató con níquel Raney (alrededor de 2 g húmedo) en etanol (100 mL) en una atmósfera de hidrógeno. Después de 12 horas, el catalizador se retiró por filtración y la capa orgánica se evaporó hasta formar un sólido que se usó directamente en la siguiente etapa. LCMS y NMR fueron congruentes con la estructura. El sólido (0,87 g, 0,53 mmol) se calentó con ácido bencilglutárico (0,18 g, 0,8 mmol), HBTU (0,3 g, 0,8

mmol) y DIEA (273,7µl, 1,6 mmol) en DMF (5 mL). Después de 16 horas, se retiró el DMF a presión reducida a 65 °C hasta formar un aceite, y el aceite se disolvió en diclorometano. La capa orgánica se lavó con $NaHCO_3$ saturado, salmuera y se secó con Na_2SO_4. Después de la evaporación de la capa orgánica, el compuesto se purificó mediante cromatografía en columna y se eluyó con un gradiente de 2 a 20 % de metanol en diclorometano para proporcionar el producto acoplado. LCMS y NMR fueron congruentes con la estructura. El éster bencílico se desprotegió con catalizador de Pearlman bajo una atmósfera de hidrógeno durante 1 hora. El catalizador entonces se retiró por filtración y los solventes se retiraron hasta sequedad para proporcionar el ácido. LCMS y NMR fueron congruentes con la estructura. El ácido (486 mg, 0,27 mmol) se disolvió en DMF seco (3 mL). Se agregó piridina (53,61 µl, 0,66 mmol) y la reacción se purgó con argón. Se agregó lentamente acetato de pentaflourotriflouro (46,39 µl, 0,4 mmol) a la mezcla de reacción. El color de la reacción cambió desde amarillo pálido a borra de vino, y produjo un humo ligero que se disipó con una corriente de argón. La reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante una hora (la finalización de la reacción se confirmó por LCMS). Se retiró el solvente a presión reducida (rotavapor) a 70 °C. El residuo se diluyó con DCM y se lavó con $NaHSO_4$ 1N, salmuera,

bicarbonato de sodio saturado y nuevamente salmuera. Los orgánicos se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y se concentraron a sequedad para proporcionar 225 mg del compuesto 229 como una espuma amarilla frágil. LCMS y NMR fueron congruentes con la estructura.

El compuesto oligomérico 230, que comprende un grupo conjugado $GalNAc_3$-23se preparó a partir del compuesto 229 usando el procedimiento general ilustrado en el Ejemplo 46. La parte del conglomerado de $GalNAc_3$ del grupo conjugado $GalNAc_3$-23 ($GalNAc_3$-23_a) puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. La estructura de $GalNAc_3$-23 ($GalNAc_3$-23_a-CM) se muestra a continuación:



Ejemplo 77: Inhibición antisentido *in vivo* mediante oligonucleótidos dirigidos a SRB-1 que comprenden un conjugado $GalNAc_3$

Los oligonucleótidos enumerados a continuación se evaluaron en un estudio dependiente de la dosis en búsqueda de la inhibición antisentido de SRB-1 en ratones.

Tabla 64

ASO modificado dirigido a SRB-1

N.° ISIS	Secuencias (5′ a 3′)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO.
661161	**$GalNAc_3$-3_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-3a	A_d	831
666904	**$GalNAc_3$-3_a-** $_{o'}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-3a	PO	829
673502	**$GalNAc_3$-10_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-10a	A_d	831
677844	**$GalNAc_3$-9_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-9a	A_d	831
677843	**$GalNAc_3$-23_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-23a	A_d	831

655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_3-1_a$**	GalNAc$_3$-1a	A_d	830
677841	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_3-19_a$**	GalNAc$_3$-19a	A_d	830
677842	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_3-20_a$**	GalNAc$_3$-20a	A_d	830

Se mostró previamente la estructura de GalNAc$_3$-1$_a$ en el Ejemplo 9, GalNAc$_3$-3$_a$ se mostró en el Ejemplo 39, GalNAc$_3$-9a se mostró en el Ejemplo 52, GalNAc$_3$-10a se mostró en el Ejemplo 46, GalNAc$_3$-19$_a$ se mostró en el Ejemplo 70, GalNAc$_3$-20$_a$ se mostró en el Ejemplo 71 y GalNAc$_3$-23$_a$ se mostró en el Ejemplo 76.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones C57BL/6 de seis a ocho semanas (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una vez cada una con una dosificación que se muestra más adelante con un oligonucleótido enumerado en la Tabla 64 o con solución salina. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones fueron sacrificados 72 horas después de la

administración final para determinar los niveles de ARNm de SRB-1 mediante PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de SRB-1 para cada grupo de tratamiento, normalizados al control salino.

Tal como se ilustra en la Tabla 65, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de ARNm de SRB-1 de una forma dependiente de la dosis.

Tabla 65

ARNm de SRB-1 (% de solución salina)

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ARNm de SRB-1 (% de solución salina)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM
Solución salina	n/a	100,0	n/a	n/a
661161	0,5	89,18	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1,5	77,02		
	5	29,10		
	15	12,64		

666904	0,5	93,11	$GalNAc_3$-3a	PO
	1,5	55,85		
	5	21,29		
	15	13,43		
673502	0,5	77,75	$GalNAc_3$-10a	A_d
	1,5	41,05		
	5	19,27		
	15	14,41		
677844	0,5	87,65	$GalNAc_3$-9a	A_d
	1,5	93,04		
	5	40,77		
	15	16,95		
677843	0,5	102,28	$GalNAc_3$-23a	A_d
	1,5	70,51		
	5	30,68		
	15	13,26		
655861	0,5	79,72	$GalNAc_3$-1a	A_d
	1,5	55,48		
	5	26,99		
	15	17,58		
677841	0,5	67,43	$GalNAc_3$-19a	A_d
	1,5	45,13		
	5	27,02		
	15	12,41		

677842	0,5	64,13	$GalNAc_3$-20a	A_d
	1,5	53,56		
	5	20,47		
	15	10,23		

También se midieron los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y transaminasa en hígado, en suero mediante protocolos estándar. También se evaluaron BUN y la bilirrubina total. Los cambios de los pesos corporales se evaluaron sin cambios significativos a partir del grupo de solución salina (no se muestran los datos). Los valores de ALT, AST, bilirrubina total y BUN se muestran en la Tabla 66 a continuación.

Tabla 66

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bilirrubina total (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM
Solución salina	n/a	21	45	0,13	34	n/a	n/a
661161	0,5	28	51	0,14	39	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1,5	23	42	0,13	39		
	5	22	59	0,13	37		
	15	21	56	0,15	35		

666904	0,5	24	56	0,14	37	GalNAc$_3$-3a	PO
	1,5	26	68	0,15	35		
	5	23	77	0,14	34		
	15	24	60	0,13	35		
673502	0,5	24	59	0,16	34	GalNAc$_3$-10a	A_d
	1,5	20	46	0,17	32		
	5	24	45	0,12	31		
	15	24	47	0,13	34		
677844	0,5	25	61	0,14	37	GalNAc$_3$-9a	A_d
	1,5	23	64	0,17	33		
	5	25	58	0,13	35		
	15	22	65	0,14	34		
677843	0,5	53	53	0,13	35	GalNAc$_3$-23a	A_d
	1,5	25	54	0,13	34		
	5	21	60	0,15	34		
	15	22	43	0,12	38		
655861	0,5	21	48	0,15	33	GalNAc$_3$-1a	A_d
	1,5	28	54	0,12	35		
	5	22	60	0,13	36		
	15	21	55	0,17	30		
677841	0,5	32	54	0,13	34	GalNAc$_3$-19a	A_d
	1,5	24	56	0,14	34		
	5	23	92	0,18	31		
	15	24	58	0,15	31		

677842	0,5	23	61	0,15	35	$GalNAc_3$-20a	A_d
	1,5	24	57	0,14	34		
	5	41	62	0,15	35		
	15	24	37	0,14	32		

Ejemplo 78: Inhibición antisentido *in vivo* mediante oligonucleótidos dirigidos a angiotensinógeno que comprenden un conjugado $GalNAc_3$

Los oligonucleótidos enumerados a continuación se evaluaron en un estudio dependiente de la dosis en búsqueda de la inhibición antisentido de angiotensinógeno (AGT) en ratas Sprague Dawley normotensas.

Tabla 67

ASO modificado dirigido a AGT

N.° ISIS	Secuencias (5’ a 3’)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO.
552668	$^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}G_{es}$ $G_{es}A_{es}T_{e}$	n/a	n/a	835
669509	$^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}G_{es}$ $G_{es}A_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-$GalNAc_3$-1_a**	$GalNAc_3$-1_a	A_d	836

La estructura de $GalNAc_3$-1_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 9.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratas Sprague Dawley macho de seis semanas una vez por semana con la dosificación que se muestra más adelante, por un total de tres dosis, con un oligonucleótido enumerado en la Tabla 67 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Las ratas se sacrificaron 72 horas después de la dosis final. Se midieron los niveles de ARNm de AGT en hígado mediante PCR de tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los niveles de proteína AGT en plasma se midieron usando ELISA de angiotensinógeno total (n.° de catálogo JP27412, IBL International, Toronto, ON) con plasma diluido a 1:20.000. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de AGT en el hígado o niveles de proteína AGT en plasma para cada grupo de tratamiento, normalizados al control con PBS.

Como se ilustra en la Tabla 68, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de

proteína en plasma y ARNm en el hígado de AGT de una manera dependiente de la dosis y el oligonucleótido que comprende un conjugado GalNAc fue significativamente más potente que el oligonucleótido original que carecía del conjugado GalNAc.

Tabla 68

Niveles de proteína en plasma y ARNm en el hígado de AGT

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ARNm de AGT en el hígado (% de PBS)	Proteína AGT en plasma (% de PBS)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a
552668	3	95	122	n/a	n/a
	10	85	97		
	30	46	79		
	90	8	11		
669509	0,3	95	70	$GalNAc_3$-1a	A_d
	1	95	129		
	3	62	97		
	10	9	23		

Los niveles de transaminasa en el hígado, alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) en plasma y los pesos corporales también se midieron en el momento del sacrificio usando protocolos estándar. Los resultados se muestran en la Tabla 69 a continuación.

Tabla 69

Niveles de transaminasa en el hígado y pesos corporales de ratas

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Peso corporal (% del valor de referencia)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM
PBS	n/a	51	81	186	n/a	n/a
552668	3	54	93	183	n/a	n/a
	10	51	93	194		
	30	59	99	182		
	90	56	78	170		
669509	0,3	53	90	190	$GalNAc_3$-1a	A_d
	1	51	93	192		
	3	48	85	189		
	10	56	95	189		

Ejemplo 79: Duración de la acción *in vivo* de oligonucleótidos dirigidos a APOC-III que comprenden un conjugado $GalNAc_3$

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 70 a continuación se evaluaron en un estudio de una sola dosis para verificar la duración de acción en ratones.

Tabla 70

ASO modificado dirigido a APOC-III

N.° ISIS	Secuencias (5' a 3')	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO.
304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}\ T_{es}A_{es}T_{e}$	n/a	n/a	821
647535	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}\ T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$**-$GalNAc_3$-$1_a$**	$GalNAc_3$-1a	A_d	822
663083	**$GalNAc_3$-3_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}\ T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-3a	A_d	837
674449	**$GalNAc_3$-7_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}\ T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-7a	A_d	837
674450	**$GalNAc_3$-10_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}\ T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-10a	A_d	837
674451	**$GalNAc_3$-13_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}\ T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-13a	A_d	837

Se mostró previamente la estructura de $GalNAc_3$-1_a en el Ejemplo 9, $GalNAc_3$-3_a se mostró en el Ejemplo 39, $GalNAc_3$-7_a se mostró en el Ejemplo 48, $GalNAc_3$-10_a se mostró en el Ejemplo 46 y $GalNAc_3$-13_a se mostró en el Ejemplo 62.

Tratamiento

Cada uno de los ratones transgénicos de seis a ocho semanas que expresaban APOC-III humana se inyectaron por vía subcutánea una vez con un oligonucleótido enumerado en la Tabla 70 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 3 animales. Se extrajo sangre antes de dosificar para determinar un valor de referencia y a 72 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas y 6 semanas después de la dosis. Los niveles de proteína APOC-III y triglicéridos en plasma se midieron como se describió en el Ejemplo 20. Los resultados a continuación se presentan como un porcentaje promedio de niveles de APOC-III y triglicéridos en plasma para cada grupo de tratamiento, normalizados a niveles de valor de referencia, lo que muestra que los oligonucleótidos comprenden un grupo conjugado GalNAc presentaron una duración de acción mayor que el oligonucleótido original sin un grupo conjugado (ISIS 304801), incluso aunque la dosificación del compuesto original era tres veces la dosificación de los oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado GalNAc.

Tabla 71

Niveles de proteína APOC-III y triglicéridos en plasma en ratones transgénicos

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	Punto temporal (días después de la dosis)	Triglicéridos (% del valor de referencia)	Proteína APOC-III (% del valor de referencia)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM
PBS	n/a	3	97	102	n/a	n/a
		7	101	98		
		14	108	98		
		21	107	107		
		28	94	91		
		35	88	90		
		42	91	105		
304801	30	3	40	34	n/a	n/a
		7	41	37		
		14	50	57		
		21	50	50		
		28	57	73		
		35	68	70		
		42	75	93		
647535	10	3	36	37	$GalNAc_3$-1a	A_d
		7	39	47		
		14	40	45		
		21	41	41		
		28	42	62		
		35	69	69		
		42	85	102		

663083	10	3	24	18	$GalNAc_3$-3a	A_d
		7	28	23		
		14	25	27		
		21	28	28		
		28	37	44		
		35	55	57		
		42	60	78		
674449	10	3	29	26	$GalNAc_3$-7a	A_d
		7	32	31		
		14	38	41		
		21	44	44		
		28	53	63		
		35	69	77		
		42	78	99		
674450	10	3	33	30	$GalNAc_3$-10a	A_d
		7	35	34		
		14	31	34		
		21	44	44		
		28	56	61		
		35	68	70		
		42	83	95		
674451	10	3	35	33	$GalNAc_3$-13a	A_d
		7	24	32		
		14	40	34		
		21	48	48		
		28	54	67		
		35	65	75		
		42	74	97		

Ejemplo 80: Inhibición antisentido *in vivo* mediante oligonucleótidos dirigidos a alfa-1 antitripsina (A1AT) que comprenden un conjugado $GalNAc_3$

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 72 se evaluaron en un estudio de la inhibición dependiente de la dosis de A1AT en ratones.

Tabla 72

ASO modificado dirigido a A1AT

N.° ISIS	Secuencias (5′ a 3′)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO.
476366	$A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $G_{ds}A_{es}A_{es}$ $G_{es}G_{es}A_{e}$	n/a	n/a	838
656326	$A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $G_{ds}A_{es}A_{es}$ $G_{es}G_{es}A_{eo}$**$A_{do'}$-$GalNAc_3$-1_a**	$GalNAc_3$-1a	A_d	839
678381	**$GalNAc_3$-3_a-** $_{o'}$**A_{do}**$A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}$ $G_{es}G_{es}A_{e}$	$GalNAc_3$-3a	A_d	840
678382	**$GalNAc_3$-7_a-** $_{o'}$**A_{do}**$A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}$ $G_{es}G_{es}A_{e}$	$GalNAc_3$-7a	A_d	840

678383	**$GalNAc_3$-10_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $A_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}$ $G_{es}G_{es}A_e$	$GalNAc_3$-10a	A_d	840
678384	**$GalNAc_3$-13_a-** $_{o'}\mathbf{A_{do}}A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $A_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}$ $G_{es}G_{es}A_e$	$GalNAc_3$-13a	A_d	840

Se mostró previamente la estructura de $GalNAc_3$-1_a en el Ejemplo 9, $GalNAc_3$-3_a se mostró en el Ejemplo 39, $GalNAc_3$-7_a se mostró en el Ejemplo 48, $GalNAc_3$-10_a se mostró en el Ejemplo 46 y $GalNAc_3$-13_a se mostró en el Ejemplo 62.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones macho C57BL/6 de seis semanas (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una vez por semana con la dosificación que se muestra más adelante, por un total de tres dosis, con un oligonucleótido enumerado en la Tabla 72 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la última administración. Se determinaron los niveles de ARNm de A1AT en hígado mediante PCR de tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Se determinaron los niveles de proteína A1AT en plasma usando

ELISA alfa-1-antitripsina de ratón (n.° de catálogo 41-A1AMS-E01, Alpco, Salem, NH). Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de proteína en plasma y ARNm de A1AT en el hígado para cada grupo de tratamiento, normalizados al control con PBS.

Tal como se ilustra en la Tabla 73, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de proteína A1AT en plasma y ARNm de A1AT en hígado de una forma dependiente de la dosis. Los oligonucleótidos que comprendían un conjugado GalNAc fueron significativamente más potentes que el original (ISIS 476366).

Tabla 73

Niveles de proteína en plasma y ARNm en el hígado de A1AT

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ARNm de A1AT en el hígado (% PBS)	Proteína A1AT en plasma (% de PBS)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a
476366	5	86	78	n/a	n/a
	15	73	61		
	45	30	38		

656326	0,6	99	90	$GalNAc_3$-1a	A_d
	2	61	70		
	6	15	30		
	18	6	10		
678381	0,6	105	90	$GalNAc_3$-3a	A_d
	2	53	60		
	6	16	20		
	18	7	13		
678382	0,6	90	79	$GalNAc_3$-7a	A_d
	2	49	57		
	6	21	27		
	18	8	11		
678383	0,6	94	84	$GalNAc_3$-10a	A_d
	2	44	53		
	6	13	24		
	18	6	10		
678384	0,6	106	91	$GalNAc_3$-13a	A_d
	2	65	59		
	6	26	31		
	18	11	15		

Los niveles de BUN y transaminasa en el hígado se midieron al momento del sacrificio usando protocolos estándar. También se midieron los pesos corporales y los pesos de los órganos. Los resultados se muestran en la Tabla 74 a continuación. Los pesos corporales se muestran como % en relación con el valor

de referencia. Los pesos de los órganos se muestran como % de peso corporal en relación con el grupo de control con PBS.

Tabla 74

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Peso corporal (% del valor de referencia)	Peso del hígado (en rel. % de peso corporal)	Peso del riñón (en rel. % de peso corporal)	Peso del bazo (en rel. % de peso corporal)
PBS	n/a	25	51	37	119	100	100	100
476366	5	34	68	35	116	91	98	106
	15	37	74	30	122	92	101	128
	45	30	47	31	118	99	108	123
656326	0,6	29	57	40	123	100	103	119
	2	36	75	39	114	98	111	106
	6	32	67	39	125	99	97	122
	18	46	77	36	116	102	109	101
678381	0,6	26	57	32	117	93	109	110
	2	26	52	33	121	96	106	125
	6	40	78	32	124	92	106	126
	18	31	54	28	118	94	103	120
678382	0,6	26	42	35	114	100	103	103
	2	25	50	31	117	91	104	117
	6	30	79	29	117	89	102	107
	18	65	112	31	120	89	104	113

678383	0,6	30	67	38	121	91	100	123
	2	33	53	33	118	98	102	121
	6	32	63	32	117	97	105	105
	18	36	68	31	118	99	103	108
678384	0,6	36	63	31	118	98	103	98
	2	32	61	32	119	93	102	114
	6	34	69	34	122	100	100	96
	18	28	54	30	117	98	101	104

Ejemplo 81: Duración de la acción *in vivo* de oligonucleótidos dirigidos a A1AT que comprenden un conglomerado de $GalNAc_3$

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 72 se evaluaron en un estudio de una sola dosis para verificar la duración de acción en ratones.

Tratamiento

Ratones C57BL/6 macho de seis semanas se inyectaron por vía subcutánea una vez con un oligonucleótido enumerado en la Tabla 72 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Se extrajo sangre el día antes de dosificar para determinar el valor de referencia y a 5, 12, 19 y 25 días después de la dosis. Los niveles de proteína A1AT en plasma se midieron mediante ELISA (ver el Ejemplo 80). Los

resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de proteína A1AT en plasma para cada grupo de tratamiento, normalizados a los niveles de referencia. Los resultados muestran que los oligonucleótidos que comprenden un conjugado GalNAc fueron más potentes y tuvieron una duración de acción más prolongada que el original que carecía del conjugado GalNAc (ISIS 476366). Además, los oligonucleótidos que comprendían un conjugado 5'-GalNAc (ISIS 678381, 678382, 678383 y 678384) fueron generalmente incluso más potentes con una duración de acción incluso mayor que el oligonucleótido que comprendía un conjugado 3'-GalNAc (ISIS 656326).

Tabla 75

Niveles de proteína A1AT en plasma en ratones

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	Punto temporal (días después de la dosis)	A1AT (% del valor de referencia)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM
PBS	n/a	5	93	n/a	n/a
		12	93		
		19	90		
		25	97		
476366	100	5	38	n/a	n/a
		12	46		
		19	62		
		25	77		

656326	18	5	33	$GalNAc_3$-1a	A_d
		12	36		
		19	51		
		25	72		
678381	18	5	21	$GalNAc_3$-3a	A_d
		12	21		
		19	35		
		25	48		
678382	18	5	21	$GalNAc_3$-7a	A_d
		12	21		
		19	39		
		25	60		
678383	18	5	24	$GalNAc_3$-10a	A_d
		12	21		
		19	45		
		25	73		
678384	18	5	29	$GalNAc_3$-13a	A_d
		12	34		
		19	57		
		25	76		

Ejemplo 82: Inhibición antisentido *in vitro* mediante oligonucleótidos dirigidos a SRB-1 que comprenden un conjugado $GalNAc_3$

Se cultivaron hepatocitos primarios hepáticos de ratón en

placas de 96 pocillos a 15.000 células/pocillo 2 horas antes del tratamiento. Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 76 se agregaron a 2, 10, 50 o 250 nM en medio Williams E y las células se incubaron durante la noche a 37 °C en CO_2 al 5 %. Las células se lisaron 16 horas después de la adición de oligonucleótidos y el ARN total se purificó usando RNease 3000 BioRobot (Qiagen). Se determinaron los niveles de ARNm de SRB-1 mediante PCR de tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los valores de IC_{50} se determinaron usando el software Prism 4 (GraphPad). Los resultados muestran que los oligonucleótidos que comprendían una variedad de diferentes grupos conjugados GalNAc y una variedad de diferentes restos escindibles son significativamente más potentes en un experimento de absorción libre *in vitro* que los oligonucleótidos originales que carecían del grupo conjugado GalNAc (ISIS 353382 y 666841).

Tabla 76

Inhibición de la expresión de SRB-1 *in vitro*

N.° ISIS	Secuencia (5' a 3')	Uniones	Conglomerado de GalNAc	CM	IC_{50} (nM)	SEQ ID NO.

353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	n/a	n/a	250	829
655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-**$GalNAc_3$-$1_a$**	PS	$GalNAc_3$-1_a	A_d	40	830
661161	**$GalNAc_3$-3_a-**$_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	$GalNAc_3$-3_a	A_d	40	831
661162	**$GalNAc_3$-3_a-**$_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PO/PS	$GalNAc_3$-3_a	A_d	8	831
664078	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-**$GalNAc_3$-$9_a$**	PS	$GalNAc_3$-9_a	A_d	20	830
665001	**$GalNAc_3$-8_a-**$_{o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	$GalNAc_3$-8_a	A_d	70	831
666224	**$GalNAc_3$-5_a-**$_{o'}\mathbf{A_{d}}_{o}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	$GalNAc_3$-5_a	A_d	80	831

666841	$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PO/PS	n/a	n/a	>250	829
666881	**GalNAc$_3$-10$_a$-o'A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-10$_a$	A_d	30	831
666904	GalNAc3-3a-o'GesmCesTesTesmCesAdsGdsTdsmCdsAdsTdsGdsAdsmCdsTdsTesmCesmCesTesTe	PS	GalNAc3-3a	PO	9	829
666924	**GalNAc$_3$-3$_a$-o'T$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-3$_a$	T_d	15	834
666961	**GalNAc$_3$-6$_a$-o'A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-6$_a$	A_d	150	831
666981	**GalNAc$_3$-7$_a$-o'A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-7$_a$	A_d	20	831

670061	**GalNAc$_3$-13$_a$-** $_{o'}$**A$_{do}$**G$_{es}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$ ^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	PS	GalNAc$_3$-13$_a$	A$_d$	30	831
670699	**GalNAc$_3$-3$_a$-** $_{o'}$**T$_{do}$**G$_{es}$ ^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$ ^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$ ^{m}C$_{eo}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	PO/PS	GalNAc$_3$-3$_a$	T$_d$	15	834
670700	**GalNAc$_3$-3$_a$-** $_{o'}$**A$_{eo}$**G$_{es}$ ^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$ ^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$ T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$ ^{m}C$_{eo}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T	PO/PS	GalNAc$_3$-3$_a$	A$_e$	30	831
670701	**GalNAc$_3$-3$_a$-** $_{o'}$**T$_{eo}$**G$_{es}$ ^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$ ^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$ ^{m}C$_{eo}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	PO/PS	GalNAc$_3$-3$_a$	T$_e$	25	834
671144	**GalNAc$_3$-12$_a$-** $_{o'}$**A$_{do}$**G$_{es}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$ ^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$ ^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	PS	GalNAc$_3$-12$_a$	A$_d$	40	831
671165	**GalNAc$_3$-13$_a$-** $_{o'}$**A$_{do}$**G$_{es}$ ^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$ ^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$ ^{m}C$_{eo}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T	PO/PS	GalNAc$_3$-13$_a$	A$_d$	8	831

671261	**GalNAc$_3$-14$_a$-** $_{o'}$**A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	PS	GalNAc$_3$-14$_a$	A$_d$	>250	831
671262	**GalNAc$_3$-15$_a$-** $_{o'}$**A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	PS	GalNAc$_3$-15$_a$	A$_d$	>250	831
673501	**GalNAc$_3$-7$_a$-** $_{o'}$**A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$^{m} C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	PO/PS	GalNAc$_3$-7$_a$	A$_d$	30	831
673502	**GalNAc$_3$-10$_a$-** $_{o'}$**A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	PO/PS	GalNAc$_3$-10$_a$	A$_d$	8	831
675441	**GalNAc$_3$-17$_a$-** $_{o'}$**A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	PS	GalNAc$_3$-17$_a$	A$_d$	30	831
675442	**GalNAc$_3$-18$_a$-** $_{o'}$**A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	PS	GalNAc$_3$-18$_a$	A$_d$	20	831

677841	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-**GalNAc$_3-19_a$**	PS	GalNAc$_3$-19$_a$	A_d	40	830
677842	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-**GalNAc$_3-20_a$**	PS	GalNAc$_3$-20$_a$	A_d	30	830
677843	**GalNAc$_3$-23$_a$**-$\mathbf{_{o'}A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-23$_a$	A_d	40	831

La estructura de GalNAc$_3$-1$_a$ se mostró previamente en el Ejemplo 9, GalNAc$_3$-3$_a$ se mostró en el Ejemplo 39, GalNAc$_3$-5$_a$ se mostró en el Ejemplo 49, GalNAc$_3$-6$_a$ se mostró en el Ejemplo 51, GalNAc$_3$-7$_a$ se mostró en el Ejemplo 48, GalNAc$_3$-8$_a$ se mostró en el Ejemplo 47, GalNAc$_3$-9$_a$ se mostró en el Ejemplo 52, GalNAc$_3$-10$_a$ se mostró en el Ejemplo 46, GalNAc$_3$-12$_a$ se mostró en el Ejemplo 61, GalNAc$_3$-13$_a$ se mostró en el Ejemplo 62, GalNAc$_3$-14$_a$ se mostró en el Ejemplo 63, GalNAc$_3$-15$_a$ se mostró en el Ejemplo 64, GalNAc$_3$-17$_a$ se mostró en el Ejemplo 68, GalNAc$_3$-18$_a$ se mostró en el Ejemplo 69, GalNAc$_3$-19$_a$ se mostró en el Ejemplo 70, GalNAc$_3$-20$_a$ se mostró en el Ejemplo 71 y GalNAc$_3$-23$_a$ se mostró en el Ejemplo 76.

Ejemplo 83: Inhibición antisentido *in vivo* mediante oligonucleótidos dirigidos al FACTOR XI que comprenden un conglomerado de $GalNAc_3$

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 77 se evaluaron en un estudio de la inhibición dependiente de la dosis de Factor XI en ratones.

Tabla 77

Oligonucleótidos modificados dirigidos a Factor XI

N.° ISIS	Secuencia (5′ a 3′)	Conglomerado de GalNAc	CM	SEQ ID NO.
404071	$T_{es}G_{es}G_{es}T_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}G_{es}$ $A_{es}G_{es}G_{e}$	n/a	n/a	832
656173	$T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}$ $A_{es}G_{es}G_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-**$GalNAc_3$-$1_a$**	$GalNAc_3$-1_a	A_d	833
663086	**$GalNAc_3$-3_a-** **$_{o'}\mathbf{A_{do}}$**$T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{e}$	$GalNAc_3$-3_a	A_d	841
678347	**$GalNAc_3$-7_a-** **$_{o'}\mathbf{A_{do}}$**$T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{e}$	$GalNAc_3$-7_a	A_d	841
678348	**$GalNAc_3$-10_a-** **$_{o'}\mathbf{A_{do}}$**$T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{e}$	$GalNAc_3$-10_a	A_d	841
678349	**$GalNAc_3$-13_a-** **$_{o'}\mathbf{A_{do}}$**$T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{e}$	$GalNAc_3$-13_a	A_d	841

Se mostró previamente la estructura de $GalNAc_3$-1_a en el Ejemplo 9, $GalNAc_3$-3_a se mostró en el Ejemplo 39, $GalNAc_3$-7_a se mostró en el Ejemplo 48, $GalNAc_3$-10_a se mostró en el Ejemplo 46 y $GalNAc_3$-13_a se mostró en el Ejemplo 62.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones de seis semanas una vez por semana con la dosificación que se muestra más adelante, por un total de tres dosis, con un oligonucleótido enumerado más adelante o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la dosis final. Se midieron los niveles de ARNm en el hígado de Factor XI usando PCR en tiempo real y se normalizaron a ciclofilina de acuerdo con protocolos estándar. También se midieron las transaminasas en el hígado, BUN y bilirrubina. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio para cada grupo de tratamiento, normalizados al control con PBS.

Tal como se ilustra en la Tabla 78, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de ARNm en el hígado de Factor XI de una forma dependiente de la dosis. Los resultados muestran que los oligonucleótidos que

comprenden un conjugado GalNAc fueron más potentes que el original que carecía del conjugado GalNAc (ISIS 404071). Además, los oligonucleótidos que comprendían un conjugado 5'-GalNAc (ISIS 663086, 678347, 678348 y 678349) fueron incluso más potentes que el oligonucleótido que comprendía un conjugado 3'-GalNAc (ISIS 656173).

Tabla 78

Niveles bilirrubina, BUN, transaminasa hepática y ARNm en el hígado de Factor XI

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ARNm de Factor XI (% de PBS)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Bilirrubina (mg/dL)	Conglomerado de $GalNAc_3$	SEQ ID NO.
PBS	n/a	100	63	70	21	0,18	n/a	n/a
404071	3	65	41	58	21	0,15	n/a	832
	10	33	49	53	23	0,15		
	30	17	43	57	22	0,14		
656173	0,7	43	90	89	21	0,16	$GalNAc_3$-1a	833
	2	9	36	58	26	0,17		
	6	3	50	63	25	0,15		
663086	0,7	33	91	169	25	0,16	$GalNAc_3$-3a	841
	2	7	38	55	21	0,16		
	6	1	34	40	23	0,14		
678347	0,7	35	28	49	20	0,14	$GalNAc_3$-7a	841
	2	10	180	149	21	0,18		
	6	1	44	76	19	0,15		

678348	0,7	39	43	54	21	0,16	$GalNAc_3$-10a	841
	2	5	38	55	22	0,17		
	6	2	25	38	20	0,14		
678349	0,7	34	39	46	20	0,16	$GalNAc_3$-13a	841
	2	8	43	63	21	0,14		
	6	2	28	41	20	0,14		

Ejemplo 84: Duración de la acción *in vivo* de oligonucleótidos dirigidos al FACTOR XI que comprenden un conjugado $GalNAc_3$

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 77 se evaluaron en un estudio de una sola dosis para verificar la duración de acción en ratones.

Tratamiento

Se inyectaron ratones de seis a ocho semanas por vía subcutánea una vez con un oligonucleótido enumerado en la Tabla 77 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Se extrajo sangre de la cola el día antes de dosificar para determinar el valor de referencia y a 3, 10 y 17 días después de la dosis. Se midieron los valores de proteína de Factor XI en plasma mediante ELISA usando anticuerpos de detección biotinilados y de captura de Factor

XI de R & D Systems, Minneapolis, MN (n.° de catálogo AF2460 y # BAF2460, respectivamente) y OptEIA Reagent Set B (n.° de catálogo 550534, BD Biosciences, San José, CA). Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de proteína de Factor XI en plasma para cada grupo de tratamiento, normalizados a los niveles de referencia. Los resultados muestran que los oligonucleótidos que comprenden un conjugado GalNAc fueron más potentes con una duración de acción más prolongada que el original que carecía del conjugado GalNAc (ISIS 404071). Además, los oligonucleótidos que comprendían un conjugado 5'-GalNAc (ISIS 663086, 678347, 678348 y 678349) fueron incluso más potentes con una duración de acción incluso mayor que el oligonucleótido que comprendía un conjugado 3'-GalNAc (ISIS 656173).

Tabla 79

Niveles de proteína de Factor XI en plasma en ratones

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	Punto temporal (días después de la dosis)	Factor XI (% del valor de referencia)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO.
PBS	n/a	3	123	n/a	n/a	n/a
		10	56			
		17	100			

404071	30	3	11	n/a	n/a	832
		10	47			
		17	52			
656173	6	3	1	$GalNAc_3$-1a	A_d	833
		10	3			
		17	21			
663086	6	3	1	$GalNAc_3$-3a	A_d	841
		10	2			
		17	9			
678347	6	3	1	$GalNAc_3$-7a	A_d	841
		10	1			
		17	8			
678348	6	3	1	$GalNAc_3$-10a	A_d	841
		10	1			
		17	6			
678349	6	3	1	$GalNAc_3$-13a	A_d	841
		10	1			
		17	5			

Ejemplo 85: Inhibición antisentido *in vivo* mediante oligonucleótidos dirigidos a SRB-1 que comprenden un conjugado $GalNAc_3$

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 76 se evaluaron en un estudio dependiente de la dosis en búsqueda de la inhibición antisentido de SRB-1 en ratones.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones C57BL/6 de seis semanas una vez por semana con la dosificación que se muestra más adelante, por un total de tres dosis, con un oligonucleótido enumerado en la Tabla 76 o con solución salina. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones fueron sacrificados 48 horas después de la administración final para determinar los niveles de ARNm de SRB-1 mediante PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de SRB-1 en el hígado para cada grupo de tratamiento, normalizados al control salino.

Tal como se ilustra en las Tablas 80 y 81, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de ARNm de SRB-1 de una forma dependiente de la dosis.

Tabla 80

ARNm de SRB-1 en el hígado

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ARNm de SRB-1 (% de solución salina)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM
Solución salina	n/a	100	n/a	n/a
655861	0,1	94	$GalNAc_3$-1a	A_d
	0,3	119		
	1	68		
	3	32		
661161	0,1	120	$GalNAc_3$-3a	A_d
	0,3	107		
	1	68		
	3	26		
666881	0,1	107	$GalNAc_3$-10a	A_d
	0,3	107		
	1	69		
	3	27		
666981	0,1	120	$GalNAc_3$-7a	A_d
	0,3	103		
	1	54		
	3	21		
670061	0,1	118	$GalNAc_3$-13a	A_d
	0,3	89		
	1	52		
	3	18		
677842	0,1	119	$GalNAc_3$-20a	A_d
	0,3	96		
	1	65		
	3	23		

Tabla 81

ARNm de SRB-1 en el hígado

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ARNm de SRB-1 (% de solución salina)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM
661161	0,1	107	$GalNAc_3$-3a	A_d
	0,3	95		
	1	53		
	3	18		
677841	0,1	110	$GalNAc_3$-19a	A_d
	0,3	88		
	1	52		
	3	25		

Los niveles de transaminasa en el hígado, bilirrubina total, BUN y pesos corporales también se midieron usando protocolos estándar. Se muestran valores promedio para cada grupo de tratamiento en la Tabla 82 a continuación.

Tabla 82

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bilirrubina (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Peso corporal (% del valor de referencia)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM
Solución salina	n/a	19	39	0,17	26	118	n/a	n/a

655861	0,1	25	47	0,17	27	114	$GalNAc_3$-1a	A_d
	0,3	29	56	0,15	27	118		
	1	20	32	0,14	24	112		
	3	27	54	0,14	24	115		
661161	0,1	35	83	0,13	24	113	$GalNAc_3$-3a	A_d
	0,3	42	61	0,15	23	117		
	1	34	60	0,18	22	116		
	3	29	52	0,13	25	117		
666881	0,1	30	51	0,15	23	118	$GalNAc_3$-10a	A_d
	0,3	49	82	0,16	25	119		
	1	23	45	0,14	24	117		
	3	20	38	0,15	21	112		
666981	0,1	21	41	0,14	22	113	$GalNAc_3$-7a	A_d
	0,3	29	49	0,16	24	112		
	1	19	34	0,15	22	111		
	3	77	78	0,18	25	115		
670061	0,1	20	63	0,18	24	111	$GalNAc_3$-13a	A_d
	0,3	20	57	0,15	21	115		
	1	20	35	0,14	20	115		
	3	27	42	0,12	20	116		
677842	0,1	20	38	0,17	24	114	$GalNAc_3$-20a	A_d
	0,3	31	46	0,17	21	117		
	1	22	34	0,15	21	119		
	3	41	57	0,14	23	118		

Ejemplo 86: Inhibición antisentido in vivo mediante oligonucleótidos dirigidos a TTR que comprenden un conglomerado de $GalNAc_3$

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 83 a continuación fueron examinados en un estudio dependiente de la dosis en búsqueda de inhibición antisentido de transtiretina (TTR) humana en ratones transgénicos que expresan el gen de la TTR humana.

Tratamiento

Se inyectaron ratones transgénicos con TTR de ocho semanas cada uno de manera subcutánea una vez a la semana durante tres semanas, por un total de tres dosis, con un oligonucleótido y la dosificación enumerada en las tablas a continuación o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la última administración. Se extrajo sangre de la cola en varios momentos a lo largo del experimento, y se midieron los niveles de proteína TTR, ALT y AST en plasma y se enumeran en las Tablas 85-87. Después de sacrificar los animales, se midieron los niveles de ALT, AST y TTR humana en plasma, así como los niveles de pesos corporales, pesos de los órganos y

ARNm de TTR humana en el hígado. Los niveles de proteína TTR se midieron con un analizador clínico (AU480, Beckman Coulter, CA). Se utilizó PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar para determinar los niveles de ARNm de TTR humana en hígado. Los resultados presentados en las Tablas 84-87 son los valores promedio para cada grupo de tratamiento. Los niveles de ARNm son los valores promedio relativos al promedio para el grupo de PBS. Los niveles de proteína en plasma son los valores promedio relativos al valor promedio para el grupo de PBS en el punto inicial. Los pesos corporales son el cambio en peso porcentual promedio a partir del valor de referencia hasta el sacrificio para cada grupo de tratamiento individual. Los pesos de los órganos que se muestran están normalizados al peso corporal de los animales, y el peso de los órganos normalizados promedio para cada grupo de tratamiento se presenta con relación al peso de órganos normalizado promedio para el grupo de PBS.

En las Tablas 84-87, "BL" indica los valores de referencia, medidas que se tomaron previo a la primera dosis. Tal como se ilustra en las Tablas 84 y 85, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de

expresión de TTR de una forma dependiente de la dosis. Los oligonucleótidos que comprenden un conjugado GalNAc fueron más potentes que el original que carecía del conjugado GalNAc (ISIS 420915). Además, los oligonucleótidos que comprenden un conjugado GalNAc y uniones internucleósido PS/PO mixtas fueron incluso más potentes que los oligonucleótidos que comprenden un conjugado GalNAc y enlaces completamente PS.

Tabla 83

Oligonucleótidos dirigidos a TTR humana

N.° Isis	Secuencia 5′ a 3′	Uniones	Conglomerado de GalNAc	CM	SEQ ID NO.
420915	$T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}G_{es}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}$ $A_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS	n/a	n/a	842
660261	$T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}G_{es}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}$ $A_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{eo}\mathbf{A_{do}}$-**$GalNAc_3$-$1_a$**	PS	$GalNAc_3$-1a	A_d	843
682883	**$GalNAc_3$-3_a-**$_o$,$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	$GalNAc_3$-3a	PO	842
682884	**$GalNAc_3$-7_a-**$_o$,$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	$GalNAc_3$-7a	PO	842

682885	**GalNAc$_3$-10$_{a}$-** **o**,$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-10a	PO	842
682886	**GalNAc$_3$-13$_{a}$-** **o**,$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-13a	PO	842
684057	$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{eo}$**A$_{do}$**,- **GalNAc$_3-19_{a}$**	PS/PO	GalNAc$_3$-19a	A$_d$	843

La leyenda de la Tabla 85 puede encontrarse en el Ejemplo 74. La estructura de GalNAc3-1 se mostró en el Ejemplo 9. La estructura de GalNAc$_3$-3$_a$ se mostró en el Ejemplo 39. La estructura de GalNAc$_3$-7$_a$ se mostró en el Ejemplo 48. La estructura de GalNAc$_3$-10$_a$ se mostró en el Ejemplo 46. La estructura de GalNAc$_3$-13$_a$ se mostró en el Ejemplo 62. La estructura de GalNAc$_3$-19$_a$ se mostró en el Ejemplo 70.

Tabla 84

Inhibición antisentido de TTR humana *in vivo*

N.° Isis	Dosificación (mg/kg)	ARNm de TTR (% de PBS)	Proteína TTR en plasma (% de PBS)	Conglomerado de GalNAc	CM	SEQ ID NO.
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a	
420915	6	99	95	n/a	n/a	842
	20	48	65			
	60	18	28			
660261	0,6	113	87	$GalNAc_3$-1a	A_d	843
	2	40	56			
	6	20	27			
	20	9	11			

Tabla 85

Inhibición antisentido de TTR humana *in vivo*

N.° Isis	Dosificación (mg/kg)	ARNm de TTR (% de PBS)	Proteína TTR en plasma (% PBS a BL)				Conglomerado de GalNAc	CM	SEQ ID NO.
			BL	Día 3	Día 10	Día 17 (después de sac.)			
PBS	n/a	100	100	96	90	114	n/a	n/a	
420915	6	74	106	86	76	83	n/a	n/a	842
	20	43	102	66	61	58			
	60	24	92	43	29	32			
682883	0,6	60	88	73	63	68	$GalNAc_3$-3a	PO	842
	2	18	75	38	23	23			
	6	10	80	35	11	9			

682884	0,6	56	88	78	63	67	$GalNAc_3$-7a	PO	842
	2	19	76	44	25	23			
	6	15	82	35	21	24			
682885	0,6	60	92	77	68	76	$GalNAc_3$-10a	PO	842
	2	22	93	58	32	32			
	6	17	85	37	25	20			
682886	0,6	57	91	70	64	69	$GalNAc_3$-13a	PO	842
	2	21	89	50	31	30			
	6	18	102	41	24	27			
684057	0,6	53	80	69	56	62	$GalNAc_3$-19a	A_d	843
	2	21	92	55	34	30			
	6	11	82	50	18	13			

Tabla 86

Niveles de transaminasa, cambios en el peso corporal y pesos de órganos relativos

N.° Isis	Dosificación (mg/kg)	ALT (U/L)				AST (U/L)				Cuerpo (% del valor de referencia)	Hígado (% de PBS)	Bazo (% de PBS)	Riñón (% de PBS)	SEQ ID NO.
		BL	Día 3	Día 10	Día 17	BL	Día 3	Día 10	Día 17					
PBS	n/a	33	34	33	24	58	62	67	52	105	100	100	100	n/a
420915	6	34	33	27	21	64	59	73	47	115	99	89	91	842
	20	34	30	28	19	64	54	56	42	111	97	83	89	
	60	34	35	31	24	61	58	71	58	113	102	98	95	

660261	0,6	33	38	28	26	70	71	63	59	111	96	99	92	843
	2	29	32	31	34	61	60	68	61	118	100	92	90	
	6	29	29	28	34	58	59	70	90	114	99	97	95	
	20	33	32	28	33	64	54	68	95	114	101	106	92	

Tabla 87

Niveles de transaminasa, cambios en el peso corporal y pesos de órganos relativos

N.° Isis	Dosificación (mg/kg)	ALT (U/L)				AST (U/L)				Cuerpo (% del valor de referencia)	Hígado (% de PBS)	Bazo (% de PBS)	Riñón (% de PBS)	SEQ ID NO.
		BL	Día 3	Día 10	Día 17	BL	Día 3	Día 10	Día 17					
PBS	n/a	32	34	37	41	62	78	76	77	104	100	100	100	n/a
420915	6	32	30	34	34	61	71	72	66	102	103	102	105	842
	20	41	34	37	33	80	76	63	54	106	107	135	101	
	60	36	30	32	34	58	81	57	60	106	105	104	99	
682883	0,6	32	35	38	40	53	81	74	76	104	101	112	95	842
	2	38	39	42	43	71	84	70	77	107	98	116	99	
	6	35	35	41	38	62	79	103	65	105	103	143	97	
682884	0,6	33	32	35	34	70	74	75	67	101	100	130	99	842
	2	31	32	38	38	63	77	66	55	104	103	122	100	
	6	38	32	36	34	65	85	80	62	99	105	129	95	
682885	0,6	39	26	37	35	63	63	77	59	100	109	109	112	842
	2	30	26	38	40	54	56	71	72	102	98	111	102	
	6	27	27	34	35	46	52	56	64	102	98	113	96	
682886	0,6	30	40	34	36	58	87	54	61	104	99	120	101	842
	2	27	26	34	36	51	55	55	69	103	91	105	92	
	6	40	28	34	37	107	54	61	69	109	100	102	99	

684057	0,6	35	26	33	39	56	51	51	69	104	99	110	102	843
	2	33	32	31	40	54	57	56	87	103	100	112	97	
	6	39	33	35	40	67	52	55	92	98	104	121	108	

Ejemplo 87: Duración de la acción *in vivo* mediante dosis individuales de oligonucleótidos dirigidos a TTR que comprenden un conglomerado de $GalNAc_3$

Los números ISIS 420915 y 660261 (ver Tabla 83) se evaluaron en un estudio de una sola dosis para verificar la duración de acción en ratones. Los números ISIS 420915, 682883 y 682885 (ver Tabla 83) también se evaluaron en un estudio de una sola dosis para verificar la duración de acción en ratones.

Tratamiento

Los ratones transgénicos macho de ocho semanas que expresaban TTR humana se inyectaron cada uno por vía subcutánea con 100 mg/kg de ISIS n.° 420915 o 13,5 mg/kg de ISIS n.° 660261. Cada grupo de tratamiento consistía en 4 animales. Se extrajo sangre de la cola antes dosificar para determinar el valor de referencia y en los días 3, 7, 10, 17, 24 y 39 después de la dosis. Los niveles de proteína TTR en plasma se midieron como se describió en el Ejemplo 86. Los resultados a continuación

se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de TTR en plasma para cada grupo de tratamiento, normalizados a los niveles de referencia.

Tabla 88

Niveles de proteína TTR en plasma

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	Punto temporal (días después de la dosis)	TTR (% del valor de referencia)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO.
420915	100	3	30	n/a	n/a	842
		7	23			
		10	35			
		17	53			
		24	75			
		39	100			
660261	13,5	3	27	$GalNAc_3$-1a	A_d	843
		7	21			
		10	22			
		17	36			
		24	48			
		39	69			

Tratamiento

Los ratones transgénicos hembra que expresaban TTR humana se inyectaron una vez por vía subcutánea con 100 mg/kg de ISIS n.º 420915, 10,0 mg/kg de ISIS n.º 682883 o 10,0 mg/kg de 682885. Cada grupo de tratamiento consistía en 4 animales. Se extrajo sangre de la cola antes dosificar para determinar el valor de referencia y en los días 3, 7, 10, 17, 24 y 39 después de la dosis. Los niveles de proteína TTR en plasma se midieron como se describió en el Ejemplo 86. Los resultados a continuación se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de TTR en plasma para cada grupo de tratamiento, normalizados a los niveles de referencia.

Tabla 89

Niveles de proteína TTR en plasma

N.º ISIS	Dosificación (mg/kg)	Punto temporal (días después de la dosis)	TTR (% del valor de referencia)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO.
420915	100	3	48	n/a	n/a	842
		7	48			
		10	48			
		17	66			
		31	80			

682883	10,0	3	45	$GalNAc_3$-3a	PO	842
		7	37			
		10	38			
		17	42			
		31	65			
682885	10,0	3	40	$GalNAc_3$-10a	PO	842
		7	33			
		10	34			
		17	40			
		31	64			

Los resultados en las Tablas 88 y 89 muestran que los oligonucleótidos que comprenden un conjugado GalNAc son más potentes con una duración de acción más prolongada que el oligonucleótido original que carece de un conjugado (ISIS 420915).

Ejemplo 88: Modulación del corte y empalme *in vivo* mediante oligonucleótidos dirigidos a SMN que comprenden un conjugado $GalNAc_3$

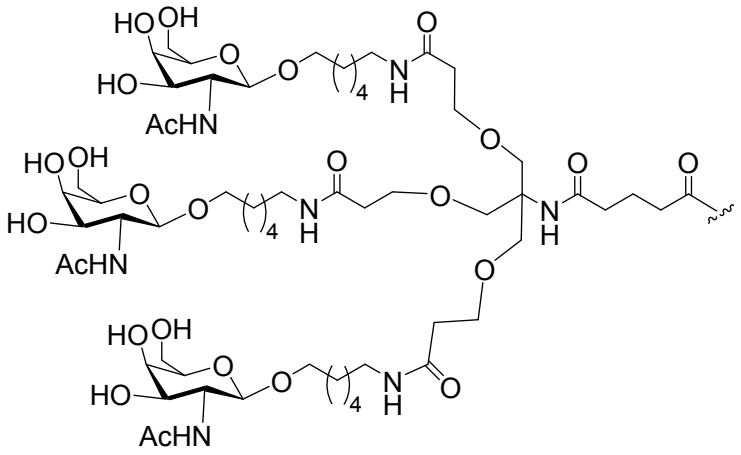
Los oligonucleótido enumerados en la Tabla 90 se evaluaron para verificar la modulación del corte y empalme en la supervivencia de neuronas motoras (SMN, por sus siglas en inglés) humanas en ratones.

Tabla 90

ASO modificados dirigidos a SMN

N.° ISIS	Secuencias (5’ a 3’)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO.
387954	$A_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{es}A_{es}$ $A_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}$ G_{e}	n/a	n/a	844
699819	**$GalNAc_3$-7_a-** **$_{o’}$**$A_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{es}A_{es}A_{es}$ $T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}G_{e}$	$GalNAc_3$-7a	PO	844
699821	**$GalNAc_3$-7_a-** **$_{o’}$**$A_{es}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{eo}T_{eo}A_{eo}$ $A_{eo}T_{eo}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{es}G_{es}G_{e}$	$GalNAc_3$-7a	PO	844
700000	$A_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{es}A_{es}$ $A_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}$ G_{eo}**$A_{do’}$-$GalNAc_3$-1_a**	$GalNAc_3$-1a	A_d	845
703421	X-ATT^{m}CA^{m}CTTT^{m}CATAATG^{m}CTGG	n/a	n/a	844
703422	**$GalNAc_3$-7_b-**X- ATT^{m}CA^{m}CTTT^{m}CATAATG^{m}CTGG	$GalNAc_3$-7b	n/a	844

La estructura de $GalNAc_3$-7_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 48. "X" indica una amina primaria 5’ generada por Gene Tools (Philomath, OR), y $GalNAc_3$-7_b indica la estructura de $GalNAc_3$-7_a que carece de la parte –NH-C_6-O del enlazador como se muestra a continuación:



Los números ISIS 703421 y 703422 son oligonucleótidos morfolino, donde cada nucleótido de los dos oligonucleótidos es un nucleótido morfolino.

Tratamiento

Se inyectaron ratones transgénicos de seis semanas que expresaban SMN humana por vía subcutánea una vez con un oligonucleótido enumerado en la Tabla 91 o con solución salina. Cada grupo de tratamiento consistió en 2 machos y 2 hembras. Los ratones se sacrificaron 3 días después de la dosis para determinar los niveles de ARNm de SMN en el hígado tanto con como sin el exón 7 usando PCR de tiempo real de acuerdo con protocolos estándar. El ARN total se midió usando el reactivo Ribogreen. Los niveles de ARNm de SMN se normalizaron al ARNm total, y se normalizaron adicionalmente a los promedios para el grupo de tratamiento con solución

salina. Las proporciones promedio resultantes de ARNm de SMN que incluye el exón 7 respecto al ARNm de SMN que carece del exón 7 se muestran en la Tabla 91. Los resultados muestran que los oligonucleótido completamente modificados que modulan el corte y empalme y comprenden un conjugado GalNAc son significativamente más potentes en alterar el corte y empalme en el hígado que los oligonucleótidos originales que carecen de un conjugado GlaNAc. Además, esta tendencia se mantiene para múltiples químicas de modificación, inclusive oligonucleótidos modificados con morfolino y 2'-MOE.

Tabla 91

Efecto de oligonucleótidos dirigidos a SMN humana *in vivo*

N.° ISIS	Dosis (mg/kg)	+ Exón 7 / - Exón 7	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO.
Solución salina	n/a	1,00	n/a	n/a	n/a
387954	32	1,65	n/a	n/a	844
387954	288	5,00	n/a	n/a	844
699819	32	7,84	$GalNAc_3$-7a	PO	844
699821	32	7,22	$GalNAc_3$-7a	PO	844
700000	32	6,91	$GalNAc_3$-1a	A_d	845
703421	32	1,27	n/a	n/a	844
703422	32	4,12	$GalNAc_3$-7b	n/a	844

Ejemplo 89: Inhibición antisentido *in vivo* mediante oligonucleótidos dirigidos a apolipoproteína A (Apo(a)) que comprenden un conjugado $GalNAc_3$

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 92 se evaluaron en un estudio de la inhibición dependiente de la dosis de Apo(a) en ratones transgénicos.

Tabla 92

ASO modificados dirigidos a Apo(a)

N.° ISIS	Secuencias (5′ a 3′)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO.
494372	$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	n/a	n/a	847
681257	**$GalNAc_3$-7_a-** $_{o}$′$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-7a	PO	847

La estructura de $GalNAc_3$-7_a se mostró en el Ejemplo 48.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones hembra C57BL/6 de ocho semanas (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una vez por semana con la dosificación que se muestra más adelante, por

un total de seis dosis, con un oligonucleótido enumerado en la Tabla 92 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 3-4 animales. Se realizaron sangrados de cola el día antes de la primera dosis y semanalmente, luego de cada dosis, para determinar los niveles de la proteína Apo(a) en plasma. Los ratones se sacrificaron dos días después de la administración final. Se determinaron los niveles de ARNm de Apo(a) en hígado mediante PCR de tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar. Los niveles de proteína Apo(a) en plasma se determinaron mediante ELISA y se determinaron los niveles de transaminasa en hígado. Los resultados de proteína en plasma y ARNm de la Tabla 93 se presentan como el porcentaje promedio del grupo de tratamiento en comparación con el grupo tratado con PBS. Los niveles de proteína en plasma se normalizaron adicionalmente al valor de referencia (BL) para el grupo de PBS. Se informan los niveles absolutos promedio de transaminasa y pesos corporales (% relativo a los promedios de referencia) en la Tabla 94.

Tal como se ilustra en la Tabla 93, el tratamiento con los oligonucleótidos disminuyó los niveles de proteína en plasma y ARNm de Apo(a) en hígado de una forma dependiente de la

dosis. Además, el oligonucleótido que comprendía el conjugado GalNAc era significativamente más potente con una mayor duración de la acción que el oligonucleótido original sin el conjugado GalNAc. Tal como se ilustra en la Tabla 94, los niveles de transaminasa y pesos corporales no se vieron afectados por los oligonucleótidos, lo que indica que los oligonucleótidos se toleraron positivamente.

Tabla 93

Niveles de proteína en plasma y ARNm de Apo(a) en hígado

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ARNm de Apo(a) (% de PBS)	Proteína Apo(a) en plasma (% de PBS)						
			BL	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
PBS	n/a	100	100	120	119	113	88	121	97
494372	3	80	84	89	91	98	87	87	79
	10	30	87	72	76	71	57	59	46
	30	5	92	54	28	10	7	9	7
681257	0,3	75	79	76	89	98	71	94	78
	1	19	79	88	66	60	54	32	24
	3	2	82	52	17	7	4	6	5
	10	2	79	17	6	3	2	4	5

Tabla 94

N.º ISIS	Dosificación (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Peso corporal (% del valor de referencia)
PBS	n/a	37	54	103
494372	3	28	68	106
	10	22	55	102
	30	19	48	103
681257	0,3	30	80	104
	1	26	47	105
	3	29	62	102
	10	21	52	107

Ejemplo 90: Inhibición antisentido in vivo mediante oligonucleótidos dirigidos a TTR que comprenden un conglomerado de $GalNAc_3$

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 95 a continuación fueron examinados en un estudio dependiente de la dosis en búsqueda de inhibición antisentido de transtiretina (TTR) humana en ratones transgénicos que expresan el gen de la TTR humana.

Tratamiento

Los ratones transgénicos con TTR fueron inyectados cada uno de manera subcutánea una vez a la semana durante tres semanas, por un total de tres dosis, con un oligonucleótido y la dosificación enumerada en la Tabla 96 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Previo a la primera dosis, se realizó un sangrado de cola para determinar los niveles de proteína TTR en plasma en un valor de referencia (BL). Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la última administración. Los niveles de proteína TTR se midieron con un analizador clínico (AU480, Beckman Coulter, CA). Se utilizó PCR en tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acuerdo con los protocolos estándar para determinar los niveles de ARNm de TTR humana en hígado. Los resultados presentados en la Tabla 96 son los valores promedio para cada grupo de tratamiento. Los niveles de ARNm son los valores promedio relativos al promedio para el grupo de PBS. Los niveles de proteína en plasma son los valores promedio relativos al valor promedio para el grupo de PBS en el punto inicial. "BL" indica los valores de referencia, medidas que se tomaron previo a la primera dosis. Tal como se ilustra en la Tabla 96, el tratamiento con oligonucleótidos

antisentido disminuyó los niveles de expresión de TTR de una forma dependiente de la dosis. Los oligonucleótidos que comprendían un conjugado GalNAc fueron más potentes que el original sin el conjugado GalNAc (ISIS 420915), y los oligonucleótidos que comprendían un resto escindible de fosfodiéster o desoxiadenosina mostraron mejoras significativas de la potencia en comparación con el original sin un conjugado (ver ISIS números 682883 y 666943 c. 420915 y ver los Ejemplos 86 y 87).

Tabla 95

Oligonucleótidos dirigidos a TTR humana

N.° ISIS	Secuencia 5′ a 3′	Uniones	Conglomerado de GalNAc	CM	SEQ ID NO.
420915	$T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}G_{es}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $A_{ds}\ A_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS	n/a	n/a	842
682883	**$GalNAc_3$-3_{a-}** $_{o'}T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	$GalNAc_3$-3a	PO	842
666943	**$GalNAc_3$-3_{a-}** $_{o'}$**A_{do}**$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}\ A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	$GalNAc_3$-3a	A_d	846
682887	**$GalNAc_3$-7_{a-}** $_{o'}$**A_{do}**$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc3-7a	Ad	846

682888	**$GalNAc_3$-10_{a-}** **$_{o'}A_{do}$**$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	$GalNAc_3$-10a	A_d	846
682889	**$GalNAc_3$-13_{a-}** **$_{o'}A_{do}$**$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	$GalNAc_3$-13a	A_d	846

La leyenda de la Tabla 95 puede encontrarse en el Ejemplo 74. La estructura de $GalNAc_3$-3_a se mostró en el Ejemplo 39. La estructura de $GalNAc_3$-7_a se mostró en el Ejemplo 48. La estructura de $GalNAc_3$-10_a se mostró en el Ejemplo 46. La estructura de $GalNAc_3$-13_a se mostró en el Ejemplo 62.

Tabla 96

Inhibición antisentido de TTR humana *in vivo*

N.° Isis	Dosificación (mg/kg)	ARNm de TTR (% de PBS)	Proteína en TTR (% de BL)	Conglomerado de GalNAc	CM
PBS	n/a	100	124	n/a	n/a
420915	6	69	114	n/a	n/a
	20	71	86		
	60	21	36		
682883	0,6	61	73	$GalNAc_3$-3a	PO
	2	23	36		
	6	18	23		
666943	0,6	74	93	$GalNAc_3$-3a	A_d
	2	33	57		
	6	17	22		

682887	0,6	60	97	$GalNAc_3$-7a	A_d
	2	36	49		
	6	12	19		
682888	0,6	65	92	$GalNAc_3$-10a	A_d
	2	32	46		
	6	17	22		
682889	0,6	72	74	$GalNAc_3$-13a	A_d
	2	38	45		
	6	16	18		

Ejemplo 91: Inhibición antisentido *in vivo* mediante oligonucleótidos dirigidos al FACTOR VII que comprenden un conjugado $GalNAc_3$ en primates no humanos

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 97 se evaluaron en un estudio de incremento de la dosis no terminal en búsqueda de la inhibición antisentido de Factor VII en monos.

Tratamiento

Se inyectó a los monos con tratamiento previo por vía subcutánea los días 0, 15 y 29 con dosis en aumento de un oligonucleótido enumerado en la Tabla 97 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 machos y 1 hembra. Previo a la primera dosis y en varios momentos después de esto, se

realizaron extracciones de sangre para determinar los niveles de proteína Factor VII en plasma. Los niveles de proteína Factor VII se midieron mediante ELISA. Los resultados presentados en la Tabla 98 son los valores promedio para cada grupo de tratamiento relacionados con el valor promedio para el grupo de PBS en el punto de referencia (BL); las medidas se tomaron en el momento previo a la primera dosis. Como se ilustra en la Tabla 98, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de expresión de Factor VII de una manera dependiente de la dosis y el oligonucleótido que comprende el conjugado GalNAc fue significativamente más potente en monos que el oligonucleótido original que carecía del conjugado GalNAc.

Tabla 97

Oligonucleótidos dirigidos a Factor VII

N.° Isis	Secuencia 5′ a 3′	Uniones	Conglomerado de GalNAc	CM	SEQ ID NO.
407935	$A_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{e}$	PS	n/a	n/a	848
686892	**$GalNAc_3$-$10_{a-o'}$** $A_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{e}$	PS	$GalNAc_3$-10a	PO	848

La leyenda de la Tabla 97 puede encontrarse en el Ejemplo 74.

La estructura de $GalNAc_3$-10_a se mostró en el Ejemplo 46.

Tabla 98

Niveles de proteína en plasma de Factor VII

N.° ISIS	Día	Dosis (mg/kg)	Factor VII (% de BL)
407935	0	n/a	100
	15	10	87
	22	n/a	92
	29	30	77
	36	n/a	46
	43	n/a	43
686892	0	3	100
	15	10	56
	22	n/a	29
	29	30	19
	36	n/a	15
	43	n/a	11

Ejemplo 92: Inhibición antisentido en hepatocitos primarios por oligonucleótidos antisentido dirigidos a Apo-CIII que comprenden un conjugado $GalNAc_3$

Se cultivaron hepatocitos primarios de ratón en placas de 96 pocillos a 15.000 células por pocillo y se agregaron los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 99, dirigidos a ApoC-III de ratón, a 0,46, 1,37, 4,12 o 12,35, 37,04, 111,11 o 333,33 nM, o 1,00 µM. Tras la incubación con los oligonucleótidos durante 24 horas, las células se lisaron y el ARN total se purificó utilizando RNeasy (Qiagen). Se determinaron los niveles de ARNm de ApoC-III mediante PCR de tiempo real y el reactivo de cuantificación de ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc.) de acuerdo con los protocolos estándar. Los valores de IC_{50} se determinaron usando el software Prism 4 (GraphPad). Los resultados muestran que, sin importar si el resto escindible era un fosfodiéster o una desoxiadenosina unida por fosfodiéster, los oligonucleótidos que comprendían un conjugado GalNAc eran significativamente más potentes que el oligonucleótido original sin un conjugado.

Tabla 99

Inhibición de la expresión de APOC-III de ratón en hepatocitos primarios de ratón

N.° ISIS	Secuencia (5' a 3')	CM	IC_{50} (nM)	SEQ ID NO.
440670	$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	n/a	13,20	849
661180	$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{eo}$ **$A_{do'}$-$GalNAc_3$-1_a**	A_d	1,40	850
680771	**$GalNAc_3$-3_{a-}** $_{o'}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G$ $_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	0,70	849
680772	**$GalNAc_3$-7_{a-}** $_{o'}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G$ $_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	1,70	849
680773	**$GalNAc_3$-10_{a-}** $_{o'}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G$ $_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	2,00	849
680774	**$GalNAc_3$-13_{a-}** $_{o'}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G$ $_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	1,50	849
681272	**$GalNAc_3$-3_{a-}** $_{o'}{}^{m}C_{es}A_{eo}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G$ $_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{eo}$ $A_{eo}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	< 0,46	849

681273	**GalNAc$_3$-3$_a$-** $_{o'}$**A$_{do}$**^{m}C$_{es}$A$_{es}$G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{ds}$T$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$T$_{ds}$A $_{ds}$G$_{ds}$G$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$ ^{m}C$_{es}$A$_{es}$G$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{e}$	A$_d$	1,10	851
683733	^{m}C$_{es}$A$_{es}$G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{ds}$T$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$T$_{ds}$A$_{ds}$G$_{ds}$ G$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{es}$ A$_{es}$G$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{eo}$**A$_{do'}$-GalNAc$_3$-19$_a$**	A$_d$	2,50	850

Se mostró previamente la estructura de GalNAc$_3$-1$_a$ en el Ejemplo 9, GalNAc$_3$-3$_a$ se mostró en el Ejemplo 39, GalNAc$_3$-7$_a$ se mostró en el Ejemplo 48, GalNAc$_3$-10$_a$ se mostró en el Ejemplo 46, GalNAc$_3$-13$_a$ se mostró en el Ejemplo 62 y GalNAc$_3$-19$_a$ se mostró en el Ejemplo 70.

Ejemplo 93: Inhibición antisentido *in vivo* por oligonucleótidos dirigidos a SRB-1 que comprenden alas mixtas y un conjugado 5'-GalNAc$_3$

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 100 se evaluaron en un estudio dependiente de la dosis en búsqueda de la inhibición antisentido de SRB-1 en ratones.

Tabla 100

ASO modificados dirigidos a SRB-1

N.° ISIS	Secuencias (5′ a 3′)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO.
449093	$T_{ks}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}$ G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{k}$	n/a	n/a	852
699806	**$GalNAc_3$-3_a-$_o$,** $T_{ks}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_3$-3a	PO	852
699807	**$GalNAc_3$-7_a-$_o$,** $T_{ks}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_3$-7a	PO	852
699809	**$GalNAc_3$-7_a-$_o$,** $T_{ks}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}$ G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-7a	PO	852
699811	**$GalNAc_3$-7_a-$_o$,** $T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_3$-7a	PO	852
699813	**$GalNAc_3$-7_a-$_o$,** $T_{ks}T_{ds}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_3$-7a	PO	852
699815	**$GalNAc_3$-7_a-$_o$,** $T_{es}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-7a	PO	852

La estructura de $GalNAc_3$-3_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 39, y la estructura de $GalNAc_3$-7a se mostró anteriormente en el Ejemplo 48. Subíndices: "e" indica un nucleósido modificado en 2′-MOE; "d" indica β-D-2′-desoxirribonucleósido; "k" indica el nucleósido bicíclico 6′-*(S)*-CH_3 (cEt); "s" indica uniones internucleósido fosforotioato (PS); "o" indica uniones internucleósido

fosfodiéster (PO). El superíndice "m" indica 5-metilcitosinas.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones C57BL/6 de seis a ocho semanas (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una vez con la dosificación que se muestra más adelante con un oligonucleótido enumerado en la Tabla 100 o con solución salina. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 animales. Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la última administración. Los niveles de ARNm de SRB-1 en hígado se midieron con PCR de tiempo real. Los niveles de ARNm de SRB-1 se normalizaron a los niveles de ARNm de ciclofilina de acuerdo con protocolos estándar. Los resultados se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de SRB-1 para cada grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control salino. Tal como se ilustra en la Tabla 101, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido disminuyó los niveles de ARNm de SRB-1 de una forma dependiente de la dosis, y los oligonucleótidos gapmer que comprendían un conjugado GalNAc y con alas que fueran modificaciones mixtas de azúcar o completamente cEt fueron significativamente más potentes que el oligonucleótido original sin un conjugado y

con alas modificadas completamente cEt.

También se midieron los pesos corporales, transaminasas en el hígado, bilirrubina total y BUN, y los valores promedio para cada grupo de tratamiento se muestran en la Tabla 101. El peso corporal se muestra como el porcentaje promedio de peso corporal en comparación con el peso corporal de referencia (% BL) medido previo a la dosis de oligonucleótidos.

Tabla 101

Niveles de ARNm de SRB-1, ALT, AST, BUN, bilirrubina total y pesos corporales

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ARNm de SRB-1 (% de PBS)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bil	BUN	Peso corporal (% del valor de referencia)
PBS	n/a	100	31	84	0,15	28	102
449093	1	111	18	48	0,17	31	104
	3	94	20	43	0,15	26	103
	10	36	19	50	0,12	29	104
699806	0,1	114	23	58	0,13	26	107
	0,3	59	21	45	0,12	27	108
	1	25	30	61	0,12	30	104
699807	0,1	121	19	41	0,14	25	100
	0,3	73	23	56	0,13	26	105
	1	24	22	69	0,14	25	102

699809	0,1	125	23	57	0,14	26	104
	0,3	70	20	49	0,10	25	105
	1	33	34	62	0,17	25	107
699811	0,1	123	48	77	0,14	24	106
	0,3	94	20	45	0,13	25	101
	1	66	57	104	0,14	24	107
699813	0,1	95	20	58	0,13	28	104
	0,3	98	22	61	0,17	28	105
	1	49	19	47	0,11	27	106
699815	0,1	93	30	79	0,17	25	105
	0,3	64	30	61	0,12	26	105
	1	24	18	41	0,14	25	106

Ejemplo 94: Inhibición antisentido *in vivo* por oligonucleótidos dirigidos a SRB-1 que comprenden modificaciones de azúcar en 2' y un conjugado 5'-GalNAc$_3$

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 102 se evaluaron en un estudio dependiente de la dosis en búsqueda de la inhibición antisentido de SRB-1 en ratones.

Tabla 102

ASO modificados dirigidos a SRB-1

N.° ISIS	Secuencias (5′ a 3′)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO.
353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	n/a	n/a	829
700989	$G_{ms}C_{ms}U_{ms}U_{ms}C_{ms}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}U_{ms}C_{ms}C_{ms}U_{ms}U_{m}$	n/a	n/a	853
666904	**$GalNAc_3$-3_a-**$_o$′$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-3a	PO	829
700991	**$GalNAc_3$-7_a-**$_o$′$G_{ms}C_{ms}U_{ms}U_{ms}C_{ms}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}U_{ms}C_{ms}C_{ms}U_{ms}U_{m}$	$GalNAc_3$-7a	PO	853

El subíndice "m" indica un nucleósido modificado en 2′-O-metilo. Ver el Ejemplo 74 por una leyenda de tabla completa. La estructura de $GalNAc_3$-3_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 39, y la estructura de $GalNAc_3$-7a se mostró anteriormente en el Ejemplo 48.

Tratamiento

El estudio se completó utilizando el protocolo descrito en el Ejemplo 93. Los resultados se muestran en la Tabla 103 a continuación y muestran que los oligonucleótidos modificados

en 2'-MOE y 2'-OMe que comprenden un conjugado GalNAc fueron significativamente más potentes que los oligonucleótidos originales respectivos sin un conjugado. Los resultados de las medidas de pesos corporales, transaminasas en hígado, bilirrubina total y BUN indicaron que todos los compuestos se toleraron positivamente.

Tabla 103

ARNm de SRB-1

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ARNm de SRB-1 (% de PBS)
PBS	n/a	100
353382	5	116
	15	58
	45	27
700989	5	120
	15	92
	45	46
666904	1	98
	3	45
	10	17
700991	1	118
	3	63
	10	14

Ejemplo 95: Inhibición antisentido *in vivo* por oligonucleótidos dirigidos a SRB-1 que comprenden nucleósidos bicíclicos y un conjugado 5'-$GalNAc_3$

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 104 se evaluaron en un estudio dependiente de la dosis en búsqueda de la inhibición antisentido de SRB-1 en ratones.

Tabla 104

ASO modificados dirigidos a SRB-1

N.° ISIS	Secuencias (5′ a 3′)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO
440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	n/a	n/a	823
666905	**$GalNAc_3$-3_a-$_{o'}$**$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_3$-3_a	PO	823
699782	**$GalNAc_3$-7_a-$_{o'}$**$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_3$-7_a	PO	823
699783	**$GalNAc_3$-3_a-$_{o'}$**$T_{ls}{}^{m}C_{ls}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ls}{}^{m}C_{l}$	$GalNAc_3$-3_a	PO	823
653621	$T_{ls}{}^{m}C_{ls}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ls}{}^{m}C_{l}$**$_{o}A_{do'}$-$GalNAc_3$-$1_a$**	$GalNAc_3$-1_a	A_d	824
439879	$T_{gs}{}^{m}C_{gs}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{d}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{gs}{}^{m}C_{g}$	n/a	n/a	823
699789	**$GalNAc_3$-3_a-$_{o'}$**$T_{gs}{}^{m}C_{gs}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{d}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{gs}{}^{m}C_{g}$	$GalNAc_3$-3_a	PO	823

El subíndice "g" indica un nucleósido fluoro-HNA; el subíndice "l" indica un nucleósido bloqueado que comprende un puente 2'-O-CH_2-4'. Ver la leyenda de la Tabla 74 por otras abreviaturas. La estructura de $GalNAc_3$-1_a se mostró previamente en el Ejemplo 9, la estructura de $GalNAc_3$-3_a se mostró previamente en el Ejemplo 39 y la estructura de $GalNAc_3$-7a se mostró previamente en el Ejemplo 48.

Tratamiento

El estudio se completó utilizando el protocolo descrito en el Ejemplo 93. Los resultados se muestran en la Tabla 105 a continuación y muestran que los oligonucleótidos que comprenden un conjugado GalNAc y varias modificaciones de nucleósidos bicíclicos fueron más potentes que el oligonucleótido original sin un conjugado y que comprende modificaciones de nucleósidos bicíclicos. Además, el oligonucleótido que comprende un conjugado GalNAc y modificaciones fluoro-HNA fue significativamente más potente que el original sin un conjugado y con modificaciones fluoro-HNA. Los resultados de las medidas de pesos corporales, transaminasas en hígado, bilirrubina total y BUN indicaron que todos los compuestos se toleraron positivamente.

Tabla 105

Niveles de ARNm de SRB-1, ALT, AST, BUN, bilirrubina total y pesos corporales

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	ARNm de SRB-1 (% de PBS)
PBS	n/a	100
440762	1	104
	3	65
	10	35
666905	0,1	105
	0,3	56
	1	18
699782	0,1	93
	0,3	63
	1	15
699783	0,1	105
	0,3	53
	1	12
653621	0,1	109
	0,3	82
	1	27
439879	1	96
	3	77
	10	37

699789	0,1	82
	0,3	69
	1	26

Ejemplo 96: Unión de proteínas en plasma de oligonucleótidos antisentido que comprenden un grupo conjugado $GalNAc_3$

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 70 dirigidos a ApoC-III y los oligonucleótidos en la Tabla 106 dirigidos a Apo(a) se evaluaron en un ensayo de ultrafiltración para evaluar la unión de proteínas en plasma.

Tabla 106

Oligonucleótidos modificados dirigidos a Apo(a)

N.° ISIS	Secuencias (5' a 3')	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO
494372	$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}\ T_{es}{}^{m}C_{e}$	n/a	n/a	847
693401	$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}\ T_{es}{}^{m}C_{e}$	n/a	n/a	847
681251	**$GalNAc_3$-7_a-** $_{o'}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{d}$	$GalNAc_3$-7_a	PO	847

681257	**$GalNAc_3$-7_a-** o,$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{d}$ s $T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-7_a	PO	847

Ver el Ejemplo 74 para la leyenda de la tabla. La estructura de $GalNAc_3$-7a se mostró anteriormente en el Ejemplo 48.

Las unidades de ultrafiltración Ultrafree-MC (30.000 NMWL, membrana de celulosa regenerada de baja unión, Millipore, Bedford, MA) se precondicionaron con 300 µL de Tween 80 al 0,5 % y se centrifugaron a 2000 g durante 10 minutos, luego con 300µL de una solución de 300 µg/mL de un oligonucleótido de control en H_2O y se centrifugaron a 2000 g durante 16 minutos. Para evaluar la unión no específica a los filtros de cada oligonucleótido de prueba de las Tablas 70 y 106 a ser utilizado en los estudios, se colocaron 300 µL de una solución de 250 ng/mL de oligonucleótido en H_2O a pH 7,4 en los filtros precondicionados y se centrifugaron a 2000 g durante 16 minutos. Las muestras filtradas y sin filtrar se analizaron mediante un ensayo ELISA para determinar las concentraciones de oligonucleótido. Se utilizaron tres replicados para obtener una concentración promedio para cada muestra. La concentración promedio de la muestra filtrada en comparación con la muestra no filtrada se utiliza para

determinar el porcentaje de oligonucleótido que se recupera a través del filtro en ausencia de plasma (% de recuperación).

Las muestras congeladas de plasma completo recolectadas en K3-EDTA a partir de voluntarios humanos normales y sin fármacos, monos cynomolgus y ratones CD-1 se adquirieron en Bioreclamation LLC (Westbury, NY). Se agregaron los oligonucleótidos de prueba a alícuotas de 1,2 mL de plasma en dos concentraciones (5 y 150 µg/mL). Una alícuota (300 µL) de cada muestra de plasma adicionada se colocó en una unidad de filtro precondicionada y se incubó a 37°C durante 30 minutos, seguido inmediatamente por centrifugación a 2000 g durante 16 minutos. Las alícuotas de muestras de plasma adicionadas filtradas y no filtradas se analizaron mediante un ELISA para determinar la concentración de oligonucleótidos en cada muestra. Se utilizaron tres replicados por concentración para determinar el porcentaje promedio de oligonucleótidos que forman enlace y que no forman enlace en cada muestra. La concentración promedio de la muestra filtrada en relación con la concentración de la muestra sin filtrar se utiliza para determinar el porcentaje de oligonucleótidos en el plasma que no forma enlaces con proteínas de plasma (% que no forma enlaces). Los valores finales de oligonucleótidos que no forman enlaces se corrigen para la unión no específica

dividiendo el % que no forma enlaces entre el % de recuperación para cada oligonucleótido. Los valores finales de % que forma enlaces de oligonucleótidos se determinan restando a 100 los valores finales de % que no forma enlaces. Los resultados se muestran en la Tabla 107 para ambas concentraciones de oligonucleótidos evaluadas (5 y 150 µg/mL) en cada especie de plasma. Los resultados muestran que los grupos conjugados GalNAc no tienen un impacto significativo en la unión de proteínas en plasma. Además, los oligonucleótidos con uniones internucleósido PS completas y uniones mixtas PO/PS unen proteínas en plasma, y aquellos con uniones PS completas unen a las proteínas en plasma en un grado relativamente mayor que aquellos con uniones mixtas PO/PS.

Tabla 107

Porcentaje de oligonucleótido modificado que forma enlaces con proteínas en plasma

N.º ISIS	Plasma humano		Plasma de mono		Plasma de ratón	
	5 µg/mL	150 µg/mL	5 µg/mL	150 µg/mL	5 µg/mL	150 µg/mL
304801	99,2	98,0	99,8	99,5	98,1	97,2
663083	97,8	90,9	99,3	99,3	96,5	93,0
674450	96,2	97,0	98,6	94,4	94,6	89,3
494372	94,1	89,3	98,9	97,5	97,2	93,6
693401	93,6	89,9	96,7	92,0	94,6	90,2
681251	95,4	93,9	99,1	98,2	97,8	96,1
681257	93,4	90,5	97,6	93,7	95,6	92,7

Ejemplo 97: Oligonucleótidos modificados dirigidos a TTR que comprenden un grupo conjugado $GalNAc_3$

Los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 108 que comprenden un conjugado GalNAc se diseñaron para dirigirse a TTR.

Tabla 108

Oligonucleótidos modificados dirigidos a TTR

N.° ISIS	Secuencias (5′ a 3′)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO
666941	**$GalNAc_3$-$3_{a\text{-}o'}$$A_{do}$** T_{es} $^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-3	A_d	846
666942	T_{es} $^{m}C_{eo}$ T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo} $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{eo}$ **$A_{do'}$-$GalNAc_3$-3_a**	$GalNAc_3$-1	A_d	843
682876	**$GalNAc_3$-$3_{a\text{-}o'}$**T_{es} $^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-3	PO	842
682877	**$GalNAc_3$-$7_{a\text{-}o'}$**T_{es} $^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-7	PO	842
682878	**$GalNAc_3$-$10_{a\text{-}o'}$**T_{es} $^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-10	PO	842
682879	**$GalNAc_3$-$13_{a\text{-}o'}$**T_{es} $^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-13	PO	842
682880	**$GalNAc_3$-$7_{a\text{-}o'}$$A_{do}$** T_{es} $^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-7	A_d	846
682881	**$GalNAc_3$-$10_{a\text{-}o'}$$A_{do}$** T_{es} $^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{es}$ $^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-10	A_d	846

682882	**$GalNAc_3$-$13_{a-o'}$$A_{do}$** T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ ^mC_e	$GalNAc_3$-13	A_d	846
684056	T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ $^mC_{eo}$ **$A_{do'}$-$GalNAc_3$-19_a**	$GalNAc_3$-19	A_d	846

La leyenda de la Tabla 108 puede encontrarse en el Ejemplo 74. La estructura de GalNAc3-1 se mostró en el Ejemplo 9. La estructura de $GalNAc_3$-3_a se mostró en el Ejemplo 39. La estructura de $GalNAc_3$-7_a se mostró en el Ejemplo 48. La estructura de $GalNAc_3$-10_a se mostró en el Ejemplo 46. La estructura de $GalNAc_3$-13_a se mostró en el Ejemplo 62. La estructura de $GalNAc_3$-19_a se mostró en el Ejemplo 70.

Ejemplo 98: Evaluación de los efectos proinflamatorios de los oligonucleótidos que comprenden un conjugado GalNAc en el ensayo hPMBC

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 109 se evaluaron en búsqueda de efectos proinflamatorios en un ensayo hPMBC según se describió en los Ejemplos 23 y 24 (ver Tablas 30, 83, 95 y 108 por descripciones de los oligonucleótidos). ISIS 353512 es de respuesta alta y se utiliza como control positivo, y los otros oligonucleótidos se describen en las

Tablas 83, 95 y 108. Los resultados que se muestran en la Tabla 109 se obtuvieron al utilizar sangre de un donante voluntario. Los resultados muestran que los oligonucleótidos que comprenden uniones internucleósido PO/PS mixtas produjeron respuestas proinflamatorias significativamente inferiores en comparación con los mismo oligonucleótidos con uniones PS completas. Además, el grupo conjugado GalNAc no tuvo un efecto significativo en este ensayo.

Tabla 109

N.° ISIS	E_{max}/EC_{50}	Conglomerado de $GalNAc_3$	Uniones	CM
353512	3630	n/a	PS	n/a
420915	802	n/a	PS	n/a
682881	1311	$GalNAc_3$-10	PS	A_d
682888	0,26	$GalNAc_3$-10	PO/PS	A_d
684057	1,03	$GalNAc_3$-19	PO/PS	A_d

Ejemplo 99: Afinidades de unión de oligonucleótidos que comprenden un conjugado GalNAc para el receptor de asialoglicoproteína

Las afinidades de unión de los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 110 (ver tabla 76 por descripciones de los

oligonucleótidos) para el receptor de asialoglicoproteína se evaluaron en un ensayo competitivo de unión al receptor. El ligando competidor, la α1-glicoproteína ácida (AGP), se incubó en amortiguador de acetato de sodio 50 mM (pH 5) con 1 U de neuraminidasa-agarosa durante 16 horas a 37 °C y > 90 % de desialilación se confirmó mediante ensayo de ácido siálico o cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se utilizó monocloruro de yodo para yodar la AGP de acuerdo con el procedimiento de Atsma et ál. (ver J Lipid Res. enero de 1991; 32(1):173-81). En este método, la α1-glicoproteína ácida (de-AGP) desialilada se agregó a cloruro de yodo 10 mM, $Na^{125}I$ y glicina 1 M en NaOH 0,25 M. Luego de incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente, la de-AGP marcada con ^{125}I se separó de ^{125}I libre mediante la concentración de la mezcla dos veces con una columna de centrifugado 3 KDMWCO. La proteína se evaluó en búsqueda de pureza y eficacia de marcado en un sistema de HPLC equipado con una columna Agilent SEC-3 (7,8 x 300 mm) y un contador ß-RAM. Los experimentos de competencia con de-AGP marcada con ^{125}I y varios ASO que contenían conglomerados de GalNAc se realizaron de la siguiente manera. Las células humanas HepG2 (10^6 células/ml) se colocaron en placas de 6 pocillos en 2 ml de medio de cultivo adecuado. Se utilizó el medio MEM complementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, L-

glutamina 2 mM y HEPES 10 mM. Las células se incubaron durante 16-20 horas a 37 °C con CO_2 al 5 % y al 10 %, respectivamente. Las células se lavaron con medio sin FBS previo al experimento. Las células se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con 1 ml de mezcla de competencia que contenía medio de cultivo adecuado con FBS al 2 %, de-AGP 10^{-8} M marcada con ^{125}I y ASO que contenían conglomerados de GalNAc en concentraciones en el intervalo de 10^{-11} a 10^{-5} M. La unión no específica se determinó en presencia de azúcar de GalNAc 10^{-2} M. Las células se lavaron dos veces con medio sin FBS para quitar la de-AGP marcada con ^{125}I que no formaba enlaces y el competidor ASO de GalNAc. Las células se lisaron con el amortiguador RLT de Qiagen que contiene ß-mercaptoetanol al 1 %. Los lisados se transfirieron a tubos de ensayo de fondo redondo tras un ciclo breve de congelado/descongelado de 10 minutos y se analizaron en un contador ɣ. Se quitó la unión no específica antes de dividir los conteos de proteína ^{125}I entre el valor de los conteos de concentración GalNAc-ASO más bajos. Las curvas de inhibición se ajustaron de acuerdo con una ecuación de unión de competencia de sitio único con un algoritmo de regresión no lineal para calcular las afinidades de unión (K_D).

Los resultados de la Tabla 110 se obtuvieron a partir de

experimentos realizados en cinco días distintos. Los resultados para los oligonucleótidos marcados con el superíndice "a" son el promedio de los experimentos realizados en dos días diferentes. Los resultados muestran que los oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado GalNAc en el extremo 5' formaron enlaces con el receptor de asialoglicoproteína en células humanas HepG2 con una afinidad 1,5 a 16 veces mayor que los oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado GalNAc en el extremo 3'.

Tabla 110

Resultados del ensayo de unión al receptor de asialoglicoproteína

N.° ISIS	Conjugado GalNAc	Extremo del oligonucleótido al que se une el conjugado GalNAc	K_D (nM)
661161[a]	$GalNAc_3$-3	5′	3,7
666881[a]	$GalNAc_3$-10	5′	7,6
666981	$GalNAc_3$-7	5′	6,0
670061	$GalNAc_3$-13	5′	7,4
655861[a]	$GalNAc_3$-1	3′	11,6
677841[a]	$GalNAc_3$-19	3′	60,8

Ejemplo 100: Inhibición antisentido *in vivo* por

oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado GalNAc dirigido a Apo(a) *in vivo*

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 111a a continuación se evaluaron en un estudio de una sola dosis para verificar la duración de acción en ratones.

Tabla 111a

ASO modificados dirigidos a APO(a)

N.° ISIS	Secuencias (5' a 3')	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO.
681251	**$GalNAc_3$-7_a-** o'$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}G_{es}$ $T_{es}T_{es}{}^{m}C_e$	$GalNAc_3$-7a	PO	847
681257	**$GalNAc_3$-7_a-** o'$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}$ $T_{es}T_{es}{}^{m}C_e$	$GalNAc_3$-7a	PO	847

La estructura de $GalNAc_3$-7_a se mostró en el Ejemplo 48.

Tratamiento

Se inyectó de manera subcutánea a ratones transgénicos hembra que expresaban Apo(a) humana, una vez a la semana, durante tres semanas, por un total de 6 dosis, con un oligonucleótido

y la dosificación enumerada en la Tabla 111b o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistía en 3 animales. Se extrajo sangre el día antes de la dosificación para determinar niveles de referencia de la proteína Apo(a) en plasma y a las 72 horas, 1 semana y 2 semanas luego de la primera dosis. Ocurrirán extracciones de sangre posteriores a las 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas y 6 semanas luego de la primera dosis. Los niveles de la proteína Apo(a) en plasma se midieron con un ELISA. Los resultados de la Tabla 111b se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de proteína Apo(a) en plasma para cada grupo de tratamiento, normalizados a los niveles de referencia (% de BL). Los resultados muestran que los oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado GalNAc presentaron una reducción potente de la expresión de Apo(a). Este efecto potente se observó para el oligonucleótido que comprende uniones internucleósido PS completas y el oligonucleótido que comprende uniones PO y PS mixtas.

Tabla 111b

Niveles de proteína Apo(a) en plasma

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	Apo(a) a 72 horas (% de BL)	Apo(a) a 1 semana (% de BL)	Apo(a) a 3 semanas (% de BL)
PBS	n/a	116	104	107
681251	0,3	97	108	93
	1,0	85	77	57
	3,0	54	49	11
	10,0	23	15	4
681257	0,3	114	138	104
	1,0	91	98	54
	3,0	69	40	6
	10,0	30	21	4

Ejemplo 101: Inhibición antisentido por oligonucleótidos que comprenden un conglomerado de GalNAc unido mediante un resto estable

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 112 se evaluaron en búsqueda de inhibición de la expresión de APOC-III en ratones *in vivo*. Se inyectaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea una vez con un oligonucleótido enumerado en la Tabla 112 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistía en 4 animales. Cada ratón tratado con ISIS 440670 recibió una dosis de 2, 6, 20 o 60 mg/kg. Cada ratón tratado con ISIS 680772 o 696847 recibió una dosis de 0,6, 2, 6 o 20 mg/kg. El

grupo conjugado GalNAc de ISIS 696847 está unido mediante un resto estable, una unión fosforotioato en vez de una unión que contiene un fosfodiéster fácilmente escindible. Los animales se sacrificaron 72 horas después de la dosis. Los niveles de ARNm de APOC-III en hígado se midieron con PCR de tiempo real. Los niveles de ARNm de APOC-III se normalizaron a los niveles de ARNm de ciclofilina de acuerdo con protocolos estándar. Los resultados se presentan en la Tabla 112 como el porcentaje promedio de los niveles de ARNm de APOC-III para cada grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control salino. Los resultados muestran que los oligonucleótidos que comprenden un conjugado GalNAc fueron significativamente más potentes que el oligonucleótido que carecía un grupo conjugado. Además, el oligonucleótido que comprendía un grupo conjugado GalNAc unido al oligonucleótido mediante un resto escindible (ISIS 680772) era incluso más potente que el oligonucleótido que comprendía un grupo conjugado GalNAc unido al oligonucleótido mediante un resto estable (ISIS 696847).

Tabla 112

Oligonucleótidos modificados dirigidos a APOC-III de ratón

N.° ISIS	Secuencias (5' a 3')	CM	Dosificación (mg/kg)	ARNm de APOC-III (% de PBS)	SEQ ID NO.
440670	$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}$ $^{m}C_{es}A_{e}$	n/a	2	92	849
			6	86	
			20	59	
			60	37	
680772	**$GalNAc_3$-7_{a-o}**, $^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	0,6	79	849
			2	58	
			6	31	
			20	13	
696847	**$GalNAc_3$-7_{a-s}**, $^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	n/a (PS)	0,6	83	849
			2	73	
			6	40	
			20	28	

La estructura de $GalNAc_3$-7_a se mostró en el Ejemplo 48.

Ejemplo 102: Distribución en hígado de oligonucleótidos antisentido que comprenden un conjugado GalNAc

Se evaluó la distribución en hígado de ISIS 353382 (ver Tabla 36), que no comprende un conjugado GalNAc, e ISIS 655861 (ver Tabla 36), que sí comprende un conjugado GalNAc. Se inyectó por vía subcutánea a ratones macho balb/c una vez con ISIS 353382 o 655861 a una dosificación enumerada en la Tabla 113.

Cada grupo de tratamiento consistió en 3 animales, salvo por el grupo de 18 mg/kg para ISIS 655861, que consistía en 2 animales. Los animales se sacrificaron 48 horas después de la dosis para determinar la distribución en hígado de los oligonucleótidos. Con la finalidad de medir la cantidad de moléculas de oligonucleótidos antisentido por célula, una etiqueta de tris-bipiridina de Rutenio (II) (MSD TAG, Meso Scale Discovery) se conjugó a una sonda de oligonucleótidos utilizada para detectar los oligonucleótidos antisentido. Los resultados presentados en la Tabla 113 son las concentraciones promedio de oligonucleótidos para cada grupo de tratamiento en unidades de millones de moléculas de oligonucleótido por célula. Los resultados muestran que a dosis equivalentes, el oligonucleótido que comprende un conjugado GalNAc estaba presente a concentraciones mayores en el hígado total y en hepatocitos que el oligonucleótido que no comprende un conjugado GalNAc. Además, el oligonucleótido que comprende un conjugado GalNAc estaba presente a concentraciones menores en células hepáticas no parenquimales que el oligonucleótido que no comprende un conjugado GalNAc. Mientras que las concentraciones de ISIS 655861 en hepatocitos y células hepáticas no parenquimales eran similares por célula, el hígado tiene aproximadamente un 80 % de hepatocitos en volumen. Por lo tanto, la mayoría del

oligonucleótido ISIS 655861 que se encontraba presente en el hígado se encontraba en hepatocitos, mientras que la mayoría del oligonucleótido ISIS 353382 que se encontraba presente en el hígado se encontraba en células hepáticas no parenquimales.

Tabla 113

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	Concentración en hígado completo (moléculas*10^6 por célula)	Concentración en hepatocitos (moléculas*10^6 por célula)	Concentración en células hepáticas no parenquimales (moléculas*10^6 por célula)
353382	3	9,7	1,2	37,2
	10	17,3	4,5	34,0
	20	23,6	6,6	65,6
	30	29,1	11,7	80,0
	60	73,4	14,8	98,0
	90	89,6	18,5	119,9
655861	0,5	2,6	2,9	3,2
	1	6,2	7,0	8,8
	3	19,1	25,1	28,5
	6	44,1	48,7	55,0
	18	76,6	82,3	77,1

Ejemplo 103: Duración de la acción *in vivo* de

oligonucleótidos dirigidos a APOC-III que comprenden un conjugado $GalNAc_3$

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 114 a continuación se evaluaron en un estudio de una sola dosis para verificar la duración de acción en ratones.

Tabla 114

ASO modificado dirigido a APOC-III

N.° ISIS	Secuencias (5' a 3')	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO.
304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}\ T_{es}A_{es}T_{e}$	n/a	n/a	821
663084	**$GalNAc_3$-3_a-$_{o'}A_{do}$**$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}\ T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-3a	A_d	837
679241	$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}\ T_{es}A_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-$GalNAc_3$-$19_a$**	$GalNAc_3$-19a	A_d	822

La estructura de $GalNAc_3$-3_a se mostró en el Ejemplo 39, y $GalNAc_3$-19_a se mostró en el Ejemplo 70.

Tratamiento

Los ratones transgénicos hembra que expresaban APOC-III humana se inyectaron por vía subcutánea una vez con un

oligonucleótido enumerado en la Tabla 114 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistía en 3 animales. Se extrajo sangre previo a la dosificación para determinar el valor de referencia y en los días 3, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 después de la dosis. Los niveles de proteína APOC-III y triglicéridos en plasma se midieron como se describió en el Ejemplo 20. Los resultados de la Tabla 115 se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de APOC-III y triglicéridos en plasma para cada grupo de tratamiento, normalizados a los niveles de referencia. Una comparación de los resultados de la Tabla 71 del Ejemplo 79 con los resultados de la Tabla 115 a continuación muestra que los oligonucleótidos que comprenden una mezcla de uniones internucleósido fosfodiéster y fosforotioato presentaron un aumento de la duración de acción que los oligonucleótidos equivalentes que comprendían únicamente uniones internucleósido fosforotioato.

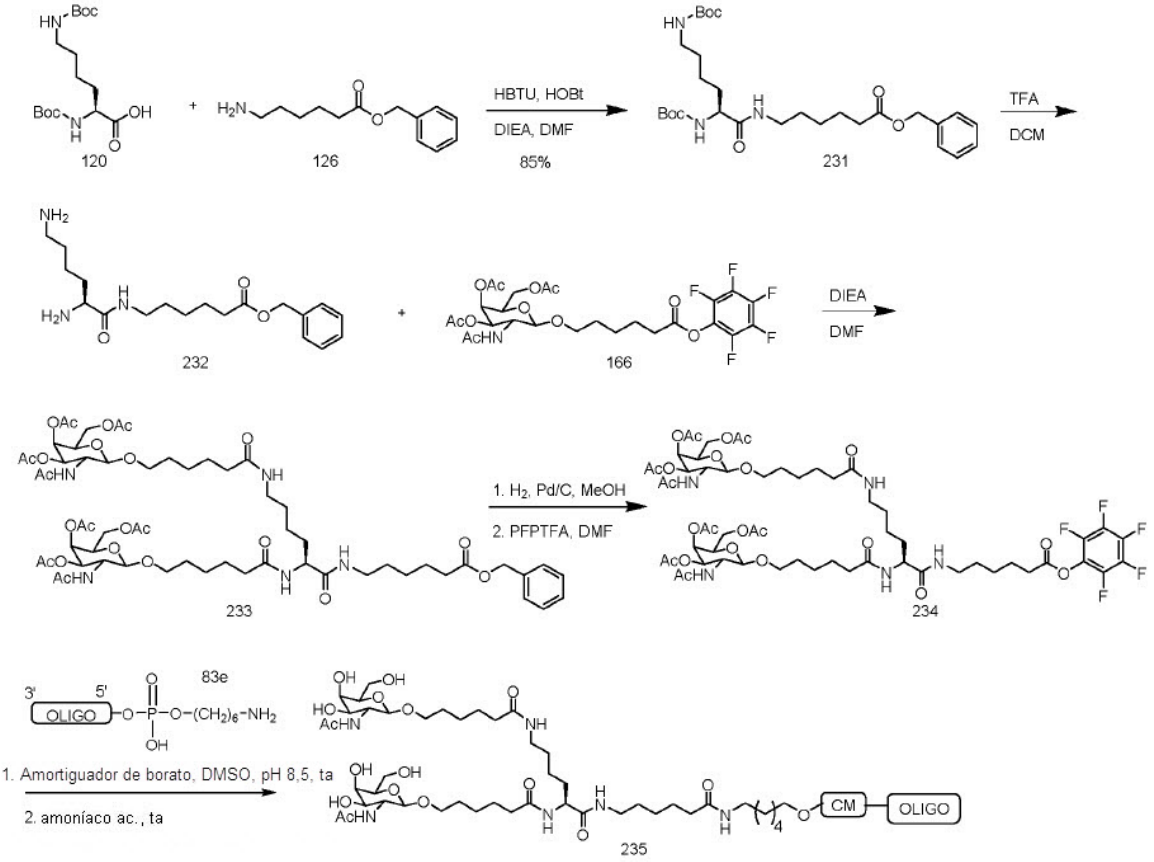
Tabla 115

Niveles de proteína APOC-III y triglicéridos en plasma en ratones transgénicos

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	Punto temporal (días después de la dosis)	Triglicéridos (% del valor de referencia)	Proteína APOC-III (% del valor de referencia)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM

PBS	n/a	3	96	101	n/a	n/a
		7	88	98		
		14	91	103		
		21	69	92		
		28	83	81		
		35	65	86		
		42	72	88		
304801	30	3	42	46	n/a	n/a
		7	42	51		
		14	59	69		
		21	67	81		
		28	79	76		
		35	72	95		
		42	82	92		
663084	10	3	35	28	$GalNAc_3$-3a	A_d
		7	23	24		
		14	23	26		
		21	23	29		
		28	30	22		
		35	32	36		
		42	37	47		
679241	10	3	38	30	$GalNAc_3$-19a	A_d
		7	31	28		
		14	30	22		
		21	36	34		
		28	48	34		
		35	50	45		
		42	72	64		

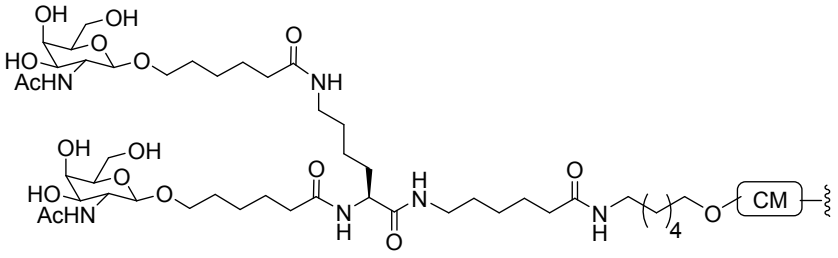
Ejemplo 104: Síntesis de oligonucleótidos que comprenden un conjugado 5′-GalNAc$_2$



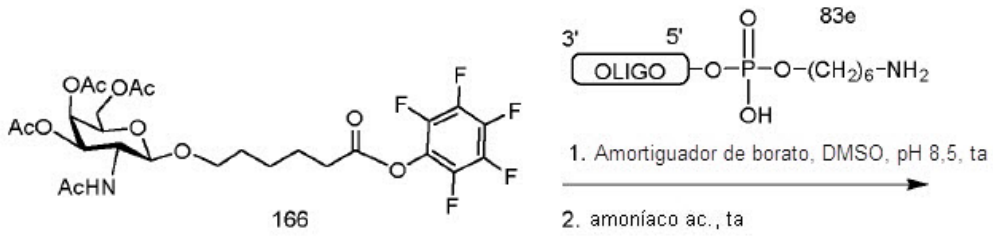
El Compuesto 120 está disponible en el mercado, y la síntesis del Compuesto 126 se describe en el Ejemplo 49. El Compuesto 120 (1 g, 2,89 mmol), HBTU (0,39 g, 2,89 mmol) y HOBt (1,64 g, 4,33 mmol) se disolvieron en DMF (10 mL y se agregó *N*,*N*-diisopropiletilamina (1,75 mL, 10,1 mmol). Luego de alrededor de 5 minutos, se agregó a la reacción éster bencílico de ácido aminohexanoico (1,36 g, 3,46 mmol). Luego de 3 horas, la mezcla de reacción se vertió en 100 mL de NaHSO4 1 M y se extrajo con 2 x 50 mL de acetato de etilo. Las capas

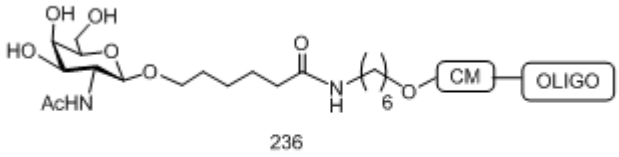
orgánicas se combinaron y lavaron con 3 x 40 mL de $NaHCO_3$ saturado y 2 x salmuera, se secaron con Na_2SO_4, se filtraron y concentraron. El producto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM:EA:Hex, 1:1:1) para proporcionar el Compuesto 231. LCMS y NMR fueron congruentes con la estructura. El compuesto 231 (1,34 g, 2,438 mmol) se disolvió en diclorometano (10 mL) y se agregó ácido trifluoroacético (10 mL). Luego de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, la mezcla de reacción se concentró en presión reducida y se coevaporó con tolueno (3 x 10 mL). El residuo se secó en presión reducida para proporcionar el compuesto 232 como la sal de trifluoroacetato. La síntesis del compuesto 166 se describe en el Ejemplo 54. El Compuesto 166 (3,39 g, 5,40 mmol) se disolvió en DMF (3 mL). Una solución del compuesto 232 (1,3 g, 2,25 mmol) se disolvió en DMF (3 mL) y se agregó *N*,*N*-diisopropiletilamina (1,55 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego se vertió en agua (80 mL) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 100 mL). La fase orgánica se separó y se lavó con $NaHCO_3$ saturado acuoso (3 x 80 mL), $NaHSO_4$ 1 M (3 x 80 mL) y salmuera (2 x 80 mL), luego se secó (Na_2SO_4), se filtró y concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para proporcionar el compuesto 233. LCMS y NMR fueron congruentes con la estructura. El Compuesto

233 (0,59 g, 0,48 mmol) se disolvió en metanol (2,2 mL) y acetato de etilo (2,2 mL). Se agregó paladio en carbono (10 % en peso Pd/C, húmedo, 0,07 g) y la mezcla de reacción se agitó en atmósfera de hidrógeno durante 3 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite y se concentró para proporcionar el ácido carboxílico. El ácido carboxílico (1,32 g, 1,15 mmol, ácido sin conglomerados) se disolvió en DMF (3,2 mL). A esto se agregó *N,N*-diisopropiletilamina (0,3 mL, 1,73 mmol) y PFPTFA (0,30 mL, 1,73 mmol). Luego de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, la mezcla de reacción se vertió en agua (40 mL) y se extrajo con EtOAc (2 x 50 mL). Se completó un tratamiento final estándar según se describió anteriormente, para proporcionar el compuesto 234. LCMS y NMR fueron congruentes con la estructura. El oligonucleótido 235 se preparó utilizando el procedimiento general descrito en el Ejemplo 46. La parte del conglomerado $GalNAc_2$ ($GalNAc_2$-24_a) del grupo conjugado $GalNAc_2$-24 puede combinarse con cualquier resto escindible presente en el oligonucleótido para proporcionar una variedad de grupos conjugados. La estructura de $GalNAc_2$-24 ($GalNAc_2$-24_a-CM) se muestra a continuación:



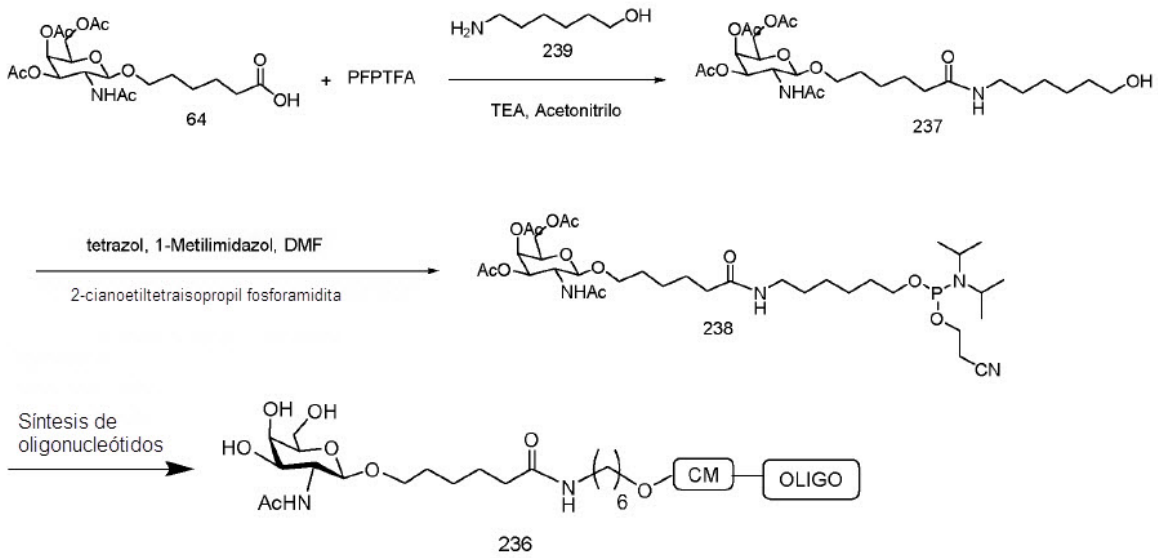
Ejemplo 105: Síntesis de oligonucleótidos que comprenden un conjugado GalNAc$_1$-25



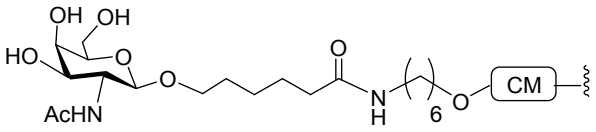


La síntesis del compuesto 166 se describe en el Ejemplo 54. El oligonucleótido 236 se preparó utilizando el procedimiento general descrito en el Ejemplo 46.

De manera alternativa, el oligonucleótido 236 se sintetizó utilizando el esquema que se muestra a continuación, y el compuesto 238 se utilizó para formar el oligonucleótido 236 utilizando los procedimientos descritos en el Ejemplo 10.



La parte del conglomerado de $GalNAc_1$ ($GalNAc_1$-25_a) del grupo conjugado $GalNAc_1$-25 puede combinarse con cualquier resto escindible presente en el oligonucleótido para proporcionar una variedad de grupos conjugados. La estructura de $GalNAc_1$-25 ($GalNAc_1$-25_a-CM) se muestra a continuación:



Ejemplo 106: Inhibición antisentido *in vivo* por oligonucleótidos dirigidos a SRB-1 que comprenden un conjugado 5′-$GalNAc_2$ o 5′-$GalNAc_3$

Los oligonucleótidos enumerados en las Tablas 116 y 117 se

evaluaron en estudios dependientes de la dosis en búsqueda de la inhibición antisentido de SRB-1 en ratones.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones macho C57BL/6 de seis semanas (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una vez con 2, 7 o 20 mg/kg de ISIS 440762 o con 0,2, 0,6, 2, 6, o 20 mg/kg de ISIS 686221, 686222 o 708561; o con solución salina. Cada grupo de tratamiento consistía en 4 animales. Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la última administración. Los niveles de ARNm de SRB-1 en hígado se midieron con PCR de tiempo real. Los niveles de ARNm de SRB-1 se normalizaron a los niveles de ARNm de ciclofilina de acuerdo con protocolos estándar. Los oligonucleótidos antisentido disminuyeron los niveles de ARNm de SRB-1 en una forma dependiente de la dosis, y los resultados ED_{50} se presentan en las Tablas 116 y 117. A pesar de que estudios anteriores mostraron que los oligonucleótidos trivalentes conjugados con GalNAc fueron significativamente más potentes que oligonucleótidos divalentes conjugados con GalNAc que, en cambio, fueron significativamente más potentes que oligonucleótidos monovalentes conjugados con GalNAc (ver, por ejemplo, Khorev et ál., *Bioorg. & Med. Chem.*, Vol. 16, 5216-5231 (2008)), el

tratamiento con oligonucleótidos antisentido que comprenden conglomerados monovalentes, divalentes y trivalentes de GalNAc disminuyeron los niveles de ARNm de SRB-1 con potencias similares a las que se muestran en las Tablas 116 y 117.

Tabla 116

Oligonucleótidos modificados dirigidos a SRB-1

N.° ISIS	Secuencias (5′ a 3′)	Conglomerado de GalNAc	ED_{50} (mg/kg)	SEQ ID NO
440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	n/a	4,7	823
686221	**$GalNAc_2$-24_a-$_{o'}\mathbf{A_{do}}$**$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_2$-24_a	0,39	827
686222	**$GalNAc_3$-13_a-$_{o'}\mathbf{A_{do}}$**$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_3$-13_a	0,41	827

Ver el Ejemplo 93 para la leyenda de la tabla. La estructura de $GalNAc_3$-13a se mostró en el Ejemplo 62, y la estructura de $GalNAc_2$-24a se mostró en el Ejemplo 104.

Tabla 117

Oligonucleótidos modificados dirigidos a SRB-1

N.° ISIS	Secuencias (5' a 3')	Conglomerado de GalNAc	ED_{50} (mg/kg)	SEQ ID NO
440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{k}{}_{s}{}^{m}C_{k}$	n/a	5	823
708561	**$GalNAc_1$-25_a-o'**$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_1$-25_a	0,4	823

Ver el Ejemplo 93 para la leyenda de la tabla. La estructura de $GalNAc_1$-25a se mostró en el Ejemplo 105.

También se evaluaron las concentraciones en el hígado de los oligonucleótidos de las Tablas 116 y 117, utilizando los procedimientos descritos en el Ejemplo 75. Los resultados que se muestran en las Tablas 117a y 117b a continuación son los niveles de tejidos de oligonucleótidos antisentido totales promedio para cada grupo de tratamiento, según se midió mediante UV en unidades de µg de oligonucleótido por gramo de tejido hepático. Los resultados muestran que los oligonucleótidos que comprendían un grupo conjugado GalNAc se acumulaban en el hígado a niveles significativamente mayores que la misma dosis del oligonucleótido sin un grupo conjugado GalNAc. Además, todos los oligonucleótidos antisentido que

comprenden uno, dos o tres ligandos GalNAc en sus grupos conjugados respectivos se acumularon en el hígado a niveles similares. Este resultado es sorprendente en vista de la literatura de referencia de Khorev et ál. citada anteriormente y es coherente con los datos de actividad mostrados en las Tablas 116 y 117 que anteceden.

Tabla 117a

Concentraciones en hígado de oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado $GalNAc_2$ o $GalNAc_3$

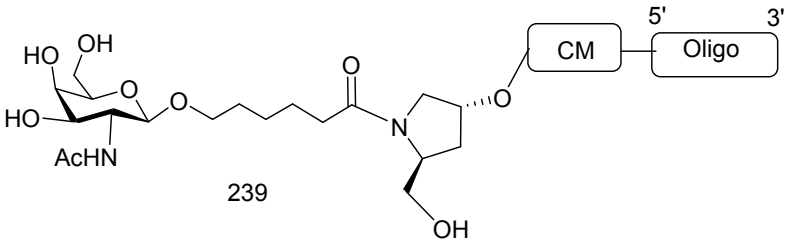
N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	[Oligonucleótido antisentido] (µg/g)	Conglomerado de GalNAc	CM
440762	2	2,1	n/a	n/a
	7	13,1		
	20	31,1		
686221	0,2	0,9	$GalNAc_2$-24_a	A_d
	0,6	2,7		
	2	12,0		
	6	26,5		
686222	0,2	0,5	$GalNAc_3$-13_a	A_d
	0,6	1,6		
	2	11,6		
	6	19,8		

Tabla 117b

Concentraciones en hígado de oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado $GalNAc_1$

N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	[Oligonucleótido antisentido] (µg/g)	Conglomerado de GalNAc	CM
440762	2	2,3	n/a	n/a
	7	8,9		
	20	23,7		
708561	0,2	0,4	$GalNAc_1$-25_a	PO
	0,6	1,1		
	2	5,9		
	6	23,7		
	20	53,9		

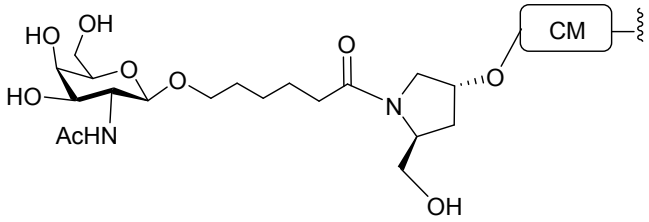
Ejemplo 107: Síntesis de oligonucleótidos que comprenden un conjugado $GalNAc_1$-26 o $GalNAc_1$-27



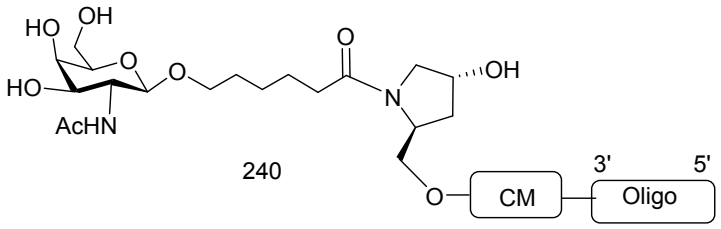
239

El oligonucleótido 239 se sintetiza mediante acoplamiento del compuesto 47 (ver Ejemplo 15) al ácido 64 (ver Ejemplo 32) utilizando HBTU y DIEA en DMF. El compuesto resultante que contiene amidas se fosfitila, luego se agrega al extremo 5'

de un oligonucleótido mediante procedimientos descritos en el Ejemplo 10. La parte del conglomerado de $GalNAc_1$ ($GalNAc_1$-26_a) del grupo conjugado $GalNAc_1$-26 puede combinarse con cualquier resto escindible presente en el oligonucleótido para proporcionar una variedad de grupos conjugados. La estructura de $GalNAc_1$-26 ($GalNAc_1$-26_a-CM) se muestra a continuación:



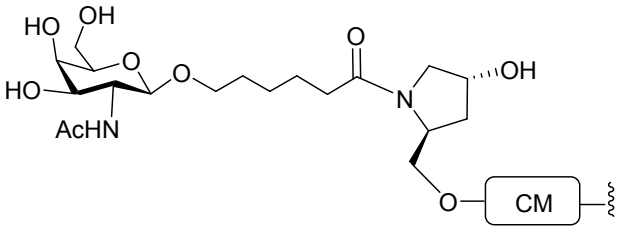
Para agregar el grupo conjugado $GalNAc_1$ al extremo 3' de un oligonucleótido, la amida formada a partir de la reacción de los compuestos 47 y 64 se agrega a un soporte sólido mediante los procedimientos descritos en el Ejemplo 7. La síntesis de oligonucleótidos se completa entonces mediante los procedimientos descritos en el Ejemplo 9 para formar el oligonucleótido 240.



240

La parte del conglomerado de $GalNAc_1$ ($GalNAc_1$-27_a) del grupo conjugado $GalNAc_1$-27 puede combinarse con cualquier resto

escindible presente en el oligonucleótido para proporcionar una variedad de grupos conjugados. La estructura de $GalNAc_1$-27 ($GalNAc_1$-27_a-CM) se muestra a continuación:



Ejemplo 108: Inhibición antisentido *in vivo* por oligonucleótidos que comprenden un grupo conjugado GalNAc dirigido a Apo(a) *in vivo*

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 118 a continuación se evaluaron en un estudio de una sola dosis en ratones.

Tabla 118

ASO modificados dirigidos a APO(a)

N.° ISIS	Secuencias (5′ a 3′)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO.
494372	$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	n/a	n/a	847
681251	**$GalNAc_3$-7_a-** $_{o}$′$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}G_{es}$ $T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-7a	PO	847

681255	**$GalNAc_3$-3_a-** $_{o'}T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}$ G_{ds} $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}$ $T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-3a	PO	847
681256	**$GalNAc_3$-10_a-** $_{o'}T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}$ G_{ds} $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}$ $T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-10a	PO	847
681257	**$GalNAc_3$-7_a-** $_{o'}T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}$ G_{ds} $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}$ $T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-7a	PO	847
681258	**$GalNAc_3$-13_a-** $_{o'}T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}$ G_{ds} $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}$ $T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-13a	PO	847
681260	$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}$ $T_{es}T_{es}{}^{m}C_{eo}$**$A_{do'}$-$GalNAc_3$-19**	$GalNAc_3$-19a	A_d	854

La estructura de $GalNAc_3$-7_a se mostró en el Ejemplo 48.

Tratamiento

Los ratones transgénicos macho que expresaban Apo(a) humana se inyectaron por vía subcutánea una vez con un oligonucleótido y dosificación enumerados en la Tabla 119 o con PBS. Cada grupo de tratamiento consistía en 4 animales. Se extrajo sangre el día antes de la dosificación para determinar niveles de referencia de la proteína Apo(a) en

plasma y a 1 semana luego de la primera dosis. Se llevarán a cabo extracciones de sangre posteriores durante aproximadamente 8 semanas. Los niveles de la proteína Apo(a) en plasma se midieron con un ELISA. Los resultados de la Tabla 119 se presentan como el porcentaje promedio de los niveles de proteína Apo(a) en plasma para cada grupo de tratamiento, normalizados a los niveles de referencia (% de BL). Los resultados muestran que los oligonucleótidos antisentido redujeron la expresión de la proteína Apo(a). Además, los oligonucleótidos que comprendían un grupo conjugado GalNAc presentaron una reducción aun más potente de la expresión de Apo(a) que el oligonucleótido que no comprende un grupo conjugado.

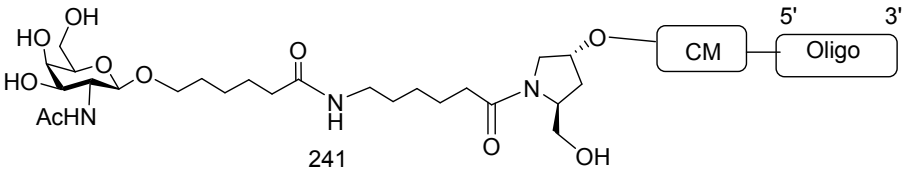
Tabla 119

Niveles de proteína Apo(a) en plasma

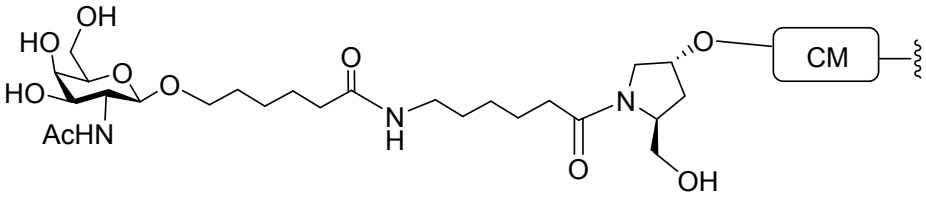
N.° ISIS	Dosificación (mg/kg)	Apo(a) a 1 semana (% de BL)
PBS	n/a	143
494372	50	58
681251	10	15
681255	10	14

681256	10	17
681257	10	24
681258	10	22
681260	10	26

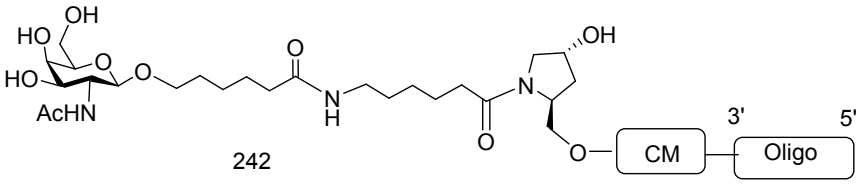
Ejemplo 109: Síntesis de oligonucleótidos que comprenden un conjugado $GalNAc_1$-28 o $GalNAc_1$-29



El oligonucleótido 241 se sintetiza utilizando procedimientos similares a los descritos en el Ejemplo 71 para formar el intermedio de fosforamidita, seguido por los procedimientos descritos en el Ejemplo 10 para sintetizar el oligonucleótido. La parte del conglomerado de $GalNAc_1$ ($GalNAc_1$-28_a) del grupo conjugado $GalNAc_1$-28 puede combinarse con cualquier resto escindible presente en el oligonucleótido para proporcionar una variedad de grupos conjugados. La estructura de $GalNAc_1$-28 ($GalNAc_1$-28_a-CM) se muestra a continuación:

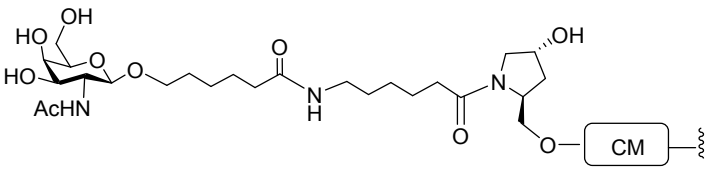


Para agregar el grupo conjugado $GalNAc_1$ al extremo 3′ de un oligonucleótido, se utilizan procedimientos similares a los descritos en el Ejemplo 71 para formar el intermedio de hidroxilo, que luego se agrega al soporte sólido mediante los procedimientos descritos en el Ejemplo 7. La síntesis de oligonucleótidos se completa entonces mediante los procedimientos descritos en el Ejemplo 9 para formar el oligonucleótido 242.

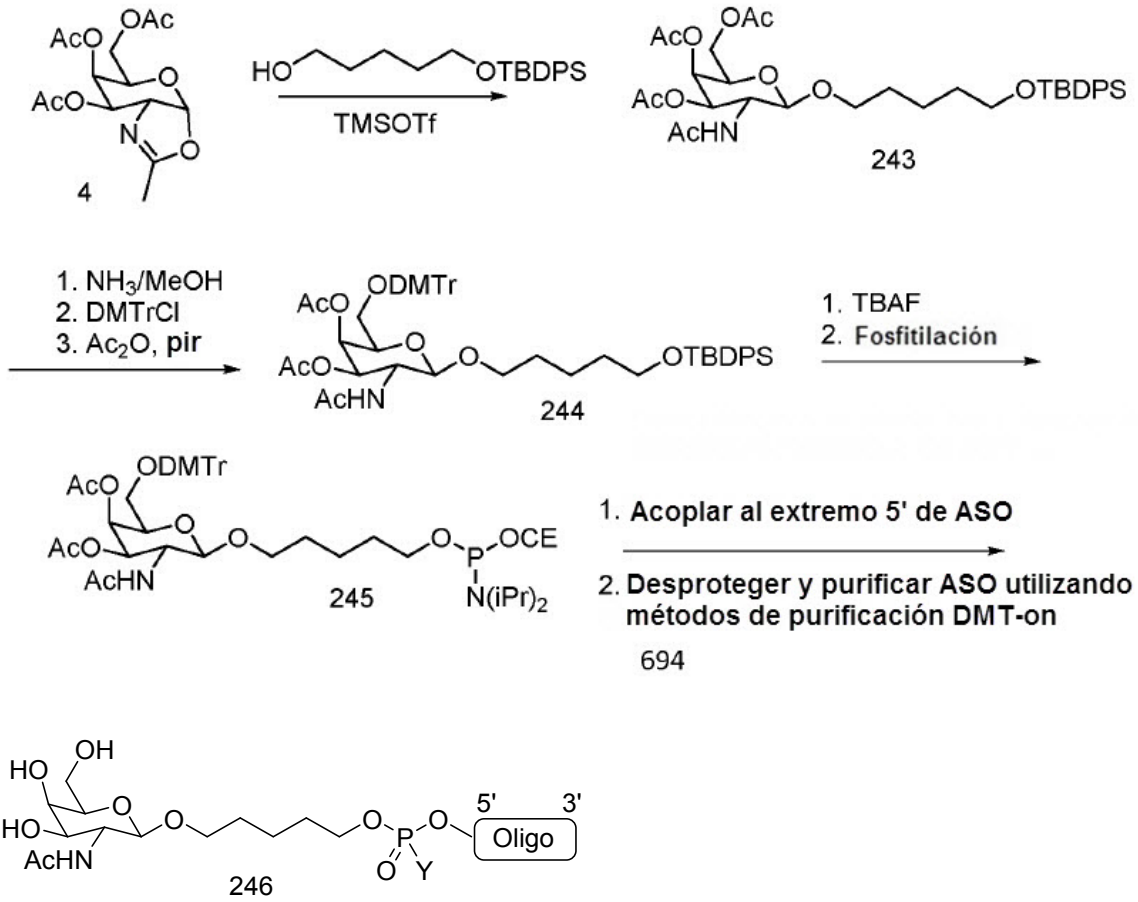


242

La parte del conglomerado de $GalNAc_1$ ($GalNAc_1$-29_a) del grupo conjugado $GalNAc_1$-29 puede combinarse con cualquier resto escindible presente en el oligonucleótido para proporcionar una variedad de grupos conjugados. La estructura de $GalNAc_1$-29 ($GalNAc_1$-29_a-CM) se muestra a continuación:

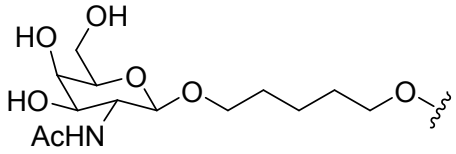


Ejemplo 110: Síntesis de oligonucleótidos que comprenden un conjugado GalNAc$_1$-30

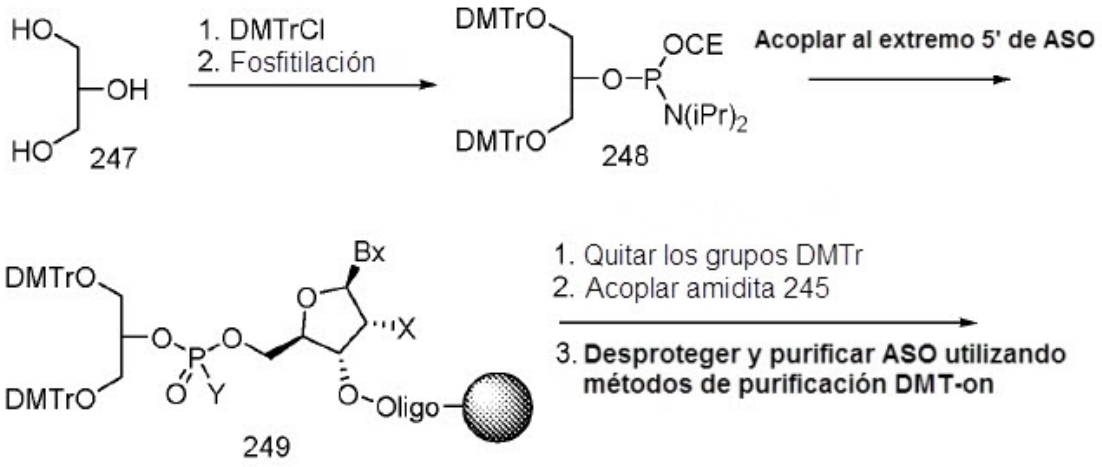


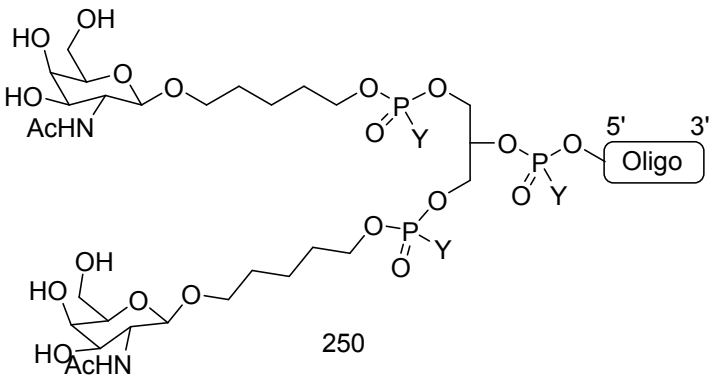
Se sintetiza un oligonucleótido 246 que comprende un grupo conjugado GalNAc$_1$-30, donde Y se selecciona de O, S, un alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido, amino, amino sustituido, azido, alquenilo o alquinilo, tal como se mostró anteriormente. La parte del conglomerado de GalNAc$_1$ (GalNAc$_1$-30$_a$) del grupo conjugado GalNAc$_1$-30 puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de

grupos conjugados. En determinadas modalidades, Y es parte del resto escindible. En determinadas modalidades, Y es parte de un resto estable, y el resto escindible está presente en el oligonucleótido. La estructura de $GalNAc_1$-30_a se muestra a continuación:

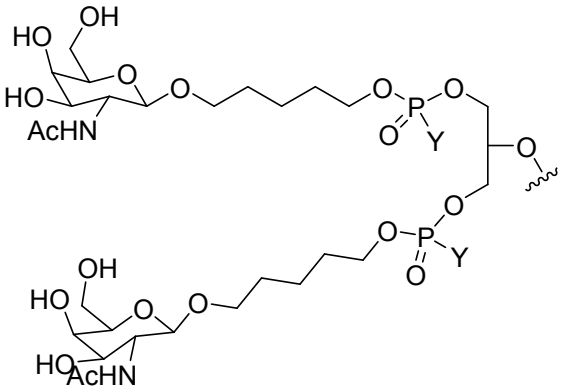


Ejemplo 111: Síntesis de oligonucleótidos que comprenden un conjugado $GalNAc_2$-31 o $GalNAc_2$-32

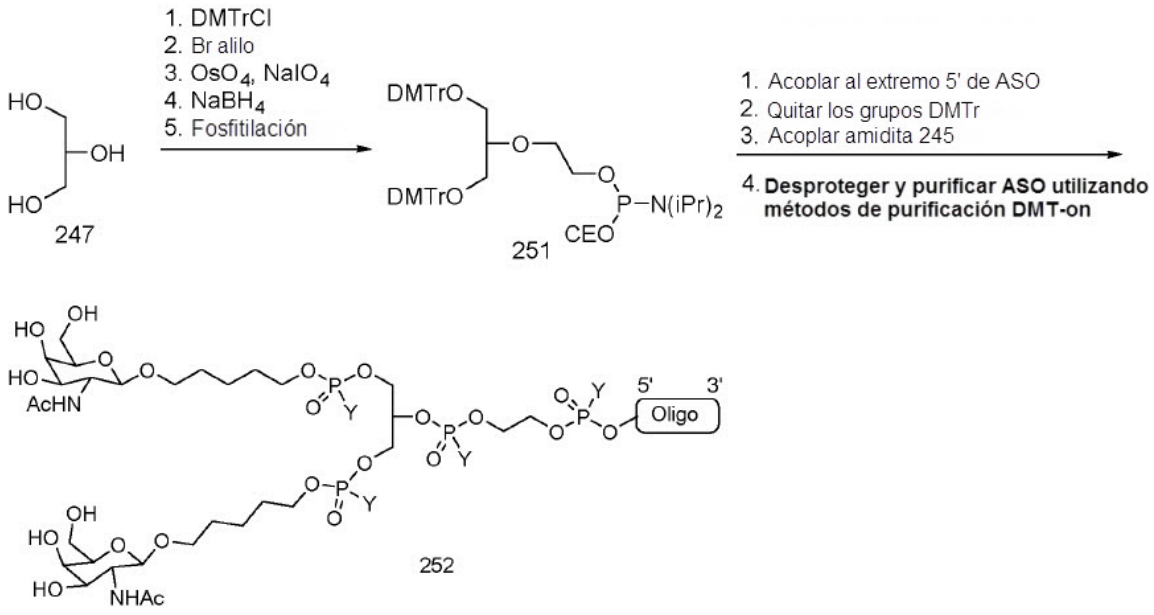




Se sintetiza un oligonucleótido 250 que comprende un grupo conjugado GalNAc$_2$-31, donde Y se selecciona de O, S, un alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido, amino, amino sustituido, azido, alquenilo o alquinilo, tal como se mostró anteriormente. La parte del conglomerado de GalNAc$_2$ (GalNAc$_2$-31$_a$) del grupo conjugado GalNAc$_2$-31 puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el grupo que contiene Y directamente adyacente al extremo 5' del oligonucleótido es parte del resto escindible. En determinadas modalidades, el grupo que contiene Y directamente adyacente al extremo 5' del oligonucleótido es parte de un resto estable, y el resto escindible está presente en el oligonucleótido. La estructura de GalNAc$_2$-31$_a$ se muestra a continuación:

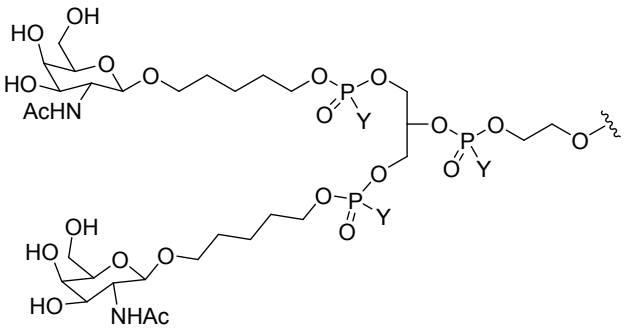


Se muestra a continuación la síntesis de un oligonucleótido que comprende un conjugado $GalNAc_2$-32.



Se sintetiza un oligonucleótido 252 que comprende un grupo conjugado $GalNAc_2$-32, donde Y se selecciona de O, S, un alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido, amino, amino sustituido, azido, alquenilo o alquinilo, tal como se mostró anteriormente. La parte del conglomerado de $GalNAc_2$ ($GalNAc_2$-32_a) del grupo conjugado $GalNAc_2$-32 puede combinarse con cualquier resto escindible para proporcionar una variedad de grupos conjugados. En determinadas modalidades, el grupo que contiene Y directamente adyacente al extremo 5' del oligonucleótido es parte del resto escindible. En determinadas modalidades, el grupo que contiene Y directamente adyacente al extremo 5' del oligonucleótido es

parte de un resto estable, y el resto escindible está presente en el oligonucleótido. La estructura de $GalNAc_2$-32_a se muestra a continuación:



Ejemplo 112: Oligonucleótidos modificados que comprenden un conjugado $GalNAc_1$

Los oligonucleótidos de la Tabla 120 dirigidos a SRB-1 se sintetizaron con un grupo conjugado $GalNAc_1$ para evaluar adicionalmente la potencia de los oligonucleótidos que comprenden grupos conjugados que contienen un ligando GalNAc.

Tabla 120

N.° ISIS	Secuencia (5′ a 3′)	Conglomerado de GalNAc	CM	SEQ ID NO.
711461	**$GalNAc_1$-25_{a-o},A_{do}** G_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} $^mC_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAc_1$-25_a	A_d	831
711462	**$GalNAc_1$-25_{a-o},**G_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} $^mC_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAc_1$-25_a	PO	829
711463	**$GalNAc_1$-25_{a-o},**G_{es} $^mC_{eo}$ T_{eo} T_{eo} $^mC_{eo}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{eo} $^mC_{eo}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAc_1$-25_a	PO	829
711465	**$GalNAc_1$-26_{a-o},A_{do}** G_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} $^mC_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAc_1$-26_a	A_d	831
711466	**$GalNAc_1$-26_{a-o},**G_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} $^mC_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAc_1$-26_a	PO	829
711467	**$GalNAc_1$-26_{a-o},**G_{es} $^mC_{eo}$ T_{eo} T_{eo} $^mC_{eo}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{eo} $^mC_{eo}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAc_1$-26_a	PO	829
711468	**$GalNAc_1$-28_{a-o},A_{do}** G_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} $^mC_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAc_1$-28_a	A_d	831
711469	**$GalNAc_1$-28_{a-o},**G_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} $^mC_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAc_1$-28_a	PO	829

711470	**$GalNAc_1$-$28_{a\text{-}o}$**,G_{es} $^mC_{eo}$ T_{eo} T_{eo} $^mC_{eo}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{eo} $^mC_{eo}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAc_1$-28_a	PO	829
713844	G_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} $^mC_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ T_{es} **T_{eo}-$GalNAc_1$-27_a**	$GalNAc_1$-27_a	PO	829
713845	G_{es} $^mC_{eo}$ T_{eo} T_{eo} $^mC_{eo}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{eo} $^mC_{eo}$ $^mC_{es}$ T_{es} **T_{eo}-$GalNAc_1$-27_a**	$GalNAc_1$-27_a	PO	829
713846	G_{es} $^mC_{eo}$ T_{eo} T_{eo} $^mC_{eo}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{eo} $^mC_{eo}$ $^mC_{es}$ T_{es} **T_{eo} A_{do}-$GalNAc_1$-27_a**	$GalNAc_1$-27_a	A_d	830
713847	G_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} $^mC_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ T_{es} **T_{eo}-$GalNAc_1$-29_a**	$GalNAc_1$-29_a	PO	829
713848	G_{es} $^mC_{eo}$ T_{eo} T_{eo} $^mC_{eo}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{eo} $^mC_{eo}$ $^mC_{es}$ T_{es} **T_{eo}-$GalNAc_1$-29_a**	$GalNAc_1$-29_a	PO	829
713849	G_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} $^mC_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_{eo} **A_{do}-$GalNAc_1$-29_a**	$GalNAc_1$-29_a	A_d	830
713850	G_{es} $^mC_{eo}$ T_{eo} T_{eo} $^mC_{eo}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{eo} $^mC_{eo}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_{eo} **A_{do}-$GalNAc_1$-29_a**	$GalNAc_1$-29_a	A_d	830

Ejemplo 113: Inhibición antisentido *in vivo* mediante oligonucleótidos dirigidos a CFB

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 121 se evaluaron en un estudio dependiente de la dosis en búsqueda de la inhibición antisentido del Factor B del complemento humano en ratones.

Tabla 121

ASO modificados dirigidos a CFB

N.° ISIS	Secuencias (5' a 3')	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID NO.
588540	$A_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}{}^{m}C_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{e}$	n/a	n/a	440
687301	**$GalNAc_3$-3_a-** $o'A_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}{}^{m}C_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-3a	PO	440

La estructura de $GalNAc_3$-3_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 39.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones transgénicos que expresan el CFB humano (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)

una vez por semana durante 3 semanas (un total de 4 dosis), con un oligonucleótido enumerado en la Tabla 122 o con solución salina. A los cuatro grupos de tratamiento que recibieron ISIS n.° 588540 se les proporcionaron 6, 12, 25 o 50 mg/kg por dosis. A los cuatro grupos de tratamiento que recibieron ISIS n.° 687301 se les proporcionaron 0,25, 0,5, 2 o 6 mg/kg por dosis. Cada grupo de tratamiento consistía en 4 animales. Los ratones se sacrificaron 2 días después de la administración final para determinar los niveles del CFB humano de riñón e hígado y ARNm de ciclofilina usando PCR en tiempo real de acuerdo con protocolos estándares. Los niveles de ARNm de CFB se normalizaron a los niveles de ciclofilina, y se utilizaron los promedios para cada grupo de tratamiento para determinr la dosis que alcanzó un 50 % de inhibición de la expresión de la transcripción del CFB humano (ED_{50}). Los resultados son los promedios de cuatro experimentos completafos con dos conjuntos de cebador y sonda diferentes y se muestran en la Tabla 122.

Tabla 122

Potencias de oligonucleótidos dirigidos al CFB humano *in vivo*

n.° ISIS	ED_{50} en el hígado (mg/kg)	ED_{50} en el riñón (mg/kg)	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM
588540	7,9	11,7	n/a	n/a
687301	0,49	0,35	$GalNAc_3$-3a	PO

Se midieron los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y transaminasa en hígado, en suero, con relación a ratones inyectados con solución salina, mediante protocolos estándar. También se evaluaron la bilirrubina total, BUN y pesos corporales. Los resultados muestran que no hay cambios significativos en ninguno de los grupos de tratamiento con respecto al grupo tratado con solución salina (no se muestran los datos), lo que indica que ambos oligonucleótidos fueron bien tolerados.

Ejemplo 114: Inhibición antisentido *in vivo* mediante oligonucleótidos dirigidos a CFB

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 123 se evaluaron en un estudio dependiente de la dosis en búsqueda de la inhibición antisentido de CFB humano en ratones.

Tratamiento

Se inyectó por vía subcutánea a ratones transgénicos que expresan el CFB humano (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) una vez con 0,6, 1, 6 o 18 mg/kg de un oligonucleótido enumerado en la Tabla 123 o con solución salina. Cada grupo de tratamiento consistió en 4 o 5 animales. Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la dosis para determinar los niveles del CFB humano de hígado y ARNm de ciclofilina usando PCR de tiempo real de acuerdo con protocolos estándares. Los niveles de ARNm de CFB se normalizaron a los niveles de ciclofilina, y se utilizaron los promedios para cada grupo de tratamiento para determinr la dosis que alcanzó un 50 % de inhibición de la expresión de la transcripción del CFB humano (ED_{50}). Los resultados se ilustran en la Tabla 123.

Tabla 123

ASO modificados dirigidos a CFB

N.° ISIS	Secuencias (5' a 3')	Conglomerado de $GalNAc_3$	CM	ED_{50} en el hígado (mg/kg)	SEQ ID NO.
696844	**$GalNAc_3$-7_a-** $_o'A_{es}T_{es}{}^mC_{es}{}^mC_{es}{}^mC_{es}A_{ds}{}^mC_{ds}G_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^mC_{es}{}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_e$	$GalNAc_3$-7a	PO	0,86	440
696845	**$GalNAc_3$-7_a-** $_o'A_{es}T_{eo}{}^mC_{eo}{}^mC_{eo}{}^mC_{eo}A_{ds}{}^mC_{ds}G_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^mC_{eo}{}^mC_{eo}A_{es}G_{es}{}^mC_e$	$GalNAc_3$-7a	PO	0,71	440
698969	**$GalNAc_3$-7_a-** $_o'A_{es}T_{eo}{}^mC_{eo}{}^mC_{eo}{}^mC_{es}A_{ds}{}^mC_{ds}G_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^mC_{eo}{}^mC_{eo}A_{es}G_{es}{}^mC_e$	$GalNAc_3$-7a	PO	0,51	440
698970	**$GalNAc_3$-7_a-** $_o'A_{es}T_{es}{}^mC_{eo}{}^mC_{eo}{}^mC_{eo}A_{ds}{}^mC_{ds}G_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^mC_{eo}{}^mC_{eo}A_{es}G_{es}{}^mC_e$	$GalNAc_3$-7a	PO	0,55	440

La estructura de $GalNAc_3$-7_a se mostró anteriormente en el Ejemplo 48.

Ejemplo 115: Inhibición antisentido del Factor B del Complemento (CFB) humano en células HepG2 mediante gapmers de MOE

Los oligonucleótidos antisentido se diseñaron para dirigirse a un ácido nucleico del Factor B del Complemento (CFB) humano

y se analizaron para ver sus efectos en el ARNm de CFB in vitro. Los oligonucleótidos antisentido se analizaron en una serie de experimentos que tenían condiciones de cultivo similares. Los resultados de cada experimento se presentan en tablas separadas que se muestran más adelante. Las células HepG2 cultivadas a una densidad de 20.000 células por pocillo se transfectaron utilizando electroporación con 4500 nM de oligonucleótido antisentido. Luego de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, el ARN se aisló de las células y los niveles de ARNm de CFB se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó el conjunto de cebador y sonda humano RTS3459 (secuencia directa AGTCTCTGTGGCATGGTTTGG, denominada en la presente SEQ ID NO: 810; secuencia inversa GGGCGAATGACTGAGATCTTG, denominada en la presente SEQ ID NO: 811; secuencia de sonda GGGCGAATGACTGAGATCTTG, denominada en la presente SEQ ID NO: 812) para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de CFB se ajustaron de acuerdo con el contenido de ARN total, tal como se midió con RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB, con respecto a las células de control no tratadas.

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos recientemente diseñados en las Tablas que figuran más adelante se diseñaron

como gapmers 5-10-5 de MOE. Los gapmers de MOE 5-10-5 tienen una longitud de 20 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende diez 2'-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprenden cinco nucleósidos cada una. Cada nucleósido en el segmento de ala 5' y cada nucleósido en el segmento de ala 3' tiene una modificación 2'-MOE. Los enlaces internucleósidos en cada gapmer son enlaces de fosforotioato (P=S). Todos los residuos de citosina en cada gapmer son 5-metilcitosinas. "Sitio de inicio" indica el nucleósido más cercano a 5' al cual el gapmer se dirige en la secuencia génica humana. "Sitio de detención" indica el nucleósido más cercano a 3' al cual el gapmer se dirige en la secuencia génica humana. Cada gapmer enumerado en las Tablas que figuran más adelante se dirige ya sea al ARNm de CFB humano, designado en la presente como SEQ ID NO: 1 (n.° de acceso GENBANK NM_001710.5) o a la secuencia genómica de CFB, denominada en la presente como SEQ ID NO: 2 (n.° de acceso GENBANK NT_007592.15 truncada a partir de los nucleótidos 31852000 a 31861000), o ambos. "n/a" indica que el oligonucleótido antisentido no se dirige a esa secuencia génica particular con 100 % de complementariedad.

Tabla 124

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers 5-10-5 de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y 2

N.° ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO: 1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio SEQ ID NO: 2	Sitio de detención SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO:
532608	20	39	Exón 1	GCTGAGCTGCCAGTCAAGGA	36	1741	1760	6
532609	26	45	Exón 1	GGCCCCGCTGAGCTGCCAGT	16	1747	1766	7
532610	45	64	Exón 1	CGGAACATCCAAGCGGGAGG	11	1766	1785	8
532611	51	70	Exón 1	CTTTCCCGGAACATCCAAGC	26	1772	1791	9

532612	100	119	Exón 1	ATCTGTGTTCTG GCACCTGC	25	1821	1840	10
532613	148	167	Exón 1	GTCACATTCCCT TCCCCTGC	39	1869	1888	11
532614	154	173	Exón 1	GACCTGGTCACA TTCCCTTC	71	1875	1894	12
532615	160	179	Exón 1	GACCTAGACCTG GTCACATT	35	1881	1900	13
532616	166	185	Exón 1	ACTCCAGACCTA GACCTGGT	39	1887	1906	14
532617	172	191	Exón 1	GCTGAAACTCCA GACCTAGA	27	1893	1912	15
532618	178	197	Exón 1	GTCCAAGCTGAA ACTCCAGA	29	1899	1918	16
532619	184	203	Exón 1	CTCAGTGTCCAA GCTGAAAC	21	1905	1924	17
532620	246	265	Exón 1	AGGAGAGAAGCT GGGCCTGG	31	1967	1986	18
532621	252	271	Exón 1	GAAGGCAGGAGA GAAGCTGG	25	1973	1992	19
532622	336	355	Unión de Exón 1-2	GTGGTGGTCACA CCTCCAGA	28	n/a	n/a	20
532623	381	400	Exón 2	CCCTCCAGAGAG CAGGATCC	22	2189	2208	21

532624	387	406	Exón 2	TCTACCCCCTCC AGAGAGCA	37	2195	2214	22
532625	393	412	Exón 2	TTGATCTCTACC CCCTCCAG	30	2201	2220	23
532626	417	436	Exón 2	TGGAGAAGTCGG AAGGAGCC	35	2225	2244	24
532627	423	442	Exón 2	CCCTCTTGGAGA AGTCGGAA	37	2231	2250	25
532628	429	448	Exón 2	GCCTGGCCCTCT TGGAGAAG	0	2237	2256	26
532629	435	454	Exón 2	TCCAGTGCCTGG CCCTCTTG	26	2243	2262	27
532630	458	477	Exón 2	AGAAGCCAGAAG GACACACG	30	2266	2285	28
532631	464	483	Exón 2	ACGGGTAGAAGC CAGAAGGA	43	2272	2291	29
532632	480	499	Exón 2	CGTGTCTGCACA GGGTACGG	57	2288	2307	30
532633	513	532	Exón 2	AGGGTGCTCCAG GACCCCGT	27	2321	2340	31
532634	560	579	Unión de Exón 2-3	TTGCTCTGCACT CTGCCTTC	41	n/a	n/a	32
532635	600	619	Exón 3	TATTCCCCGTTC TCGAAGTC	67	2808	2827	33

532636	626	645	Exón 3	CATTGTAGTAGG GAGACCGG	24	2834	2853	34
532637	632	651	Exón 3	CACTCACATTGT AGTAGGGA	49	2840	2859	35
532638	638	657	Exón 3	TCTCATCACTCA CATTGTAG	50	2846	2865	36
532639	644	663	Exón 3	AAGAGATCTCAT CACTCACA	52	2852	2871	37
532640	650	669	Exón 3	AGTGGAAAGAGA TCTCATCA	34	2858	2877	38
532641	656	675	Exón 3	CATAGCAGTGGA AAGAGATC	32	2864	2883	39
532642	662	681	Exón 3	AACCGTCATAGC AGTGGAAA	45	2870	2889	40
532643	668	687	Exón 3	GAGTGTAACCGT CATAGCAG	36	2876	2895	41
532644	674	693	Exón 3	CCCGGAGAGTGT AACCGTCA	30	2882	2901	42
532645	680	699	Exón 3	CAGAGCCCCGGA GAGTGTAA	27	2888	2907	43
532646	686	705	Exón 3	GATTGGCAGAGC CCCGGAGA	20	2894	2913	44
532647	692	711	Exón 3	AGGTGCGATTGG CAGAGCCC	28	2900	2919	45
532648	698	717	Exón 3	CTTGGCAGGTGC GATTGGCA	24	2906	2925	46
532649	704	723	Exón 3	CATTCACTTGGC AGGTGCGA	28	2912	2931	47

532650	729	748	Exón 3	ATCGCTGTCTGCCCACTCCA	44	2937	2956	48
532651	735	754	Exón 3	TCACAGATCGCTGTCTGCCC	44	2943	2962	49
532652	741	760	Exón 3	CCGTTGTCACAGATCGCTGT	27	2949	2968	50
532653	747	766	Unión de Exón 3-4	CCCGCTCCGTTGTCACAGAT	28	n/a	n/a	51
532654	753	772	Unión de Exón 3-4	CAGTACCCCGCTCCGTTGTC	13	n/a	n/a	52
532655	759	778	Unión de Exón 3-4	TTGGAGCAGTACCCCGCTCC	8	n/a	n/a	53
532656	789	808	Exón 4	ACCTTCCTTGTGCCAATGGG	40	3152	3171	54
532657	795	814	Exón 4	CTGCCCACCTTCCTTGTGCC	41	3158	3177	55
532658	818	837	Exón 4	CGCTGTCTTCAAGGCGGTAC	33	3181	3200	56
532659	835	854	Exón 4	GCTGCAGTGGTAGGTGACGC	32	3198	3217	57

532660	841	860	Exón 4	CCCCCGGCTGCA GTGGTAGG	17	3204	3223	58
532661	847	866	Exón 4	GGTAAGCCCCCG GCTGCAGT	28	3210	3229	59
532662	853	872	Exón 4	ACGCAGGGTAAG CCCCCGGC	13	3216	3235	60
532663	859	878	Exón 4	GGAGCCACGCAG GGTAAGCC	33	3222	3241	61
532664	866	885	Exón 4	GCCGCTGGGAGC CACGCAGG	10	3229	3248	62
532665	891	910	Exón 4	CAAGAGCCACCT TCCTGACA	17	3254	3273	63
532666	897	916	Exón 4	CCGCTCCAAGAG CCACCTTC	25	3260	3279	64
532667	903	922	Exón 4	TCCGTCCCGCTC CAAGAGCC	29	3266	3285	65
532668	909	928	Exón 4	GAAGGCTCCGTC CCGCTCCA	14	3272	3291	66
532669	915	934	Exón 4	TGGCAGGAAGGC TCCGTCCC	18	3278	3297	67
532670	921	940	Unión de Exón 4-5	GAGTCTTGGCAG GAAGGCTC	20	n/a	n/a	68
532671	927	946	Unión de Exón 4-5	ATGAAGGAGTCT TGGCAGGA	14	n/a	n/a	69

532672	956	975	Exón 5	CTTCGGCCACCT CTTGAGGG	45	3539	3558	70
532673	962	981	Exón 5	GGAAAGCTTCGG CCACCTCT	37	3545	3564	71
532674	968	987	Exón 5	AAGACAGGAAAG CTTCGGCC	28	3551	3570	72
532675	974	993	Exón 5	TCAGGGAAGACA GGAAAGCT	16	3557	3576	73
532676	996	1015	Exón 5	TCGACTCCTTCT ATGGTCTC	31	3579	3598	74
532677	1033	1052	Unión de Exón 5-6	CTTCTGTTGTTC CCCTGGGC	36	n/a	n/a	75
532678	1068	1087	Exón 6	TTCATGGAGCCT GAAGGGTC	19	3752	3771	76
532679	1074	1093	Exón 6	TAGATGTTCATG GAGCCTGA	24	3758	3777	77
532680	1080	1099	Exón 6	ACCAGGTAGATG TTCATGGA	13	3764	3783	78
532681	1086	1105	Exón 6	TCTAGCACCAGG TAGATGTT	20	3770	3789	79
532682	1092	1111	Exón 6	GATCCATCTAGC ACCAGGTA	33	3776	3795	80
532683	1098	1117	Exón 6	CTGTCTGATCCA TCTAGCAC	44	3782	3801	81

532684	1104	1123	Exón 6	CCAATGCTGTCT GATCCATC	29	3788	3807	82
532685	1129	1148	Exón 6	TTTGGCTCCTGT GAAGTTGC	40	3813	3832	83

Tabla 125

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers 5-10-5 de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y 2

N.° ISIS	Sitio de ini-cio SEQ ID NO: 1	Sitio de deten ción SEQ ID NO: 1	Región obje-tivo	Secuencia	% de inhi-bición	Sitio de ini-cio SEQ ID NO: 2	Sitio de deten ción SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO:
532686	1135	1154	Exón 6	ACACTTTTTG GCTCCTGTGA	91	3819	3838	84
532687	1141	1160	Exón 6	GACTAGACAC TTTTTGGCTC	77	3825	3844	85
532688	1147	1166	Exón 6	TAAGTTGACT AGACACTTTT	70	3831	3850	86
532689	1153	1172	Exón 6	CTCAATTAAG TTGACTAGAC	61	3837	3856	87

532690	1159	1178	Unión del Exón 6-7	CACCTTCTCA ATTAAGTTGA	57	3843	3862	88
532691	1165	1184	Unión del Exón 6-7	ACTTGCCACC TTCTCAATTA	56	n/a	n/a	89
532692	1171	1190	Unión del Exón 6-7	ACCATAACTT GCCACCTTCT	56	n/a	n/a	90
532693	1177	1196	Exón 7	CTTCACACCA TAACTTGCCA	56	4153	4172	91
532694	1183	1202	Exón 7	TCTTGGCTTC ACACCATAAC	55	4159	4178	92
532695	1208	1227	Exón 7	ATGTGGCATA TGTCACTAGA	55	4184	4203	93
532696	1235	1254	Exón 7	CAGACACTTT GACCCAAATT	55	4211	4230	94
532697	1298	1317	Unión del Exón 7-8	GGTCTTCATA ATTGATTTCA	53	n/a	n/a	95

532698	1304	1323	Unión del Exón 7-8	ACTTGTGGTCTTCATAATTG	53	n/a	n/a	96
532699	1310	1329	Unión del Exón 7-8	ACTTCAACTTGTGGTCTTCA	52	n/a	n/a	97
532700	1316	1335	Exón 8	TCCCTGACTTCAACTTGTGG	52	4609	4628	98
532701	1322	1341	Exón 8	TGTTAGTCCCTGACTTCAAC	52	4615	4634	99
532702	1328	1347	Exón 8	TCTTGGTGTTAGTCCCTGAC	51	4621	4640	100
532703	1349	1368	Exón 8	TGTACACTGCCTGGAGGGCC	51	4642	4661	101
532704	1355	1374	Exón 8	TCATGCTGTACACTGCCTGG	51	4648	4667	102
532705	1393	1412	Exón 8	GTTCCAGCCTTCAGGAGGGA	50	4686	4705	103
532706	1399	1418	Exón 8	GGTGCGGTTCCAGCCTTCAG	50	4692	4711	104
532707	1405	1424	Exón 8	ATGGCGGGTGCGGTTCCAGC	50	4698	4717	105

532708	1411	1430	Exón 8	GATGACATGG CGGGTGCGGT	49	4704	4723	106
532709	1417	1436	Exón 8	GAGGATGATG ACATGGCGGG	49	4710	4729	107
532710	1443	1462	Unión del Exón 8-9	CCCATGTTGT GCAATCCATC	48	n/a	n/a	108
532711	1449	1468	Exón 9	TCCCCGCCCA TGTTGTGCAA	48	5023	5042	109
532712	1455	1474	Exón 9	ATTGGGTCCC CGCCCATGTT	48	5029	5048	110
532713	1461	1480	Exón 9	ACAGTAATTG GGTCCCCGCC	48	5035	5054	111
532714	1467	1486	Exón 9	TCAATGACAG TAATTGGGTC	47	5041	5060	112
532715	1473	1492	Exón 9	ATCTCATCAA TGACAGTAAT	47	5047	5066	113
532716	1479	1498	Exón 9	TCCCGGATCT CATCAATGAC	46	5053	5072	114
532717	1533	1552	Unión del Exón 9-10	ACATCCAGAT AATCCTCCCT	46	n/a	n/a	115

532718	1539	1558	Unión del Exón 9-10	ACATAGACAT CCAGATAATC	46	n/a	n/a	116
532719	1545	1564	Unión del Exón 9-10	CCAAACACAT AGACATCCAG	46	n/a	n/a	117
532720	1582	1601	Exón 10	AGCATTGATG TTCACTTGGT	46	5231	5250	118
532721	1588	1607	Exón 10	AGCCAAAGCA TTGATGTTCA	45	5237	5256	119
532722	1594	1613	Exón 10	CTTGGAAGCC AAAGCATTGA	45	5243	5262	120
532723	1600	1619	Exón 10	GTCTTTCTTG GAAGCCAAAG	45	5249	5268	121
532724	1606	1625	Exón 10	CTCATTGTCT TTCTTGGAAG	44	5255	5274	122
532725	1612	1631	Exón 10	ATGTTGCTCA TTGTCTTTCT	44	5261	5280	123
532726	1618	1637	Exón 10	GAACACATGT TGCTCATTGT	44	5267	5286	124
532727	1624	1643	Exón 10	GACTTTGAAC ACATGTTGCT	43	5273	5292	125

532728	1630	1649	Exón 10	ATCCTTGACT TTGAACACAT	43	5279	5298	126
532729	1636	1655	Exón 10	TTCCATATCC TTGACTTTGA	43	5285	5304	127
532730	1642	1661	Exón 10	CAGGTTTTCC ATATCCTTGA	42	5291	5310	128
532731	1686	1705	Exón 11	CTCAGAGACT GGCTTTCATC	42	5827	5846	129
532732	1692	1711	Exón 11	CAGAGACTCA GAGACTGGCT	42	5833	5852	130
516252	1698	1717	Exón 11	ATGCCACAGA GACTCAGAGA	42	5839	5858	131
532733	1704	1723	Exón 11	CAAACCATGC CACAGAGACT	41	5845	5864	132
532734	1710	1729	Exón 11	TGTTCCCAAA CCATGCCACA	41	5851	5870	133
532735	1734	1753	Exón 11	TTGTGGTAAT CGGTACCCTT	41	5875	5894	134
532736	1740	1759	Exón 11	GGTTGCTTGT GGTAATCGGT	40	5881	5900	135
532737	1746	1765	Exón 11	TGCCATGGTT GCTTGTGGTA	40	5887	5906	136
532738	1752	1771	Exón 11	TTGGCCTGCC ATGGTTGCTT	40	5893	5912	137

532739	1758	1777	Exón 11	GAGATCTTGG CCTGCCATGG	38	5899	5918	138
532740	1803	1822	Exón 12	ACAGCCCCCA TACAGCTCTC	38	6082	6101	139
532741	1809	1828	Exón 12	GACACCACAG CCCCCATACA	38	6088	6107	140
532742	1815	1834	Exón 12	TACTCAGACA CCACAGCCCC	38	6094	6113	141
532743	1821	1840	Exón 12	ACAAAGTACT CAGACACCAC	37	6100	6119	142
532744	1827	1846	Exón 12	GTCAGCACAA AGTACTCAGA	37	6106	6125	143
532745	1872	1891	Exón 12	TTGATTGAGT GTTCCTTGTC	36	6151	6170	144
532746	1878	1897	Exón 12	CTGACCTTGA TTGAGTGTTC	35	6157	6176	145
532747	1909	1928	Exón 13	TATCTCCAGG TCCCGCTTCT	35	6403	6422	146
532748	1967	1986	Exón 13	GAATTCCTGC TTCTTTTTTC	32	6461	6480	147
532749	1973	1992	Exón 13	ATTCAGGAAT TCCTGCTTCT	32	6467	6486	148
532750	1979	1998	Exón 13	CATAAAATTC AGGAATTCCT	32	6473	6492	149

532751	1985	2004	Exón 13	CATAGTCATA AAATTCAGGA	31	6479	6498	150
532752	2006	2025	Exón 13	TGAGCTTGAT CAGGGCAACG	30	6500	6519	151
532753	2012	2031	Exón 13	TATTCTTGAG CTTGATCAGG	30	6506	6525	152
532754	2048	2067	Exón 13-14 Junction	GACAAATGGG CCTGATAGTC	30	n/a	n/a	153
532755	2070	2089	Exón 14	GTTGTTCCCT CGGTGCAGGG	29	6659	6678	154
532756	2076	2095	Exón 14	GCTCGAGTTG TTCCCTCGGT	28	6665	6684	155
532757	2082	2101	Exón 14	CTCAAAGCTC GAGTTGTTCC	28	6671	6690	156
532758	2088	2107	Exón 14	GGAAGCCTCA AAGCTCGAGT	25	6677	6696	157
532759	2094	2113	Exón 14	GTTGGAGGAA GCCTCAAAGC	23	6683	6702	158
532760	2100	2119	Exón 14	GTGGTAGTTG GAGGAAGCCT	23	6689	6708	159

532761	2106	2125	Exón 14	TGGCAAGTGG TAGTTGGAGG	18	6695	6714	160
532762	2112	2131	Exón 14	TGTTGCTGGC AAGTGGTAGT	14	6701	6720	161

Tabla 126

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers 5-10-5 de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y 2

N.° ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO: 1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio SEQ ID NO: 2	Sitio de detención SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO:
532812	n/a	n/a	Exón 1	TCCAGCTCA CTCCCCTGT TG	19	1593	1612	162
532813	n/a	n/a	Exón 1	TAAGGATCC AGCTCACTC CC	40	1599	1618	163
532814	n/a	n/a	Exón 1	CAGAAATAA GGATCCAGC TC	39	1605	1624	164

532815	n/a	n/a	Exón 1	AGGGACCAGAAATAAGGATC	0	1611	1630	165
532816	n/a	n/a	Exón 1	CCACTTAGGGACCAGAAATA	27	1617	1636	166
532817	n/a	n/a	Exón 1	TCCAGGACTCTCCCCTTCAG	39	1682	1701	167
532818	n/a	n/a	Exón 1	AAGTCCCACCCTTTGCTGCC	15	1707	1726	168
532819	n/a	n/a	Exón 1	CTGCAGAAGTCCCACCCTTT	26	1713	1732	169
532820	n/a	n/a	Exón 1	CAGAAACTGCAGAAGTCCCA	8	1719	1738	170
532821	n/a	n/a	Exón 2 - Intrón 2	AACCTCTGCACTCTGCCTTC	39	2368	2387	171

532822	n/a	n/a	Exón 2 - Intrón 2	CCCTCAAACCTCTGCACTCT	3	2374	2393	172
532823	n/a	n/a	Exón 2 - Intrón 2	TCATTGCCCTCAAACCTCTG	19	2380	2399	173
532824	n/a	n/a	Intrón 2	CCACACTCATTGCCCTCAAA	37	2386	2405	174
532825	n/a	n/a	Intrón 2	CACTGCCCACACTCATTGCC	23	2392	2411	175
532826	n/a	n/a	Intrón 2	TTAGGCCACTGCCCACACTC	15	2398	2417	176
532827	n/a	n/a	Intrón 2	CTAGTCCTGACCTTGCTGCC	28	2436	2455	177
532828	n/a	n/a	Intrón 2	CTCATCCTAGTCCTGACCTT	25	2442	2461	178

532829	n/a	n/a	Intrón 2	CCTAGTCTC ATCCTAGTC CT	23	2448	2467	179
532830	n/a	n/a	Intrón 2	ACCCTGCCT AGTCTCATC CT	30	2454	2473	180
532831	n/a	n/a	Intrón 2	CTTGTCACC CTGCCTAGT CT	34	2460	2479	181
532832	n/a	n/a	Intrón 2	GCCCACCTT GTCACCCTG CC	36	2466	2485	182
532833	n/a	n/a	Intrón 2	CCTAAAACT GCTCCTACT CC	9	2492	2511	183
532834	n/a	n/a	Intrón 4	GAGTCAGAA ATGAGGTCA AA	19	3494	3513	184
532835	n/a	n/a	Intrón 11	CCCTACTCC CATTTCACC TT	16	5971	5990	185
532836	n/a	n/a	Intrón 8 - Exón 9	TGTTGTGCA ATCCTGCAG AA	25	5013	5032	186

532837	n/a	n/a	Intrón 1	AAAGGCTGATGAAGCCTGGC	18	2123	2142	187
532838	n/a	n/a	Intrón 7	CCTTTGACCACAAAGTGGCC	21	4461	4480	188
532839	n/a	n/a	Intrón 12	AGGTACCACCTCTTTGTGGG	29	6362	6381	189
532840	n/a	n/a	Intrón 1 - Exón 2	TGGTGGTCACACCTGAAGAG	34	2143	2162	190
532763	2133	2152	Unión del Exón 14-15	GCAGGGAGCAGCTCTTCCTT	40	n/a	n/a	191
532764	2139	2158	Exón 15	TCCTGTGCAGGGAGCAGCTC	28	6927	6946	192
532765	2145	2164	Exón 15	TTGATATCCTGTGCAGGGAG	41	6933	6952	193
532766	2151	2170	Exón 15	AGAGCTTTGATATCCTGTGC	36	6939	6958	194

532767	2157	2176	Exón 15	ACAAACAGAGCTTTGATATC	33	6945	6964	195
532768	2163	2182	Exón 15	TCAGACACAAACAGAGCTTT	41	6951	6970	196
532769	2169	2188	Exón 15	TCCTCCTCAGACACAAACAG	49	6957	6976	197
532770	2193	2212	Exón 15	ACCTCCTTCCGAGTCAGCTT	61	6981	7000	198
532771	2199	2218	Exón 15	ATGTAGACCTCCTTCCGAGT	39	6987	7006	199
532772	2205	2224	Exón 15	TTCTTGATGTAGACCTCCTT	30	6993	7012	200
532773	2211	2230	Exón 15	TCCCCATTCTTGATGTAGAC	31	6999	7018	201
532774	2217	2236	Unión del Exón 15-16	TTCTTATCCCCATTCTTGAT	36	n/a	n/a	202

532775	2223	2242	Unión del Exón 15-16	CTGCCTTTCTTATCCCCATT	56	n/a	n/a	203
532776	2229	2248	Unión del Exón 15-16	TCACAGCTGCCTTTCTTATC	33	n/a	n/a	204
532777	2235	2254	Exón 16	TCTCTCTCACAGCTGCCTTT	38	7119	7138	205
532778	2241	2260	Exón 16	TGAGCATCTCTCTCACAGCT	51	7125	7144	206
532779	2247	2266	Exón 16	GCATATTGAGCATCTCTCTC	39	7131	7150	207
532780	2267	2286	Exón 16	TGACTTTGTCATAGCCTGGG	56	7151	7170	208
532781	2273	2292	Exón 16	TGTCCTTGACTTTGTCATAG	36	7157	7176	209

532782	2309	2328	Exón 16	CAGTACAAAGGAACCGAGGG	30	7193	7212	210
532783	2315	2334	Exón 16	CTCCTCCAGTACAAAGGAAC	21	7199	7218	211
532784	2321	2340	Exón 16	GACTCACTCCTCCAGTACAA	31	7205	7224	212
532785	2327	2346	Exón 16	CATAGGGACTCACTCCTCCA	30	7211	7230	213
532786	2333	2352	Exón 16	GGTCAGCATAGGGACTCACT	31	7217	7236	214
532787	2352	2371	Unión del Exón 16-17	TCACCTCTGCAAGTATTGGG	42	7236	7255	215
532788	2358	2377	Unión del Exón 16-17	CCAGAATCACCTCTGCAAGT	32	n/a	n/a	216

532789	2364	2383	Unión del Exón 16-17	GGGCCGCCAGAATCACCTCT	35	n/a	n/a	217
532790	2382	2401	Exón 17	CTCTTGTGAACTATCAAGGG	33	7347	7366	218
532791	2388	2407	Exón 17	CGACTTCTCTTGTGAACTAT	52	7353	7372	219
532792	2394	2413	Exón 17	ATGAAACGACTTCTCTTGTG	16	7359	7378	220
532793	2400	2419	Exón 17-18 Junction	ACTTGAATGAAACGACTTCT	45	7365	7384	221
532794	2406	2425	Unión del Exón 17-18	ACACCAACTTGAATGAAACG	18	n/a	n/a	222
532795	2427	2446	Exón 18	TCCACTACTCCCCAGCTGAT	30	7662	7681	223

532796	2433	2452	Exón 18	CAGACATCCACTACTCCCCA	38	7668	7687	224
532797	2439	2458	Exón 18	TTTTTGCAGACATCCACTAC	35	7674	7693	225
532798	2445	2464	Exón 18	TTCTGGTTTTTGCAGACATC	45	7680	7699	226
532799	2451	2470	Exón 18	TGCCGCTTCTGGTTTTTGCA	47	7686	7705	227
532800	2457	2476	Exón 18	TGCTTTTGCCGCTTCTGGTT	61	7692	7711	228
532801	2463	2482	Exón 18	GGTACCTGCTTTTGCCGCTT	47	7698	7717	229
532802	2469	2488	Exón 18	TGAGCAGGTACCTGCTTTTG	31	7704	7723	230
532803	2517	2536	Exón 18	TTCAGCCAGGGCAGCACTTG	41	7752	7771	231

532804	2523	2542	Exón 18	TTCTCCTTCAGCCAGGGCAG	44	7758	7777	232
532805	2529	2548	Exón 18	TGGAGTTTCTCCTTCAGCCA	46	7764	7783	233
532806	2535	2554	Exón 18	TCATCTTGGAGTTTCTCCTT	49	7770	7789	234
532807	2541	2560	Exón 18	AAATCCTCATCTTGGAGTTT	30	7776	7795	235
532808	2547	2566	Exón 18	AAACCCAAATCCTCATCTTG	20	7782	7801	236
532809	2571	2590	Exón 18	GTCCAGCAGGAAACCCCTTA	65	7806	7825	237
532810	2577	2596	Exón 18	GCCCCTGTCCAGCAGGAAAC	74	7812	7831	238
532811	2599	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTCAATCCC	96	7834	7853	239

Tabla 127

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers 5-10-5 de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y 2

N.° ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO: 1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	Sitio de inicio SEQ ID NO: 2	Sitio de detención SEQ ID NO: 2	% de inhibición	SEQ ID NO:
532841	n/a	n/a	Intrón 6-Exón 7	AACTTGCCACCTGTGGGTGA	4142	4161	11	240
532842	n/a	n/a	Exón 15 - Intrón 15	TCACCTTATCCCCATTCTTG	7007	7026	16	241
532843	n/a	n/a	Intrón 11	TCAACTTTCACAAACCACCA	6015	6034	19	242
532844	n/a	n/a	Intrón 16 - Exón 17	CCGCCAGAATCACCTGCAAG	7326	7345	33	243

532845	n/a	n/a	Intrón 10	AGGAGGAATGAAGAAGGCTT	5431	5450	29	244
532846	n/a	n/a	Intrón 13	GCCTTTCCTCAGGGATCTGG	6561	6580	26	245
532847	n/a	n/a	Intrón 4	AAATGTCTGGGAGTGTCAGG	3477	3496	18	246
532848	n/a	n/a	Intrón 15	GCCTAGAGTGCCTCCTTAGG	7038	7057	20	247
532849	n/a	n/a	Intrón 17	GGCATCTCCCCAGATAGGAA	7396	7415	16	248
532850	n/a	n/a	Intrón 6	AGGGAGCTAGTCCTGGAAGA	3906	3925	14	249
532851	n/a	n/a	Intrón 1 - Exón 2	ACACCTGAAGAGAAAGGCTG	2135	2154	6	250
532852	n/a	n/a	Intrón 7	CCCTTTGACCACAAAGTGGC	4462	4481	25	251

532853	n/a	n/a	Intrón 7	GCCCTCAAGGTAGTCTCATG	4354	4373	26	252
532854	n/a	n/a	Intrón 6	AAGGGAAGGAGGACAGAATA	3977	3996	18	253
532855	n/a	n/a	Intrón 1	AAAGGCCAAGGAGGGATGCT	2099	2118	9	254
532856	n/a	n/a	Exón 8 - Intrón 8	AGAGGTCCCTTCTGACCATC	4736	4755	4	255
532857	n/a	n/a	Intrón 8	GCTGGGACAGGAGAGAGGTC	4749	4768	0	256
532858	n/a	n/a	Intrón 4	TCAAATGTCTGGGAGTGTCA	3479	3498	13	257
532859	n/a	n/a	Intrón 10	AGAAGGAGAATGTGCTGAAA	5801	5820	20	258
532860	n/a	n/a	Intrón 17	TGCTGACCACTTGGCATCTC	7408	7427	20	259

532861	n/a	n/a	Intrón 11	CAACTTTCACAAACCACCAT	6014	6033	18	260
532862	n/a	n/a	Intrón 10	AGCTCTGTGATTCTAAGGTT	5497	5516	15	261
532863	n/a	n/a	Intrón 6- Exón 7	CCACCTGTGGGTGAGGAGAA	4136	4155	16	262
532864	n/a	n/a	Exón 17 - Intrón 17	GAGGACTCACTTGAATGAAA	7373	7392	21	263
532865	n/a	n/a	Intrón 6	TGGAATGATCAGGGAGCTAG	3916	3935	30	264
532866	n/a	n/a	Intrón 5	GTCCCTTCTCCATTTTCCCC	3659	3678	26	265
532867	n/a	n/a	Intrón 7	TCAACTTTTTAAGTTAATCA	4497	4516	14	266
532868	n/a	n/a	Intrón 6	GGGTGAGGAGAACAAGGCGC	4128	4147	21	267

532869	n/a	n/a	Intrón 7	CTTCCAAGCCATCTTTTAAC	4553	4572	5	268
532870	n/a	n/a	Exón 17 - Intrón 17	AGGACTCACTTGAATGAAAC	7372	7391	18	269
532871	n/a	n/a	Intrón 10	TTCCAGGCAACTAGAGCTTC	5412	5431	15	270
532872	n/a	n/a	Exón 1	CAGAGTCCAGCCACTGTTTG	1557	1576	13	271
532873	n/a	n/a	Intrón 17 - Exón 18	CCAACCTGCAGAGGCAGTGG	7638	7657	23	272
532874	n/a	n/a	Intrón 16	TGCAAGGAGAGGAGAAGCTG	7312	7331	10	273
532875	n/a	n/a	Exón 9 - Intrón 9	CTAGGCAGGTTACTCACCCA	5120	5139	21	274

532876	n/a	n/a	Intrón 6-Exón 7	CACCATAACTTGCCACCTGT	4148	4167	41	275
532877	n/a	n/a	Intrón 12	TAGGTACCACCTCTTTGTGG	6363	6382	27	276
532878	n/a	n/a	Intrón 11	CTTGACCTCACCTCCCCCAA	5954	5973	13	277
532879	n/a	n/a	Intrón 12	CCACCTCTTTGTGGGCAGCT	6357	6376	33	278
532880	n/a	n/a	Intrón 11	TTCACAAACCACCATCTCTT	6009	6028	8	279
532881	n/a	n/a	Exón 3 - Intrón 3	TTCTCACCTCCGTTGTCACA	2958	2977	17	280
532882	n/a	n/a	Intrón 12	GAAAGTGGGAGGTGTTGCCT	6225	6244	19	281

532883	n/a	n/a	Intrón 1	ACAGCAGGAAGGGAAGGTTA	2075	2094	34	282
532884	n/a	n/a	Intrón 17	CATGCTGACCACTTGGCATC	7410	7429	18	283
532885	n/a	n/a	Exón 4 - Intrón 4	GGTCACCTTGGCAGGAAGGC	3286	3305	0	284
532886	n/a	n/a	Intrón 8	GTATAGTGTTACAAGTGGAC	4804	4823	13	285
532887	n/a	n/a	Intrón 7	GGACTTCCCTTTGACCACAA	4468	4487	18	286
532888	n/a	n/a	Intrón 11	TCACCTTGACCTCACCTCCC	5958	5977	20	287
532889	n/a	n/a	Intrón 15	TAGAGTGCCTCCTTAGGATG	7035	7054	27	288
532890	n/a	n/a	Intrón 7	TGACTTCAACTTGTGGTCTG	4605	4624	16	289

532891	n/a	n/a	Intrón 10	CAGAGAAGGAGAATGTGCTG	5804	5823	25	290
532892	n/a	n/a	Intrón 14 - Exón 15	AGGGAGCAGCTCTTCCTCTG	6919	6938	47	291
532893	n/a	n/a	Intrón 5 - Exón 6	TGTTCCCCTGGGTGCCAGGA	3710	3729	24	292
532894	n/a	n/a	Intrón 10	GGCCTGGCTGTTTTCAAGCC	5612	5631	15	293
532895	n/a	n/a	Intrón 10 - Exón 11	GACTGGCTTTCATCTGGCAG	5821	5840	25	294
532896	n/a	n/a	Intrón 10	GAAGGCTTTCCAGGCAACTA	5419	5438	19	295
532897	n/a	n/a	Exón 17 - Intrón 17	TCACTTGAATGAAACGACTT	7367	7386	11	296

532898	n/a	n/a	Intrón 1	GGCCCCAAAAGGCCAAGGAG	2106	2125	5	297
532899	n/a	n/a	Intrón 16 - Exón 17	AATCACCTGCAAGGAGAGGA	7319	7338	19	298
532900	n/a	n/a	Intrón 12	GACCTTCAGTTGCATCCTTA	6183	6202	25	299
532901	n/a	n/a	Intrón 1	TGATGAAGCCTGGCCCCAAA	2117	2136	0	300
532902	n/a	n/a	Intrón 12	TAGAAAGTGGGAGGTGTTGC	6227	6246	0	301
532903	n/a	n/a	Intrón 12	CCCATCCCTGACTGGTCTGG	6295	6314	14	302
532904	n/a	n/a	Intrón 8	CCATGGGTATAGTGTTACAA	4810	4829	13	303
532905	n/a	n/a	Intrón 2	GTGTTCTCTTGACTTCCAGG	2586	2605	23	304

532906	n/a	n/a	Intrón 13	GGCCTGCTCCTCACCCCAGT	6597	6616	27	305
532907	n/a	n/a	Intrón 10	GAGGCCTGGCTGTTTTCAAG	5614	5633	32	306
532908	n/a	n/a	Exón 1	GACTCTCCCCTTCAGTACCT	1677	1696	16	307
532909	n/a	n/a	Intrón 8	CATGGGTATAGTGTTACAAG	4809	4828	10	308
532910	n/a	n/a	Intrón 10	GAAGGAGAATGTGCTGAAAA	5800	5819	0	309
532911	n/a	n/a	Intrón 7	TCACCTGGTCTTCCAAGCCA	4562	4581	0	310
532912	n/a	n/a	Intrón 17	CTCCCCAGATAGGAAAGGGA	7391	7410	0	311
532913	n/a	n/a	Exón 17 - Intrón 17	GGACTCACTTGAATGAAACG	7371	7390	0	312

532914	n/a	n/a	Intrón 16 - Exón 17	GGCCGCCAGAATCACCTGCA	7328	7347	30	313
532915	n/a	n/a	Exón 17 - Intrón 17	CTCACTTGAATGAAACGACT	7368	7387	22	314
532916	n/a	n/a	Intrón 13	CTTTCCCAGCCTTTCCTCAG	6569	6588	28	315
532918	n/a	n/a	Intrón 12	AGAAAGTGGGAGGTGTTGCC	6226	6245	3	316
532917	2604	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	7839	7858	90	317

Tabla 128

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers 5-10-5 de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y 2

N.° ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO: 1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	Sitio de inicio SEQ ID NO: 2	Sitio de detención SEQ ID NO: 2	% de inhibición	SEQ ID NO:
532919	n/a	n/a	Exón 1	CCAGGACTCTCCCCTTCAGT	1681	1700	4	318
532920	n/a	n/a	Intrón 6	AGGGAAGGAGGACAGAATAG	3976	3995	25	319
532921	n/a	n/a	Intrón 4	GAAATGAGGTCAAATGTCTG	3488	3507	30	320
532922	n/a	n/a	Intrón 4	GGAGAGTCAGAAATGAGGTC	3497	3516	25	321
532923	n/a	n/a	Intrón 12	GTAGAAAGTGGGAGGTGTTG	6228	6247	26	322

532924	n/a	n/a	Intrón 10	TAGAAAGATCTCTGAAGTGC	5521	5540	24	323
532925	n/a	n/a	Intrón 13	CTGCTCCTCACCCCAGTCCT	6594	6613	26	324
532926	n/a	n/a	Intrón 11	CTACTGGGATTCTGTGCTTA	5927	5946	30	325
532927	n/a	n/a	Intrón 1	CCCAAAAGGCCAAGGAGGGA	2103	2122	13	326
532928	n/a	n/a	Intrón 17	TGACCACTTGGCATCTCCCC	7405	7424	27	327
532929	n/a	n/a	Intrón 16 - Exón 17	CCTGCAAGGAGAGGAGAAGC	7314	7333	29	328
532930	n/a	n/a	Exón 16 - Intrón 16	CTCTCACCTCTGCAAGTATT	7239	7258	44	329

532931	n/a	n/a	Intrón 1	CCCCAAAAG GCCAAGGAG GG	2104	2123	21	330
532932	n/a	n/a	Intrón 7	GTCTTCCAA GCCATCTTT TA	4555	4574	20	331
532933	n/a	n/a	Intrón 8	GTTACAAGT GGACTTAAG GG	4797	4816	30	332
532934	n/a	n/a	Intrón 8 - Exón 9	CCCATGTTG TGCAATCCT GC	5017	5036	30	333
532935	n/a	n/a	Intrón 15	GAGGTGGGA AGCATGGAG AA	7091	7110	17	334
532936	n/a	n/a	Intrón 14	TGCTCCCAC CACTGTCAT CT	6874	6893	21	335
532937	n/a	n/a	Exón 9 - Intrón 9	AGGCAGGTT ACTCACCCA GA	5118	5137	18	336

532938	n/a	n/a	Intrón 11	TACTGGGATTCTGTGCTTAC	5926	5945	15	337
532939	n/a	n/a	Intrón 13	GCCTTTCCCAGCCTTTCCTC	6571	6590	27	338
532940	n/a	n/a	Intrón 8 - Exón 9	GTGCAATCCTGCAGAAGAGA	5009	5028	21	339
532941	n/a	n/a	Intrón 8	ACAGGAGAGAGGTCCCTTCT	4743	4762	20	340
532942	n/a	n/a	Intrón 10	CCCAAAAGGAGAAAGGGAAA	5717	5736	14	341
532943	n/a	n/a	Intrón 2	AAGCCCAGGGTAAATGCTTA	2557	2576	32	342
532944	n/a	n/a	Intrón 1	GATGAAGCCTGGCCCCAAAA	2116	2135	22	343
532945	n/a	n/a	Intrón 10	TGGCAGAGAAGGAGAATGTG	5807	5826	22	344

532946	n/a	n/a	Intrón 13	TTCCCAGCCTTTCCTCAGGG	6567	6586	35	345
532947	n/a	n/a	Intrón 10	GGCAGAGAAGGAGAATGTGC	5806	5825	30	346
532948	n/a	n/a	Intrón 10	ACAGTGCCAGGAAACAAGAA	5471	5490	25	347
532949	n/a	n/a	Exón 9 - Intrón 9	TAGGCAGGTTACTCACCCAG	5119	5138	22	348
532950	n/a	n/a	Intrón 2	TTCTCTTGACTTCCAGGGCT	2583	2602	22	349
532951	n/a	n/a	Intrón 13	CCTGCTCCTCACCCCAGTCC	6595	6614	16	350
532953	n/a	n/a	Intrón 7	TCCCACTAACCTCCATTGCC	4422	4441	14	351
532954	n/a	n/a	Intrón 7	TTCCCTTTGACCACAAAGTG	4464	4483	16	352

532955	n/a	n/a	Intrón 9	CTGGGTCCTAGGCAGGTTAC	5127	5146	30	353
532956	n/a	n/a	Intrón 10	TCCAGGCAACTAGAGCTTCA	5411	5430	20	354
532957	n/a	n/a	Intrón 8 - Exón 9	GCCCATGTTGTGCAATCCTG	5018	5037	45	355
532958	n/a	n/a	Intrón 7	GGTTCCCACTAACCTCCATT	4425	4444	18	356
532959	n/a	n/a	Intrón 3	AGGTAGAGAGCAAGAGTTAC	3052	3071	26	357
532960	n/a	n/a	Intrón 7	CCACTAACCTCCATTGCCCA	4420	4439	10	358
532961	n/a	n/a	Intrón 11	TCACAAACCACCATCTCTTA	6008	6027	40	359
532962	n/a	n/a	Exón 9 - Intrón 9	TACTCACCCAGATAATCCTC	5110	5129	27	360

532963	n/a	n/a	Intrón 13	TGCTCCTCACCCCAGTCCTC	6593	6612	24	361
532964	n/a	n/a	Intrón 15 - Exón 16	TCTCACAGCTGCCTTTCTGT	7115	7134	25	362
532965	n/a	n/a	Exón 17 - Intrón 17	GAAAGGGAGGACTCACTTGA	7379	7398	11	363
532966	n/a	n/a	Intrón 7	CCATCTTTTAACCCCAGAGA	4545	4564	18	364
532967	n/a	n/a	Intrón 13	TCCTCACCCCAGTCCTCCAG	6590	6609	27	365
532968	n/a	n/a	Intrón 10	CTGGCAGAGAAGGAGAATGT	5808	5827	15	366
532969	n/a	n/a	Intrón 17	TCTCCCCAGATAGGAAAGGG	7392	7411	23	367

532970	n/a	n/a	Intrón 14	ACTTCAGCTGCTCCCACCAC	6882	6901	18	368
532971	n/a	n/a	Intrón 1	GACAGCAGGAAGGGAAGGTT	2076	2095	13	369
532972	n/a	n/a	Intrón 13 - Exón 14	GGAGACAAATGGGCCTATAA	6640	6659	33	370
532973	n/a	n/a	Intrón 14	CTGCTCCCACCACTGTCATC	6875	6894	11	371
532974	n/a	n/a	Intrón 10	AGGAATGAAGAAGGCTTTCC	5428	5447	21	372
532975	n/a	n/a	Intrón 14	GGGATCTCATCCTTATCCTC	6741	6760	31	373
532976	n/a	n/a	Intrón 9	GTGCTGGGTCCTAGGCAGGT	5130	5149	16	374
532977	n/a	n/a	Intrón 1	CAAAAGGCCAAGGAGGGATG	2101	2120	14	375

532978	n/a	n/a	Intrón 17	CCATGCTGACCACTTGGCAT	7411	7430	20	376
532979	n/a	n/a	Intrón 8	GGAGGCTGGGACAGGAGAGA	4753	4772	25	377
532980	n/a	n/a	Intrón 14 - Exón 15	GGAGCAGCTCTTCCTCTGGA	6917	6936	36	378
532981	n/a	n/a	Exón 3 - Intrón 3	TCTCACCTCCGTTGTCACAG	2957	2976	20	379
532982	n/a	n/a	Intrón 13	CAGTCCTCCAGCCTTTCCCA	6581	6600	21	380
532983	n/a	n/a	Intrón 13	AGTCCTCCAGCCTTTCCCAG	6580	6599	22	381
532984	n/a	n/a	Intrón 4 - Exón 5	TGAAGGAGTCTGGGAGAGTC	3509	3528	12	382

532985	n/a	n/a	Intrón 16 - Exón 17	CAGAATCACCTGCAAGGAGA	7322	7341	20	383
532986	n/a	n/a	Exón 17 - Intrón 17	TAGGAAAGGGAGGACTCACT	7382	7401	3	384
532987	n/a	n/a	Exón 4 - Intrón 4	ACCTTGGCAGGAAGGCTCCG	3282	3301	12	385
532988	n/a	n/a	Intrón 13 - Exón 14	GAGACAAATGGGCCTATAAA	6639	6658	15	386
532989	n/a	n/a	Intrón 1	CTGAAGAGAAAGGCTGATGA	2131	2150	17	387
532990	n/a	n/a	Intrón 6	AATGATCAGGGAGCTAGTCC	3913	3932	30	388
532991	n/a	n/a	Intrón 17	CTTAGCTGACCTAAAGGAAT	7557	7576	22	389

532992	n/a	n/a	Intrón 8	TGGGTATAGTGTTACAAGTG	4807	4826	17	390
532993	n/a	n/a	Intrón 1	TGAAGAGAAAGGCTGATGAA	2130	2149	19	391
532994	n/a	n/a	Intrón 8	GTGTTACAAGTGGACTTAAG	4799	4818	25	392
532995	n/a	n/a	Intrón 6	ACCTGTGGGTGAGGAGAACA	4134	4153	24	393
532996	n/a	n/a	Exón 9 - Intrón 9	TCACCCAGATAATCCTCCCT	5107	5126	36	394
532952	2608	2627	Exón 18	TGTTGTCGCAGCTGTTTTAA	7843	7862	90	395

Ejemplo 116: Inhibición antisentido del Factor B del Complemento (CFB) humano en células HepG2 mediante gapmers de

MOE

Se diseñaron oligonucleótidos antisentido adicionales para dirigirse a un ácido nucleico del Factor B del Complemento (CFB) humano y se analizaron para ver sus efectos en el ARNm de CFB in vitro. Las células HepG2 cultivadas a una densidad de 20.000 células por pocillo se transfectaron utilizando electroporación con 4500 nM de oligonucleótido antisentido. Luego de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, el ARN se aisló de las células y los niveles de ARNm de CFB se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó el conjunto de cebador y sonda humano RTS3460_MGB (secuencia directa CGAAGCAGCTCAATGAAATCAA, denominada en la presente SEQ ID NO: 813; secuencia inversa TGCCTGGAGGGCCTTCTT, denominada en la presente SEQ ID NO: 814; secuencia de sonda AGACCACAAGTTGAAGTC, denominada en la presente SEQ ID NO: 815) para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de CFB se ajustaron de acuerdo con el contenido de ARN total, tal como se midió con RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB, con respecto a las células de control no tratadas.

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos recientemente diseñados en las Tablas que figuran más adelante se diseñaron como gapmers 5-10-5 de MOE. Los gapmers de MOE 5-10-5 tienen

una longitud de 20 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende diez 2'-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprenden cinco nucleósidos cada una. Cada nucleósido en el segmento de ala 5' y cada nucleósido en el segmento de ala 3' tiene una modificación 2'-MOE. Los enlaces internucleósidos en cada gapmer son enlaces de fosforotioato (P=S). Todos los residuos de citosina en cada gapmer son 5-metilcitosinas. "Sitio de inicio" indica el nucleósido más cercano a 5' al cual el gapmer se dirige en la secuencia génica humana. "Sitio de detención" indica el nucleósido más cercano a 3' al cual el gapmer se dirige en la secuencia génica humana. Cada gapmer enumerado en las Tablas que figuran más adelante se dirige ya sea al ARNm de CFB humano, designado en la presente como SEQ ID NO: 1 (n.° de acceso GENBANK NM_001710.5) o a la secuencia genómica de CFB, denominada en la presente como SEQ ID NO: 2 (n.° de acceso GENBANK NT_007592.15 truncada a partir de los nucleótidos 31852000 a 31861000), o ambos. "n/a" indica que el oligonucleótido antisentido no se dirige a esa secuencia génica particular con 100 % de complementariedad.

Tabla 129

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers 5-10-5 de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1 y 2

N.° ISIS	Sitio de ini-cio SEQ ID NO: 1	Sitio de deten ción SEQ ID NO:1	Región objeti vo	Secuencia	% de inhi bi-ción	Sitio de ini-cio SEQ ID NO: 2	Sitio de deten ción SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO:
532686	1135	1154	Exón 6	ACACTTTTTGGCTCCTGTGA	48	3819	3838	84
532687	1141	1160	Exón 6	GACTAGACACTTTTTGGCTC	63	3825	3844	85
532688	1147	1166	Exón 6	TAAGTTGACTAGACACTTTT	47	3831	3850	86
532689	1153	1172	Exón 6	CTCAATTAAGTTGACTAGAC	57	3837	3856	87
532690	1159	1178	Unión del Exón 6-7	CACCTTCTCAATTAAGTTGA	49	3843	3862	88

532691	1165	1184	Unión del Exón 6-7	ACTTGCCACCTTCTCAATTA	33	n/a	n/a	89
532692	1171	1190	Unión del Exón 6-7	ACCATAACTTGCCACCTTCT	67	n/a	n/a	90
532693	1177	1196	Exón 7	CTTCACACCATAACTTGCCA	56	4153	4172	91
532694	1183	1202	Exón 7	TCTTGGCTTCACACCATAAC	50	4159	4178	92
532695	1208	1227	Exón 7	ATGTGGCATATGTCACTAGA	53	4184	4203	93
532696	1235	1254	Exón 7	CAGACACTTTGACCCAAATT	52	4211	4230	94
532697	1298	1317	Unión del Exón 7-8	GGTCTTCATAATTGATTTCA	59	n/a	n/a	95

532698	1304	1323	Unión del Exón 7-8	ACTTGTGGTCTTCATAATTG	52	n/a	n/a	96
532699	1310	1329	Unión del Exón 7-8	ACTTCAACTTGTGGTCTTCA	85	n/a	n/a	97
532700	1316	1335	Exón 8	TCCCTGACTTCAACTTGTGG	96	4609	4628	98
532701	1322	1341	Exón 8	TGTTAGTCCCTGACTTCAAC	56	4615	4634	99
532702	1328	1347	Exón 8	TCTTGGTGTTAGTCCCTGAC	86	4621	4640	100
532703	1349	1368	Exón 8	TGTACACTGCCTGGAGGGCC	35	4642	4661	101
532704	1355	1374	Exón 8	TCATGCTGTACACTGCCTGG	12	4648	4667	102

532705	1393	1412	Exón 8	GTTCCAGCCTTCAGGAGGGA	27	4686	4705	103
532706	1399	1418	Exón 8	GGTGCGGTTCCAGCCTTCAG	67	4692	4711	104
532707	1405	1424	Exón 8	ATGGCGGGTGCGGTTCCAGC	26	4698	4717	105
532708	1411	1430	Exón 8	GATGACATGGCGGGTGCGGT	28	4704	4723	106
532709	1417	1436	Exón 8	GAGGATGATGACATGGCGGG	6	4710	4729	107
532710	1443	1462	Unión del Exón 8-9	CCCATGTTGTGCAATCCATC	35	n/a	n/a	108
532711	1449	1468	Exón 9	TCCCCGCCCATGTTGTGCAA	28	5023	5042	109

	532712	1455	1474	Exón 9	ATTGGGTCCCCGCCCATGTT	19	5029	5048	110
	532713	1461	1480	Exón 9	ACAGTAATTGGGTCCCCGCC	29	5035	5054	111
	532714	1467	1486	Exón 9	TCAATGACAGTAATTGGGTC	49	5041	5060	112
	532715	1473	1492	Exón 9	ATCTCATCAATGACAGTAAT	45	5047	5066	113
	532716	1479	1498	Exón 9	TCCCGGATCTCATCAATGAC	54	5053	5072	114
	532717	1533	1552	Unión del Exón 9-10	ACATCCAGATAATCCTCCCT	22	n/a	n/a	115
	532718	1539	1558	Unión del Exón 9-10	ACATAGACATCCAGATAATC	8	n/a	n/a	116

532719	1545	1564	Unión del Exón 9-10	CCAAACACATAGACATCCAG	30	n/a	n/a	117
532720	1582	1601	Exón 10	AGCATTGATGTTCACTTGGT	62	5231	5250	118
532721	1588	1607	Exón 10	AGCCAAAGCATTGATGTTCA	46	5237	5256	119
532722	1594	1613	Exón 10	CTTGGAAGCCAAAGCATTGA	35	5243	5262	120
532723	1600	1619	Exón 10	GTCTTTCTTGGAAGCCAAAG	43	5249	5268	121
532724	1606	1625	Exón 10	CTCATTGTCTTTCTTGGAAG	40	5255	5274	122
532725	1612	1631	Exón 10	ATGTTGCTCATTGTCTTTCT	49	5261	5280	123
532726	1618	1637	Exón 10	GAACACATGTTGCTCATTGT	68	5267	5286	124

532727	1624	1643	Exón 10	GACTTTGAACACATGTTGCT	54	5273	5292	125
532728	1630	1649	Exón 10	ATCCTTGACTTTGAACACAT	61	5279	5298	126
532729	1636	1655	Exón 10	TTCCATATCCTTGACTTTGA	55	5285	5304	127
532730	1642	1661	Exón 10	CAGGTTTTCCATATCCTTGA	51	5291	5310	440
532731	1686	1705	Unión del Exón 10-11	CTCAGAGACTGGCTTTCATC	41	5827	5846	129
532732	1692	1711	Exón 11	CAGAGACTCAGAGACTGGCT	59	5833	5852	130
516252	1698	1717	Exón 11	ATGCCACAGAGACTCAGAGA	57	5839	5858	131
532733	1704	1723	Exón 11	CAAACCATGCCACAGAGACT	34	5845	5864	132

532734	1710	1729	Exón 11	TGTTCCCA AACCATGC CACA	51	5851	5870	133
532735	1734	1753	Exón 11	TTGTGGTA ATCGGTAC CCTT	50	5875	5894	134
532736	1740	1759	Exón 11	GGTTGCTT GTGGTAAT CGGT	64	5881	5900	135
532737	1746	1765	Exón 11	TGCCATGG TTGCTTGT GGTA	40	5887	5906	136
532738	1752	1771	Exón 11	TTGGCCTG CCATGGTT GCTT	49	5893	5912	137
532739	1758	1777	Exón 11	GAGATCTT GGCCTGCC ATGG	47	5899	5918	138
532740	1803	1822	Exón 12	ACAGCCCC CATACAGC TCTC	48	6082	6101	139
532741	1809	1828	Exón 12	GACACCAC AGCCCCCA TACA	40	6088	6107	140

532742	1815	1834	Exón 12	TACTCAGACACCACAGCCCC	33	6094	6113	141
532743	1821	1840	Exón 12	ACAAAGTACTCAGACACCAC	39	6100	6119	142
532744	1827	1846	Exón 12	GTCAGCACAAAGTACTCAGA	45	6106	6125	143
532745	1872	1891	Exón 12	TTGATTGAGTGTTCCTTGTC	42	6151	6170	144
532746	1878	1897	Exón 12	CTGACCTTGATTGAGTGTTC	53	6157	6176	145
532747	1909	1928	Exón 13	TATCTCCAGGTCCCGCTTCT	31	6403	6422	146
532748	1967	1986	Exón 13	GAATTCCTGCTTCTTTTTTC	30	6461	6480	147
532749	1973	1992	Exón 13	ATTCAGGAATTCCTGCTTCT	40	6467	6486	148

532750	1979	1998	Exón 13	CATAAAATTCAGGAATTCCT	45	6473	6492	149
532751	1985	2004	Exón 13	CATAGTCATAAAATTCAGGA	43	6479	6498	150
532752	2006	2025	Exón 13	TGAGCTTGATCAGGGCAACG	61	6500	6519	151
532753	2012	2031	Exón 13	TATTCTTGAGCTTGATCAGG	47	6506	6525	152
532754	2048	2067	Unión del Exón 13-14	GACAAATGGGCCTGATAGTC	35	n/a	n/a	153
532755	2070	2089	Exón 14	GTTGTTCCCTCGGTGCAGGG	43	6659	6678	154
532756	2076	2095	Exón 14	GCTCGAGTTGTTCCCTCGGT	51	6665	6684	155

532757	2082	2101	Exón 14	CTCAAAGC TCGAGTTG TTCC	36	6671	6690	156
532758	2088	2107	Exón 14	GGAAGCCT CAAAGCTC GAGT	54	6677	6696	157
532759	2094	2113	Exón 14	GTTGGAGG AAGCCTCA AAGC	52	6683	6702	158
532760	2100	2119	Exón 14	GTGGTAGT TGGAGGAA GCCT	22	6689	6708	159
532761	2106	2125	Exón 14	TGGCAAGT GGTAGTTG GAGG	34	6695	6714	160
532762	2112	2131	Exón 14	TGTTGCTG GCAAGTGG TAGT	52	6701	6720	161

Ejemplo 117: Inhibición antisentido del Factor B del Complemento (CFB) humano en células HepG2 mediante gapmers de MOE

Se diseñaron oligonucleótidos antisentido adicionales para dirigirse a un ácido nucleico del Factor B del Complemento

(CFB) humano y se analizaron para ver sus efectos en el ARNm de CFB in vitro. Los oligonucleótidos antisentido se analizaron en una serie de experimentos que tenían condiciones de cultivo similares. Los resultados de cada experimento se presentan en tablas separadas que se muestran más adelante. Las células HepG2 cultivadas a una densidad de 20.000 células por pocillo se transfectaron utilizando electroporación con 5000 nM de oligonucleótido antisentido. Luego de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, el ARN se aisló de las células y los niveles de ARNm de CFB se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó un conjunto de cebador y sonda de RTS3459 humano para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de CFB se ajustaron de acuerdo con el contenido de ARN total, tal como se midió con RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB, con respecto a las células de control no tratadas.

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos recientemente diseñados en las Tablas que figuran más adelante se diseñaron como gapmers 5-10-5 de MOE. Los gapmers tienen una longitud de 20 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende diez 2’-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que

comprenden cinco nucleósidos cada una. Cada nucleósido en el segmento de ala 5’ y cada nucleósido en el segmento de ala 3’ tiene una modificación 2'-MOE. Los enlaces internucleósidos en cada gapmer son enlaces de fosforotioato (P=S). Todos los residuos de citosina en cada gapmer son 5-metilcitosinas. "Sitio de inicio" indica el nucleósido más cercano a 5’ al cual el gapmer se dirige en la secuencia génica humana. "Sitio de detención" indica el nucleósido más cercano a 3’ al cual el gapmer se dirige en la secuencia génica humana. Cada gapmer enumerado en las Tablas que figuran más adelante se dirige ya sea al ARNm de CFB humano, designado en la presente como SEQ ID NO: 1 (n.° de acceso GENBANK NM_001710.5) o a la secuencia genómica de CFB, denominada en la presente como SEQ ID NO: 2 (n.° de acceso GENBANK NT_007592.15 truncada a partir de los nucleótidos 31852000 a 31861000), o ambos. "n/a" indica que el oligonucleótido antisentido no se dirige a esa secuencia génica particular con 100 % de complementariedad. En caso de que no se muestre la alineación de la secuencia para un gen objetivo en una tabla particular, se entiende que ninguno de los oligonucleótidos presentados en esa tabla se alinea con un 100 % de complementariedad con ese gen objetivo.

Tabla 130

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers 5-10-5 de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1

N.° ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO: 1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	% de inhibición	SEQ ID NO:
588570	150	169	Exón 1	TGGTCACATTCCCT TCCCCT	54	396
588571	152	171	Exón 1	CCTGGTCACATTCC CTTCCC	63	397
532614	154	173	Exón 1	GACCTGGTCACATT CCCTTC	64	12
588572	156	175	Exón 1	TAGACCTGGTCACA TTCCCT	62	398
588573	158	177	Exón 1	CCTAGACCTGGTCA CATTCC	53	399
588566	2189	2208	Exón 15	CCTTCCGAGTCAGC TTTTTC	60	400

588567	2191	2210	Exón 15	CTCCTTCCGAGTCA GCTTTT	61	401
532770	2193	2212	Exón 15	ACCTCCTTCCGAGT CAGCTT	77	198
588568	2195	2214	Exón 15	AGACCTCCTTCCGA GTCAGC	72	402
588569	2197	2216	Exón 15	GTAGACCTCCTTCC GAGTCA	46	403
588574	2453	2472	Exón 18	TTTGCCGCTTCTGG TTTTTG	46	404
588575	2455	2474	Exón 18	CTTTTGCCGCTTCT GGTTTT	41	405
532800	2457	2476	Exón 18	TGCTTTTGCCGCTT CTGGTT	69	228
588576	2459	2478	Exón 18	CCTGCTTTTGCCGC TTCTGG	61	406
588577	2461	2480	Exón 18	TACCTGCTTTTGCC GCTTCT	51	407
516350	2550	2569	Exón 18	AGAAAACCCAAATC CTCATC	71	408
588509	2551	2570	Exón 18	TAGAAAACCCAAAT CCTCAT	58	409

588510	2552	2571	Exón 18	ATAGAAAACCCAAA TCCTCA	57	410
588511	2553	2572	Exón 18	TATAGAAAACCCAA ATCCTC	57	411
588512	2554	2573	Exón 18	TTATAGAAAACCCA AATCCT	44	412
588513	2555	2574	Exón 18	CTTATAGAAAACCC AAATCC	37	413
588514	2556	2575	Exón 18	CCTTATAGAAAACC CAAATC	50	414
588515	2557	2576	Exón 18	CCCTTATAGAAAAC CCAAAT	45	415
588516	2558	2577	Exón 18	CCCCTTATAGAAAA CCCAAA	60	416
588517	2559	2578	Exón 18	ACCCCTTATAGAAA ACCCAA	67	417
588518	2560	2579	Exón 18	AACCCCTTATAGAA AACCCA	57	418
588519	2561	2580	Exón 18	AAACCCCTTATAGA AAACCC	61	419
588520	2562	2581	Exón 18	GAAACCCCTTATAG AAAACC	27	420
588521	2563	2582	Exón 18	GGAAACCCCTTATA GAAAAC	25	421

588522	2564	2583	Exón 18	AGGAAACCCCTTAT AGAAAA	36	422
588523	2565	2584	Exón 18	CAGGAAACCCCTTA TAGAAA	36	423
588524	2566	2585	Exón 18	GCAGGAAACCCCTT ATAGAA	46	424
588525	2567	2586	Exón 18	AGCAGGAAACCCCT TATAGA	38	425
588526	2568	2587	Exón 18	CAGCAGGAAACCCC TTATAG	47	426
588527	2569	2588	Exón 18	CCAGCAGGAAACCC CTTATA	68	427
588528	2570	2589	Exón 18	TCCAGCAGGAAACC CCTTAT	63	428
532809	2571	2590	Exón 18	GTCCAGCAGGAAAC CCCTTA	85	237
588529	2572	2591	Exón 18	TGTCCAGCAGGAAA CCCCTT	76	429
588530	2573	2592	Exón 18	CTGTCCAGCAGGAA ACCCCT	74	430
588531	2574	2593	Exón 18	CCTGTCCAGCAGGA AACCCC	75	431
588532	2575	2594	Exón 18	CCCTGTCCAGCAGG AAACCC	73	432

588533	2576	2595	Exón 18	CCCCTGTCCAGCAG GAAACC	82	433
532810	2577	2596	Exón 18	GCCCCTGTCCAGCA GGAAAC	88	238
588534	2578	2597	Exón 18	CGCCCCTGTCCAGC AGGAAA	86	434
588535	2579	2598	Exón 18	ACGCCCCTGTCCAG CAGGAA	86	435
588536	2580	2599	Exón 18	CACGCCCCTGTCCA GCAGGA	93	436
588537	2581	2600	Exón 18	CCACGCCCCTGTCC AGCAGG	92	437
588538	2582	2601	Exón 18	CCCACGCCCCTGTC CAGCAG	94	438
588539	2583	2602	Exón 18	TCCCACGCCCCTGT CCAGCA	96	439
588540	2584	2603	Exón 18	ATCCCACGCCCCTG TCCAGC	88	440
588541	2585	2604	Exón 18	AATCCCACGCCCCT GTCCAG	79	441
588542	2586	2605	Exón 18	CAATCCCACGCCCC TGTCCA	83	442
588543	2587	2606	Exón 18	TCAATCCCACGCCC CTGTCC	86	443

588544	2588	2607	Exón 18	TTCAATCCCACGCC CCTGTC	90	444
588545	2589	2608	Exón 18	ATTCAATCCCACGC CCCTGT	92	445
588546	2590	2609	Exón 18	AATTCAATCCCACG CCCCTG	92	446
588547	2591	2610	Exón 18	TAATTCAATCCCAC GCCCCT	88	447
588548	2592	2611	Exón 18	TTAATTCAATCCCA CGCCCC	93	448
588549	2593	2612	Exón 18	TTTAATTCAATCCC ACGCCC	88	449
588550	2594	2613	Exón 18	TTTTAATTCAATCC CACGCC	89	450
588551	2595	2614	Exón 18	GTTTTAATTCAATC CCACGC	94	451
588552	2596	2615	Exón 18	TGTTTTAATTCAAT CCCACG	93	452
588553	2597	2616	Exón 18	CTGTTTTAATTCAA TCCCAC	96	453
588554	2598	2617	Exón 18	GCTGTTTTAATTCA ATCCCA	98	454

532811	2599	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTC AATCCC	97	239
532811	2599	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTC AATCCC	95	239
588555	2600	2619	Exón 18	CAGCTGTTTTAATT CAATCC	93	455
588556	2601	2620	Exón 18	GCAGCTGTTTTAAT TCAATC	96	456
588557	2602	2621	Exón 18	CGCAGCTGTTTTAA TTCAAT	98	457
588558	2603	2622	Exón 18	TCGCAGCTGTTTTA ATTCAA	95	458
532917	2604	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTT AATTCA	97	317
588559	2605	2624	Exón 18	TGTCGCAGCTGTTT TAATTC	95	459
588560	2606	2625	Exón 18	TTGTCGCAGCTGTT TTAATT	92	460
588561	2607	2626	Exón 18	GTTGTCGCAGCTGT TTTAAT	93	461
532952	2608	2627	Exón 18	TGTTGTCGCAGCTG TTTTAA	88	395

588562	2609	2628	Exón 18/ Repetición	TTGTTGTCGCAGCTGTTTTA	90	462
588563	2610	2629	Exón 18/ Repetición	TTTGTTGTCGCAGCTGTTTT	89	463
588564	2611	2630	Exón 18/ Repetición	TTTTGTTGTCGCAGCTGTTT	92	464
588565	2612	2631	Exón 18/ Repetición	TTTTTGTTGTCGCAGCTGTT	88	465

Tabla 131

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers 5-10-5 de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2

N.° ISIS	Sitio de inicio de SEQ ID NO:1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio SEQ ID NO:2	Sitio de detención SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO:
588685	n/a	n/a	Exón 1	GGATCCAGCTCACTCCCCTG	48	1596	1615	466
588686	n/a	n/a	Exón 1	AAATAAGGATCCAGCTCACT	29	1602	n/a	467
588688	n/a	n/a	Exón 1	GACCAGAAATAAGGATCCAG	58	1608	1627	468
588690	n/a	n/a	Exón 1	CTTAGGGACCAGAAATAAGG	45	1614	1633	469
588692	n/a	n/a	Exón 1	CACCCACTTAGGGACCAGAA	36	1620	1639	470

588694	n/a	n/a	Exón 1	ACCACCCACTTAGGGACCAG	47	1622	1641	471
588696	n/a	n/a	Exón 1	AGGTCCAGGACTCTCCCCTT	96	1685	1704	472
588698	n/a	n/a	Exón 1	AAGGTCCAGGACTCTCCCCT	96	1686	1705	473
588700	n/a	n/a	Exón 1	AAACTGCAGAAGTCCCACCC	2	1716	1735	474
588586	30	49	Exón 1	GGAGGGCCCCGCTGAGCTGC	59	1751	1770	475
588587	48	67	Exón 1	TCCCGGAACATCCAAGCGGG	45	1769	1788	476
588588	56	75	Exón 1	CATCACTTTCCCGGAACATC	39	1777	n/a	477
588589	151	170	Exón 1	CTGGTCACATTCCCTTCCCC	29	1872	1891	478

588590	157	176	Exón 1	CTAGACCTGGTCACATTCCC	47	1878	1897	479
588591	339	358	Unión del Exón 1-2	GGAGTGGTGGTCACACCTCC	44	n/a	n/a	480
588592	384	403	Exón 2	ACCCCCTCCAGAGAGCAGGA	43	2192	2211	481
588593	390	409	Exón 2	ATCTCTACCCCCTCCAGAGA	34	2198	2217	482
588594	467	486	Exón 2	GGTACGGGTAGAAGCCAGAA	17	2275	2294	483
588595	671	690	Exón 3	GGAGAGTGTAACCGTCATAG	37	2879	2898	484
588596	689	708	Exón 3	TGCGATTGGCAGAGCCCCGG	18	2897	2916	485
588597	695	714	Exón 3	GGCAGGTGCGATTGGCAGAG	32	2903	2922	486

588598	707	726	Exón 3	GGCCATTCACTTGGCAGGTG	45	2915	2934	487
588599	738	757	Exón 3	TTGTCACAGATCGCTGTCTG	52	2946	2965	488
588600	924	943	E Unión del Exón xón 4-5	AAGGAGTCTTGGCAGGAAGG	39	n/a	n/a	489
588601	931	950	Unión del Exón 4-5	GTACATGAAGGAGTCTTGGC	37	n/a	n/a	490
588602	959	978	Exón 5	AAGCTTCGGCCACCTCTTGA	21	3542	3561	491
588603	1089	1108	Exón 6	CCATCTAGCACCAGGTAGAT	22	3773	3792	492

588604	1108	1127	Exón 6	GGCCCCAATGCTGTCTGATC	21	3792	3811	493
588606	1150	1169	Exón 6	AATTAAGTTGACTAGACACT	56	3834	3853	494
588608	1162	1181	Unión del Exón 6-7	TGCCACCTTCTCAATTAAGT	50		19	495
588578	1167	1186	Unión del Exón 6-7	TAACTTGCCACCTTCTCAAT	23	n/a	n/a	496
588579	1169	1188	Unión del Exón 6-7	CATAACTTGCCACCTTCTCA	23	n/a	n/a	497
532692	1171	1190	Unión del Exón 6-7	ACCATAACTTGCCACCTTCT	15	n/a	n/a	90

588580	1173	1192	Unión del Exón 6-7	ACACCATAACTTGCCACCTT	16	n/a	n/a	498
588581	1175	1194	Unión del Exón 6-7	TCACACCATAACTTGCCACC	14	4151	4170	499
588610	1319	1338	Exón 8	TAGTCCCTGACTTCAACTTG	50	4612	4631	500
588612	1325	1344	Exón 8	TGGTGTTAGTCCCTGACTTC	47	4618	4637	501
588614	1396	1415	Exón 8	GCGGTTCCAGCCTTCAGGAG	47	4689	4708	502
588616	1421	1440	Exón 8	TCATGAGGATGATGACATGG	51	4714	4733	503
588618	1446	1465	Exón 9	CCGCCCATGTTGTGCAATCC	18	5020	5039	504

588620	1458	1477	Exón 9	GTAATTGGGTCCCCGCCCAT	40	5032	5051	505
588623	1482	1501	Exón 9	AAGTCCCGGATCTCATCAAT	40	5056	5075	506
588624	1542	1561	Unión del Exón 9-10	AACACATAGACATCCAGATA	45	n/a	n/a	507
588626	1585	1604	Exón 10	CAAAGCATTGATGTTCACTT	43	5234	5253	508
588628	1621	1640	Exón 10	TTTGAACACATGTTGCTCAT	45	5270	5289	509
588631	1646	1665	Exón 10	CTTCCAGGTTTTCCATATCC	53	5295	5314	510
588632	1647	1666	Exón 10	TCTTCCAGGTTTTCCATATC	56	5296	5315	511

588634	1689	1708	Exón 11	AGACTCAGAGACTGGCTTTC	35	5830	5849	512
588636	1749	1768	Exón 11	GCCTGCCATGGTTGCTTGTG	55	5890	5909	513
588638	1763	1782	Exón 11	TGACTGAGATCTTGGCCTGC	78	5904	5923	514
588640	1912	1931	Exón 13	TTCTATCTCCAGGTCCCGCT	95	6406	6425	515
588642	1982	2001	Exón 13	AGTCATAAAATTCAGGAATT	44	6476	6495	516
588645	2073	2092	Exón 14	CGAGTTGTTCCCTCGGTGCA	40	6662	6681	517
588646	2085	2104	Exón 14	AGCCTCAAAGCTCGAGTTGT	57	6674	6693	518
588648	2091	2110	Exón 14	GGAGGAAGCCTCAAAGCTCG	48	6680	6699	519

588651	2097	2116	Exón 14	GTAGTTGGAGGAAGCCTCAA	40	6686	6705	520
588652	2103	2122	Exón 14	CAAGTGGTAGTTGGAGGAAG	43	6692	6711	521
588654	2166	2185	Exón 15	TCCTCAGACACAAACAGAGC	13	6954	6973	522
588656	2172	2191	Exón 15	TTCTCCTCCTCAGACACAAA	55	6960	6979	523
588658	2196	2215	Exón 15	TAGACCTCCTTCCGAGTCAG	44	6984	7003	524
588660	2202	2221	Exón 15	TTGATGTAGACCTCCTTCCG	50	6990	7009	525
588582	2219	2238	Unión del Exón 15-16	CTTTCTTATCCCCATTCTTG	19	n/a	n/a	526

588583	2221	2240	Unión del Exón 15-16	GCCTTTCTTATCCCCATTCT	14	n/a	n/a	527
532775	2223	2242	Unión del Exón 15-16	CTGCCTTTCTTATCCCCATT	3	n/a	n/a	203
588584	2225	2244	Unión del Exón 15-16	AGCTGCCTTTCTTATCCCCA	18	n/a	n/a	528
588662	2226	2245	Unión del Exón 15-16	CAGCTGCCTTTCTTATCCCC	27	n/a	n/a	529
588585	2227	2246	Unión del Exón 15-16	ACAGCTGCCTTTCTTATCCC	59	n/a	n/a	530
588664	2238	2257	Exón 16	GCATCTCTCTCACAGCTGCC	49	7122	7141	531

588666	2276	2295	Exón 16	AGATGTCCTTGACTTTGTCA	41	7160	7179	532
588668	2330	2349	Exón 16	CAGCATAGGGACTCACTCCT	41	7214	7233	533
588670	2361	2380	Unión del Exón 16-17	CCGCCAGAATCACCTCTGCA	43	n/a	n/a	534
588672	2397	2416	Exón 17	TGAATGAAACGACTTCTCTT	52	7362	7381	535
588674	2430	2449	Exón 18	ACATCCACTACTCCCCAGCT	39	7665	7684	536
588676	2448	2467	Exón 18	CGCTTCTGGTTTTTGCAGAC	69	7683	7702	537
588678	2454	2473	Exón 18	TTTTGCCGCTTCTGGTTTTT	46	7689	7708	538

588680	2466	2485	Exón 18	GCAGGTACC TGCTTTTGC CG	47	7701	7720	539
588682	2532	2551	Exón 18	TCTTGGAGT TTCTCCTTC AG	58	7767	7786	540
532811	2599	2618	Exón 18	AGCTGTTTT AATTCAATC CC	10	7834	7853	239
532917	2604	2623	Exón 18	GTCGCAGCT GTTTTAATT CA	11	7839	7858	317

Ejemplo 118: Inhibición antisentido del Factor B del Complemento (CFB) humano en células HepG2 mediante gapmers de MOE

Los oligonucleótidos antisentido se diseñaron para dirigirse a un ácido nucleico del Factor B del Complemento (CFB) humano y se analizaron para ver sus efectos en el ARNm de CFB in vitro. Los oligonucleótidos antisentido se analizaron en una serie de experimentos que tenían condiciones de cultivo similares. Los resultados de cada experimento se presentan en tablas separadas que se muestran más adelante. Las células

HepG2 cultivadas a una densidad de 20.000 células por pocillo se transfectaron utilizando electroporación con 3000 nM de oligonucleótido antisentido. Luego de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, el ARN se aisló de las células y los niveles de ARNm de CFB se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó un conjunto de cebador y sonda de RTS3459 humano para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de CFB se ajustaron de acuerdo con el contenido de ARN total, tal como se midió con RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB, con respecto a las células de control no tratadas.

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos recientemente diseñados en lad Tablss a continuación se diseñaron como gapmers 4-8-5 MOE, 5-9-5 MOE, 5-10-5 MOE, 3-10-4 MOE, 3-10-7 MOE, 6-7-6- MOE, 6-8-6 MOE o 5-7-5 MOE, o como oligonucleótidos desoxi, MOE, y (S)-cEt.

Los gapmers 4-8-5 de MOE tienen una longitud de 17 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende ocho 2’-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprenden cuatro y cinco nucleósidos, respectivamente. Los gapmers 5-9-5 de MOE tienen una longitud de 19 nucleósidos,

donde el segmento intermedio central comprende nueve 2’-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprende cinco nucleósidos cada una. Los gapmers de MOE 5-10-5 tienen una longitud de 20 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende diez 2’-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprenden cinco nucleósidos cada una. Los gapmers 5-7-5 de MOE tienen una longitud de 17 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende siete 2’-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprende cinco nucleósidos cada una. Los gapmers de MOE 3-10-4 tienen una longitud de 17 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende diez 2’-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprenden tres y cuatro nucleósidos, respectivamente. Los gapmers de MOE 3-10-7 tienen una longitud de 20 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende diez 2’-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprenden tres y siete nucleósidos, respectivamente. Los gapmers 6-7-6 de MOE tienen una longitud de 19 nucleósidos, donde el segmento intermedio central

comprende siete 2’-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprende seis nucleósidos cada una. Los gapmers 6-8-6 de MOE tienen una longitud de 20 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende ocho 2’-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprende seis nucleósidos cada una. Los enlaces internucleósidos en cada gapmer son enlaces de fosforotioato (P=S). Todos los residuos de citosina en cada gapmer son 5-metilcitosinas.

Los oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt tienen 16 nucleótidos de longitud donde los nucleósidos tienen una modificación de azúcar de MOE, una modificación de azúcar de cEt o una modificación de desoxi. La columna "Química" describe las modificaciones de azúcar de cada oligonucleótido. ‘k’ indica una modificación de azúcar de (S)-cEt; ‘d’ indica desoxirribosa; y ‘e’ indica una modificación de MOE.

El “sitio de inicio” indica el nucleósido más cercano a la posición 5’, al cual se dirige el gapmer en la secuencia génica humana. El “sitio de terminación” indica el nucleósido más cercano a la posición 3’ al cual se dirige el gapmer en

la secuencia génica humana. Cada gapmer enumerado en las Tablas que figuran más adelante se dirige ya sea al ARNm de CFB humano, designado en la presente como SEQ ID NO: 1 (n.° de acceso GENBANK NM_001710.5) o a la secuencia genómica de CFB, designada en la presente como SEQ ID NO: 2 (n.° de acceso GENBANK NT_007592.15 truncada a partir de los nucleótidos 31852000 a 31861000), o ambos. "n/a" indica que el oligonucleótido antisentido no se dirige a esa secuencia génica particular con 100 % de complementariedad.

Tabla 132

Inhibición del ARNm de CFB mediante oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt que se dirigen a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2

N.° ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO:1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio SEQ ID NO:2	Sitio de detención SEQ ID NO: 2	Motivo	SEQ ID NO:
532811	2599	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTCAATCCC	10	7834	7853	eeeeeddddddddddeeeee	239
588884	48	63	Exón 1	GGAACATCCAAGCGGG	79	1769	1784	eekddddddddddkke	541
588872	154	169	Exón 1	TGGTCACATTCCCTTC	91	1875	1890	eekddddddddddkke	542

588873	156	171	Exón 1	CCTGGTCACATTCCCT	91	1877	1892	eekddddddddddkke	543
588874	158	173	Exón 1	GACCTGGTCACATTCC	91	1879	1894	eekddddddddddkke	544
588878	1171	1186	Unión del Exón 6-7	TAACTTGCCACCTTCT	92	n/a	n/a	eekddddddddddkke	545
588879	1173	1188	Exón 6-7 Junction	CATAACTTGCCACCTT	94	n/a	n/a	eekddddddddddkke	546
588880	1175	1190	Unión del Exón 6-7	ACCATAACTTGCCACC	89	4151	4166	eekddddddddddkke	547
588869	2193	2208	Exón 15	CCTTCCGAGTCAGCTT	17	6981	6996	eekddddddddddkke	548
588870	2195	2210	Exón 15	CTCCTTCCGAGTCAGC	78	6983	6998	eekddddddddddkke	549
588871	2197	2212	Exón 15	ACCTCCTTCCGAGTCA	80	6985	7000	eekddddddddddkke	550
588881	2223	2238	Unión del Exón 15-16	CTTTCTTATCCCCATT	93	n/a	n/a	eekddddddddddkke	551

588882	2225	2240	Unión del Exón 15-16	GCCTTTCTTATCCCCA	88	n/a	n/a	eekddddddddddkke	552
588883	2227	2242	Unión del Exón 15-16	CTGCCTTTCTTATCCC	90	n/a	n/a	eekddddddddddkke	553
588875	2457	2472	Exón 18	TTTGCCGCTTCTGGTT	81	7692	7707	eekddddddddddkke	554
588876	2459	2474	Exón 18	CTTTTGCCGCTTCTGG	95	7694	7709	eekddddddddddkke	555
588877	2461	2476	Exón 18	TGCTTTTGCCGCTTCT	91	7696	7711	eekddddddddddkke	556
588807	2551	2566	Exón 18	AAACCCAAATCCTCAT	82	7786	7801	eekddddddddddkke	557
588808	2553	2568	Exón 18	GAAAACCCAAATCCTC	69	7788	7803	eekddddddddddkke	558
588809	2555	2570	Exón 18	TAGAAAACCCAAATCC	51	7790	7805	eekddddddddddkke	559
588810	2556	2571	Exón 18	ATAGAAAACCCAAATC	23	7791	7806	eekddddddddddkke	560
588811	2559	2574	Exón 18	CTTATAGAAAACCCAA	13	7794	7809	eekddddddddddkke	561
588812	2560	2575	Exón 18	CCTTATAGAAAACCCA	29	7795	7810	eekddddddddddkke	562

588813	2561	2576	Exón 18	CCCTTATAGA AAACCC	53	7796	7811	eekddddddddd dkke	563
588814	2562	2577	Exón 18	CCCCTTATAG AAAACC	86	7797	7812	eekddddddddd dkke	564
588815	2563	2578	Exón 18	ACCCCTTATA GAAAAC	76	7798	7813	eekddddddddd dkke	565
588816	2564	2579	Exón 18	AACCCCTTAT AGAAAA	33	7799	7814	eekddddddddd dkke	566
588817	2565	2580	Exón 18	AAACCCCTTA TAGAAA	48	7800	7815	eekddddddddd dkke	567
588818	2566	2581	Exón 18	GAAACCCCTT ATAGAA	44	7801	7816	eekddddddddd dkke	568
588819	2567	2582	Exón 18	GGAAACCCCT TATAGA	74	7802	7817	eekddddddddd dkke	569
588820	2568	2583	Exón 18	AGGAAACCCC TTATAG	68	7803	7818	eekddddddddd dkke	570
588821	2569	2584	Exón 18	CAGGAAACCC CTTATA	45	7804	7819	eekddddddddd dkke	571
588822	2570	2585	Exón 18	GCAGGAAACC CCTTAT	50	7805	7820	eekddddddddd dkke	572
588823	2571	2586	Exón 18	AGCAGGAAAC CCCTTA	54	7806	7821	eekddddddddd dkke	573
588824	2572	2587	Exón 18	CAGCAGGAAA CCCCTT	35	7807	7822	eekddddddddd dkke	574

588825	2573	2588	Exón 18	CCAGCAGGAA ACCCCT	11	7808	7823	eekddddddddd ddkke	575
588826	2574	2589	Exón 18	TCCAGCAGGA AACCCC	19	7809	7824	eekddddddddd ddkke	576
588827	2575	2590	Exón 18	GTCCAGCAGG AAACCC	42	7810	7825	eekddddddddd ddkke	577
588828	2576	2591	Exón 18	TGTCCAGCAG GAAACC	0	7811	7826	eekddddddddd ddkke	578
588829	2577	2592	Exón 18	CTGTCCAGCA GGAAAC	49	7812	7827	eekddddddddd ddkke	579
588830	2578	2593	Exón 18	CCTGTCCAGC AGGAAA	11	7813	7828	eekddddddddd ddkke	580
588831	2579	2594	Exón 18	CCCTGTCCAG CAGGAA	20	7814	7829	eekddddddddd ddkke	581
588832	2580	2595	Exón 18	CCCCTGTCCA GCAGGA	19	7815	7830	eekddddddddd ddkke	582
588833	2581	2596	Exón 18	GCCCCTGTCC AGCAGG	12	7816	7831	eekddddddddd ddkke	583
588834	2582	2597	Exón 18	CGCCCCTGTC CAGCAG	10	7817	7832	eekddddddddd ddkke	584
588835	2583	2598	Exón 18	ACGCCCCTGT CCAGCA	13	7818	7833	eekddddddddd ddkke	585
588836	2584	2599	Exón 18	CACGCCCCTG TCCAGC	13	7819	7834	eekddddddddd ddkke	586
588837	2585	2600	Exón 18	CCACGCCCCT GTCCAG	39	7820	7835	eekddddddddd ddkke	587

588838	2586	2601	Exón 18	CCCACGCCCC TGTCCA	54	7821	7836	eekddddddddd ddkke	588
588839	2587	2602	Exón 18	TCCCACGCCC CTGTCC	51	7822	7837	eekddddddddd ddkke	589
588840	2588	2603	Exón 18	ATCCCACGCC CCTGTC	65	7823	7838	eekddddddddd ddkke	590
588841	2589	2604	Exón 18	AATCCCACGC CCCTGT	59	7824	7839	eekddddddddd ddkke	591
588842	2590	2605	Exón 18	CAATCCCACG CCCCTG	70	7825	7840	eekddddddddd ddkke	592
588843	2591	2606	Exón 18	TCAATCCCAC GCCCCT	0	7826	7841	eekddddddddd ddkke	593
588844	2592	2607	Exón 18	TTCAATCCCA CGCCCC	48	7827	7842	eekddddddddd ddkke	594
588845	2593	2608	Exón 18	ATTCAATCCC ACGCCC	46	7828	7843	eekddddddddd ddkke	595
588846	2594	2609	Exón 18	AATTCAATCC CACGCC	67	7829	7844	eekddddddddd ddkke	596
588847	2595	2610	Exón 18	TAATTCAATC CCACGC	75	7830	7845	eekddddddddd ddkke	597
588848	2596	2611	Exón 18	TTAATTCAAT CCCACG	76	7831	7846	eekddddddddd ddkke	598
588849	2597	2612	Exón 18	TTTAATTCAA TCCCAC	94	7832	7847	eekddddddddd ddkke	599
588850	2598	2613	Exón 18	TTTTAATTCA ATCCCA	91	7833	7848	eekddddddddd ddkke	600

588851	2599	2614	Exón 18	GTTTTAATTC AATCCC	91	7834	7849	eekddddddddd ddkke	601
588852	2600	2615	Exón 18	TGTTTTAATT CAATCC	78	7835	7850	eekddddddddd ddkke	602
588853	2601	2616	Exón 18	CTGTTTTAAT TCAATC	81	7836	7851	eekddddddddd ddkke	603
588854	2602	2617	Exón 18	GCTGTTTTAA TTCAAT	63	7837	7852	eekddddddddd ddkke	604
588855	2603	2618	Exón 18	AGCTGTTTTA ATTCAA	65	7838	7853	eekddddddddd ddkke	605
588856	2604	2619	Exón 18	CAGCTGTTTT AATTCA	76	7839	7854	eekddddddddd ddkke	606
588857	2605	2620	Exón 18	GCAGCTGTTT TAATTC	89	7840	7855	eekddddddddd ddkke	607
588858	2606	2621	Exón 18	CGCAGCTGTT TTAATT	89	7841	7856	eekddddddddd ddkke	608
588859	2607	2622	Exón 18	TCGCAGCTGT TTTAAT	89	7842	7857	eekddddddddd ddkke	609
588860	2608	2623	Exón 18	GTCGCAGCTG TTTTAA	76	7843	7858	eekddddddddd ddkke	610
588861	2609	2624	Exón 18	TGTCGCAGCT GTTTTA	87	7844	7859	eekddddddddd ddkke	611
588862	2610	2625	Exón 18	TTGTCGCAGC TGTTTT	85	7845	7860	eekddddddddd ddkke	612

588863	2611	2626	Exón 18	GTTGTCGCAG CTGTTT	87	7846	7861	eekddddddddd ddkke	613
588864	2612	2627	Exón 18	TGTTGTCGCA GCTGTT	67	7847	7862	eekddddddddd ddkke	614
588865	2613	2628	Exón 18	TTGTTGTCGC AGCTGT	51	n/a	n/a	eekddddddddd ddkke	615
588866	2614	2629	Exón 18	TTTGTTGTCG CAGCTG	95	n/a	n/a	eekddddddddd ddkke	616
588867	2615	2630	Exón 18	TTTTGTTGTC GCAGCT	92	n/a	n/a	eekddddddddd ddkke	617
588868	2616	2631	Exón 18	TTTTTGTTGT CGCAGC	66	n/a	n/a	eekddddddddd ddkke	618

Tabla 133

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers 5-10-5 de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2

N.° ISIS	Sitio de ini-cio SEQ ID NO: 1	Sitio de deten ción SEQ ID NO: 1	Región objeti vo	Secuen -cia	% de inhibi ción	Sitio de ini-cio SEQ ID NO: 2	Sitio de deten ción SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO:
588685	n/a	n/a	Exón 1	GGATCC AGCTCA CTCCCC TG	14	1596	1615	466
588686	n/a	n/a	Exón 1	AAATAA GGATCC AGCTCA CT	2	1602	1621	467
588688	n/a	n/a	Exón 1	GACCAG AAATAA GGATCC AG	3	1608	1627	468
588690	n/a	n/a	Exón 1	CTTAGG GACCAG AAATAA	10	1614	1633	469

588692	n/a	n/a	Exón 1	CACCCACTTAGGGACCAGAA	23	1620	1639	470
588694	n/a	n/a	Exón 1	ACCACCCACTTAGGGACCAG	23	1622	1641	471
588696	n/a	n/a	Exón 1	AGGTCCAGGACTCTCCCCTT	15	1685	1704	472
588698	n/a	n/a	Exón 1	AAGGTCCAGGACTCTCCCCT	19	1686	1705	473
588700	n/a	n/a	Exón 1	AAACTGCAGAAGTCCCACCC	16	1716	1735	474
588586	30	49	Exón 1	GGAGGGCCCCGCTGAGCTGC	11	1751	1770	475

588587	48	67	Exón 1	TCCCGGAACATCCAAGCGGG	14	1769	1788	476
588588	56	75	Exón 1	CATCACTTTCCCGGAACATC	18	1777	1796	477
588589	151	170	Exón 1	CTGGTCACATTCCCTTCCCC	59	1872	1891	478
588590	157	176	Exón 1	CTAGACCTGGTCACATTCCC	59	1878	1897	479
588591	339	358	Unión del Exón 1-2	GGAGTGGTGGTCACACCTCC	45	n/a	n/a	480
588592	384	403	Exón 2	ACCCCCTCCAGAGAGCAGGA	39	2192	2211	481

588593	390	409	Exón 2	ATCTCTACCCCCTCCAGAGA	29	2198	2217	482
588594	467	486	Exón 2	GGTACGGGTAGAAGCCAGAA	47	2275	2294	483
588595	671	690	Exón 3	GGAGAGTGTAACCGTCATAG	44	2879	2898	484
588596	689	708	Exón 3	TGCGATTGGCAGAGCCCCGG	43	2897	2916	638
588597	695	714	Exón 3	GGCAGGTGCGATTGGCAGAG	34	2903	2922	486
588598	707	726	Exón 3	GGCCATTCACTTGGCAGGTG	17	2915	2934	487

588599	738	757	Exón 3	TTGTCACAGATCGCTGTCTG	37	2946	2965	488
588600	924	943	Unión del Exón 3-4	AAGGAGTCTTGGCAGGAAGG	18	n/a	n/a	489
588601	931	950	Unión del Exón 3-4	GTACATGAAGGAGTCTTGGC	32	n/a	n/a	490
588602	959	978	Exón 5	AAGCTTCGGCACCTCTTGA	45	3542	3561	491
588603	1089	1108	Exón 6	CCATCTAGCACCAGGTAGAT	52	3773	3792	492
588604	1108	1127	Exón 6	GGCCCCAATGCTGTCTGATC	39	3792	3811	493

588606	1150	1169	Exón 6	AATTAAGTTGACTAGACACT	37	3834	3853	494
588608	1162	1181	Unión del Exón 6-7	TGCCACCTTCTCAATTAAGT	21	n/a	n/a	648
588578	1167	1186	Unión del Exón 6-7	TAACTTGCCACCTTCTCAAT	22	n/a	n/a	496
588579	1169	1188	Unión del Exón 6-7	CATAACTTGCCACCTTCTCA	21	n/a	n/a	497
532692	1171	1190	Unión del Exón 6-7	ACCATAACTTGCCACCTTCT	56	n/a	n/a	90
588580	1173	1192	Unión del Exón 6-7	ACACCATAACTTGCCACCTT	50	n/a	n/a	498

588581	1175	1194	Exón 7	TCACACCATAACTTGCCACC	50	4151	4170	499
588610	1319	1338	Exón 8	TAGTCCCTGACTTCAACTTG	47	4612	4631	500
588612	1325	1344	Exón 8	TGGTGTTAGTCCCTGACTTC	47	4618	4637	501
588614	1396	1415	Exón 8	GCGGTTCCAGCCTTCAGGAG	51	4689	4708	502
588616	1421	1440	Exón 8	TCATGAGGATGATGACATGG	18	4714	4733	503
588618	1446	1465	Exón 9	CCGCCCATGTTGTGCAATCC	40	5020	5039	504

588620	1458	1477	Exón 9	GTAATTGGGTCCCCGCCCAT	40	5032	5051	505
588623	1482	1501	Exón 9	AAGTCCCGGATCTCATCAAT	45	5056	5075	506
588624	1542	1561	Unión del Exón 9-10	AACACATAGACATCCAGATA	43	n/a	n/a	507
588626	1585	1604	Exón 10	CAAAGCATTGATGTTCACTT	45	5234	5253	508
588628	1621	1640	Exón 10	TTTGAACACATGTTGCTCAT	53	5270	5289	509
588631	1646	1665	Exón 10	CTTCCAGGTTTTCCATATCC	56	5295	5314	510

588632	1647	1666	Exón 10	TCTTCCAGGTTTTCCATATC	35	5296	5315	511
588634	1689	1708	Exón 11	AGACTCAGAGACTGGCTTTC	55	5830	5849	512
588636	1749	1768	Exón 11	GCCTGCCATGGTTGCTTGTG	78	5890	5909	513
588638	1763	1782	Exón 11	TGACTGAGATCTTGGCCTGC	95	5904	5923	514
588640	1912	1931	Exón 13	TTCTATCTCCAGGTCCCGCT	44	6406	6425	515
588642	1982	2001	Exón 13	AGTCATAAAATTCAGGAATT	40	6476	6495	516

588645	2073	2092	Exón 14	CGAGTTGTTCCCTCGGTGCA	57	6662	6681	517
588646	2085	2104	Exón 14	AGCCTCAAAGCTCGAGTTGT	48	6674	6693	518
588648	2091	2110	Exón 14	GGAGGAAGCCTCAAAGCTCG	40	6680	6699	519
588651	2097	2116	Exón 14	GTAGTTGGAGGAAGCCTCAA	43	6686	6705	520
588652	2103	2122	Exón 14	CAAGTGGTAGTTGGAGGAAG	13	6692	6711	521
588654	2166	2185	Exón 15	TCCTCAGACACAAACAGAGC	55	6954	6973	522

588656	2172	2191	Exón 15	TTCTCCTCCTCAGACACAAA	44	6960	6979	523
588658	2196	2215	Exón 15	TAGACCTCCTTCCGAGTCAG	50	6984	7003	524
588660	2202	2221	Exón 15	TTGATGTAGACCTCCTTCCG	27	6990	7009	525
588582	2219	2238	Unión del Exón 15-16	CTTTCTTATCCCCATTCTTG	49	n/a	n/a	526
588583	2221	2240	Unión del Exón 15-16	GCCTTTCTTATCCCCATTCT	41	n/a	n/a	527
532775	2223	2242	Unión del Exón 15-16	CTGCCTTTCTTATCCCCATT	41	n/a	n/a	203

588584	2225	2244	Exón 15-16 Junction	AGCTGCCTTTCTTATCCCCA	43	n/a	n/a	528
588662	2226	2245	Unión del Exón 15-16	CAGCTGCCTTTCTTATCCCC	52	n/a	n/a	529
588585	2227	2246	Unión del Exón 15-16	ACAGCTGCCTTTCTTATCCC	39	n/a	n/a	530
588664	2238	2257	Exón 16	GCATCTCTCTCACAGCTGCC	69	7122	7141	531
588666	2276	2295	Exón 16	AGATGTCCTTGACTTTGTCA	46	7160	7179	532
588668	2330	2349	Exón 16	CAGCATAGGGACTCACTCCT	47	7214	7233	533

588670	2361	2380	Unión del Exón 16-17	CCGCCAGAATCACCTCTGCA	58	n/a	n/a	534
588672	2397	2416	Exón 17	TGAATGAAACGACTTCTCTT	48	7362	7381	535
588674	2430	2449	Exón 18	ACATCCACTACTCCCCAGCT	29	7665	7684	536
588676	2448	2467	Exón 18	CGCTTCTGGTTTTTGCAGAC	58	7683	7702	537
588678	2454	2473	Exón 18	TTTTGCCGCTTCTGGTTTTT	45	7689	7708	538
588680	2466	2485	Exón 18	GCAGGTACCTGCTTTTGCCG	36	7701	7720	539

588682	2532	2551	Exón 18	TCTTGGAGTTTCTCCTTCAG	47	7767	7786	540
532811	2599	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTCAATCCC	96	7834	7853	239
532917	2604	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	96	7839	7858	317

Tabla 134

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2

N.° ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO: 1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio SEQ ID NO: 2	Sitio de detención SEQ ID NO: 2	Motivo	SEQ ID NO:
598973	2552	2568	Exón 18	GAAAACCCAATCCTCA	40	7787	7803	3-10-4	619
599036	2552	2568	Exón 18	GAAAACCCAATCCTCA	18	7787	7803	5-7-5	619
598974	2553	2569	Exón 18	AGAAAACCCAAATCCTC	28	7788	7804	3-10-4	620

599037	2553	2569	Exón 18	AGAAAACCCAAATCCTC	19	7788	7804	5-7-5	620
598975	2554	2570	Exón 18	TAGAAAACCCAAATCCT	15	7789	7805	3-10-4	621
599038	2554	2570	Exón 18	TAGAAAACCCAAATCCT	32	7789	7805	5-7-5	621
598976	2555	2571	Exón 18	ATAGAAAACCCAAATCC	12	7790	7806	3-10-4	622
599039	2555	2571	Exón 18	ATAGAAAACCCAAATCC	7	7790	7806	5-7-5	622
598977	2557	2573	Exón 18	TTATAGAAAACCCAAAT	13	7792	7808	3-10-4	623

	599040	2557	2573	Exón 18	TTATAGAAAACCCAAAT	13	7792	7808	5-7-5	623
	598978	2558	2574	Exón 18	CTTATAGAAAACCCAAA	0	7793	7809	3-10-4	624
	599041	2558	2574	Exón 18	CTTATAGAAAACCCAAA	0	7793	7809	5-7-5	624
	598979	2559	2575	Exón 18	CCTTATAGAAAACCCAA	8	7794	7810	3-10-4	625
	599042	2559	2575	Exón 18	CCTTATAGAAAACCCAA	19	7794	7810	5-7-5	625
	598980	2560	2576	Exón 18	CCCTTATAGAAAACCCA	42	7795	7811	3-10-4	626

	599043	2560	2576	Exón 18	CCCTTATAGAAACCCA	10	7795	7811	5-7-5	626
	598981	2561	2577	Exón 18	CCCCTTATAGAAAACCC	20	7796	7812	3-10-4	627
	599044	2561	2577	Exón 18	CCCCTTATAGAAAACCC	12	7796	7812	5-7-5	627
	598982	2562	2578	Exón 18	ACCCCTTATAGAAAACC	10	7797	7813	3-10-4	628
	599045	2562	2578	Exón 18	ACCCCTTATAGAAAACC	3	7797	7813	5-7-5	628
	598983	2563	2579	Exón 18	AACCCCTTATAGAAAAC	0	7798	7814	3-10-4	629

	599046	2563	2579	Exón 18	AACCCCTTATAGAAAAC	18	7798	7814	5-7-5	629
	598984	2564	2580	Exón 18	AAACCCCTTATAGAAAA	0	7799	7815	3-10-4	630
	599047	2564	2580	Exón 18	AAACCCCTTATAGAAAA	7	7799	7815	5-7-5	630
	598985	2565	2581	Exón 18	GAAACCCCTTATAGAAA	0	7800	7816	3-10-4	631
	599048	2565	2581	Exón 18	GAAACCCCTTATAGAAA	9	7800	7816	5-7-5	631
	598986	2566	2582	Exón 18	GGAAACCCCTTATAGAA	0	7801	7817	3-10-4	632

599049	2566	2582	Exón 18	GGAAACCCCTTATAGAA	18	7801	7817	5-7-5	632
598988	2567	2583	Exón 18	AGGAAACCCCTTATAGA	0	7802	7818	3-10-4	633
599050	2567	2583	Exón 18	AGGAAACCCCTTATAGA	8	7802	7818	5-7-5	633
598989	2568	2584	Exón 18	CAGGAAACCCCTTATAG	0	7803	7819	3-10-4	634
598990	2569	2585	Exón 18	GCAGGAAACCCCTTATA	8	7804	7820	3-10-4	635
598991	2570	2586	Exón 18	AGCAGGAAACCCCTTAT	25	7805	7821	3-10-4	636

598992	2571	2587	Exón 18	CAGCAGGAAACCCCTTA	12	7806	7822	3-10-4	637
598993	2572	2588	Exón 18	CCAGCAGGAAACCCCTT	37	7807	7823	3-10-4	638
598994	2573	2589	Exón 18	TCCAGCAGGAAACCCCT	29	7808	7824	3-10-4	639
598995	2574	2590	Exón 18	GTCCAGCAGGAAACCCC	42	7809	7825	3-10-4	640
598996	2575	2591	Exón 18	TGTCCAGCAGGAAACCC	36	7810	7826	3-10-4	641
598997	2576	2592	Exón 18	CTGTCCAGCAGGAAACC	18	7811	7827	3-10-4	642

	598998	2577	2593	Exón 18	CCTGTCCAGCAGGAAAC	27	7812	7828	3-10-4	643
	598999	2578	2594	Exón 18	CCCTGTCCAGCAGGAAA	61	7813	7829	3-10-4	644
	599000	2580	2596	Exón 18	GCCCCTGTCCAGCAGGA	71	7815	7831	3-10-4	645
	599001	2581	2597	Exón 18	CGCCCCTGTCCAGCAGG	80	7816	7832	3-10-4	646
	599002	2582	2598	Exón 18	ACGCCCCTGTCCAGCAG	68	7817	7833	3-10-4	647
	599003	2583	2599	Exón 18	CACGCCCCTGTCCAGCA	71	7818	7834	3-10-4	648

599004	2584	2600	Exón 18	CCACGCCCCTGTCCAGC	76	7819	7835	3-10-4	649
599005	2585	2601	Exón 18	CCCACGCCCCTGTCCAG	70	7820	7836	3-10-4	650
599006	2586	2602	Exón 18	TCCCACGCCCCTGTCCA	65	7821	7837	3-10-4	651
599007	2587	2603	Exón 18	ATCCCACGCCCCTGTCC	60	7822	7838	3-10-4	652
599008	2588	2604	Exón 18	AATCCCACGCCCCTGTC	72	7823	7839	3-10-4	653
599009	2589	2605	Exón 18	CAATCCCACGCCCCTGT	79	7824	7840	3-10-4	654

599010	2590	2606	Exón 18	TCAATCCCACGCCCCTG	73	7825	7841	3-10-4	655
599011	2591	2607	Exón 18	TTCAATCCCACGCCCCT	79	7826	7842	3-10-4	656
599012	2592	2608	Exón 18	ATTCAATCCCACGCCCC	67	7827	7843	3-10-4	657
599013	2593	2609	Exón 18	AATTCAATCCCACGCCC	65	7828	7844	3-10-4	658
599014	2594	2610	Exón 18	TAATTCAATCCCACGCC	74	7829	7845	3-10-4	659
599015	2595	2611	Exón 18	TTAATTCAATCCCACGC	71	7830	7846	3-10-4	660

599016	2596	2612	Exón 18	TTTAATTCAATCCCACG	48	7831	7847	3-10-4	661
599017	2597	2613	Exón 18	TTTTAATTCAATCCCAC	34	7832	7848	3-10-4	662
599018	2598	2614	Exón 18	GTTTTAATTCAATCCCA	56	7833	7849	3-10-4	663
599019	2599	2615	Exón 18	TGTTTTAATTCAATCCC	60	7834	7850	3-10-4	664
599020	2600	2616	Exón 18	CTGTTTTAATTCAATCC	0	7835	7851	3-10-4	665
599021	2601	2617	Exón 18	GCTGTTTTAATTCAATC	33	7836	7852	3-10-4	666

599022	2602	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTCAAT	17	7837	7853	3-10-4	667
599023	2603	2619	Exón 18	CAGCTGTTTTAATTCAA	52	7838	7854	3-10-4	668
532917	2604	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	86	7839	7858	5-10-5	317
599024	2604	2620	Exón 18	GCAGCTGTTTTAATTCA	88	7839	7855	3-10-4	669
599025	2605	2621	Exón 18	CGCAGCTGTTTTAATTC	85	7840	7856	3-10-4	670
599026	2606	2622	Exón 18	TCGCAGCTGTTTTAATT	69	7841	7857	3-10-4	671

599027	2607	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAAT	77	7842	7858	3-10-4	672
599028	2608	2624	Exón 18	TGTCGCAGCTGTTTTAA	73	7843	7859	3-10-4	673
599029	2609	2625	Exón 18	TTGTCGCAGCTGTTTTA	78	7844	7860	3-10-4	674
599030	2610	2626	Exón 18	GTTGTCGCAGCTGTTTT	75	7845	7861	3-10-4	675
599031	2611	2627	Exón 18	TGTTGTCGCAGCTGTTT	77	7846	7862	3-10-4	676
599032	2612	2628	Exón 18/ Repetición	TTGTTGTCGCAGCTGTT	79	n/a	n/a	3-10-4	677

599033	2613	2629	Exón 18/ Repetición	TTTGTTGTCGCAGCTGT	80	n/a	n/a	3-10-4	678
599034	2614	2630	Exón 18/ Repetición	TTTTGTTGTCGCAGCTG	78	n/a	n/a	3-10-4	679
599035	2615	2631	Exón 18/ Repetición	TTTTTGTTGTCGCAGCT	63	n/a	n/a	3-10-4	680

Tabla 135

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2

N.° ISIS	Sitio de ini-cio SEQ ID NO: 1	Sitio de deten-ción SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	% de inhibición	Sitio de ini-cio SEQ ID NO: 2	Sitio de deten-ción SEQ ID NO: 2	Motivo	SEQ ID NO:
599098	2552	2568	Exón 18	GAAAACCCAAATCCTCA	57	7787	7803	4-8-5	619
599099	2553	2569	Exón 18	AGAAAACCCAAATCCTC	33	7788	7804	4-8-5	620
599100	2554	2570	Exón 18	TAGAAAACCCAAATCCT	32	7789	7805	4-8-5	621
599101	2555	2571	Exón 18	ATAGAAAACCCAAATCC	47	7790	7806	4-8-5	622

599102	2557	2573	Exón 18	TTATAGAAAACCCAAAT	59	7792	7808	4-8-5	623
599103	2558	2574	Exón 18	CTTATAGAAAACCCAAA	10	7793	7809	4-8-5	624
599104	2559	2575	Exón 18	CCTTATAGAAAACCCAA	3	7794	7810	4-8-5	625
599105	2560	2576	Exón 18	CCCTTATAGAAAACCCA	45	7795	7811	4-8-5	626
599106	2561	2577	Exón 18	CCCCTTATAGAAAACCC	49	7796	7812	4-8-5	627
599107	2562	2578	Exón 18	ACCCCTTATAGAAAACC	35	7797	7813	4-8-5	628

	599108	2563	2579	Exón 18	AACCCCTTATAGAAAAC	17	7798	7814	4-8-5	629
	599109	2564	2580	Exón 18	AAACCCCTTATAGAAAA	36	7799	7815	4-8-5	630
	599110	2565	2581	Exón 18	GAAACCCCTTATAGAAA	20	7800	7816	4-8-5	631
	599111	2566	2582	Exón 18	GGAAACCCCTTATAGAA	20	7801	7817	4-8-5	632
	599112	2567	2583	Exón 18	AGGAAACCCCTTATAGA	15	7802	7818	4-8-5	633
	599113	2568	2584	Exón 18	CAGGAAACCCCTTATAG	19	7803	7819	4-8-5	634

599051	2568	2584	Exón 18	CAGGAAACCCCTTATAG	26	7803	7819	5-7-5	634
599114	2569	2585	Exón 18	GCAGGAAACCCCTTATA	18	7804	7820	4-8-5	635
599052	2569	2585	Exón 18	GCAGGAAACCCCTTATA	21	7804	7820	5-7-5	635
599115	2570	2586	Exón 18	AGCAGGAAACCCCTTAT	31	7805	7821	4-8-5	636
599053	2570	2586	Exón 18	AGCAGGAAACCCCTTAT	25	7805	7821	5-7-5	636
599116	2571	2587	Exón 18	CAGCAGGAAACCCCTTA	39	7806	7822	4-8-5	637

	599054	2571	2587	Exón 18	CAGCAGGAAACCCCTTA	36	7806	7822	5-7-5	637
	599117	2572	2588	Exón 18	CCAGCAGGAAACCCCTT	46	7807	7823	4-8-5	638
	599055	2572	2588	Exón 18	CCAGCAGGAAACCCCTT	22	7807	7823	5-7-5	638
	599118	2573	2589	Exón 18	TCCAGCAGGAAACCCCT	40	7808	7824	4-8-5	639
	599056	2573	2589	Exón 18	TCCAGCAGGAAACCCCT	32	7808	7824	5-7-5	639
	599119	2574	2590	Exón 18	GTCCAGCAGGAAACCCC	50	7809	7825	4-8-5	640

	599057	2574	2590	Exón 18	GTCCAGCAGGAAACCCC	46	7809	7825	5-7-5	640
	599120	2575	2591	Exón 18	TGTCCAGCAGGAAACCC	30	7810	7826	4-8-5	641
	599058	2575	2591	Exón 18	TGTCCAGCAGGAAACCC	52	7810	7826	5-7-5	641
	599121	2576	2592	Exón 18	CTGTCCAGCAGGAAACC	31	7811	7827	4-8-5	642
	599059	2576	2592	Exón 18	CTGTCCAGCAGGAAACC	24	7811	7827	5-7-5	642
	599122	2577	2593	Exón 18	CCTGTCCAGCAGGAAAC	23	7812	7828	4-8-5	643

	599060	2577	2593	Exón 18	CCTGTCCAGCAGGAAAC	37	7812	7828	5-7-5	643
	599123	2578	2594	Exón 18	CCCTGTCCAGCAGGAAA	51	7813	7829	4-8-5	644
	599061	2578	2594	Exón 18	CCCTGTCCAGCAGGAAA	34	7813	7829	5-7-5	644
	599124	2580	2596	Exón 18	GCCCCTGTCCAGCAGGA	56	7815	7831	4-8-5	645
	599062	2580	2596	Exón 18	GCCCCTGTCCAGCAGGA	51	7815	7831	5-7-5	645
	599125	2581	2597	Exón 18	CGCCCCTGTCCAGCAGG	70	7816	7832	4-8-5	646

599063	2581	2597	Exón 18	CGCCCCTGTCCAGCAGG	56	7816	7832	5-7-5	646
599126	2582	2598	Exón 18	ACGCCCCTGTCCAGCAG	76	7817	7833	4-8-5	647
599064	2582	2598	Exón 18	ACGCCCCTGTCCAGCAG	61	7817	7833	5-7-5	647
599127	2583	2599	Exón 18	CACGCCCCTGTCCAGCA	67	7818	7834	4-8-5	648
599065	2583	2599	Exón 18	CACGCCCCTGTCCAGCA	64	7818	7834	5-7-5	648
599066	2584	2600	Exón 18	CCACGCCCCTGTCCAGC	40	7819	7835	5-7-5	649

	599067	2585	2601	Exón 18	CCCACGCCCCTGTCCAG	37	7820	7836	5-7-5	650
	599068	2586	2602	Exón 18	TCCCACGCCCCTGTCCA	31	7821	7837	5-7-5	651
	599069	2587	2603	Exón 18	ATCCCACGCCCCTGTCC	39	7822	7838	5-7-5	652
	599070	2588	2604	Exón 18	AATCCCACGCCCCTGTC	59	7823	7839	5-7-5	653
	599071	2589	2605	Exón 18	CAATCCCACGCCCCTGT	63	7824	7840	5-7-5	657
	599072	2590	2606	Exón 18	TCAATCCCACGCCCCTG	74	7825	7841	5-7-5	655

	599073	2591	2607	Exón 18	TTCAA TCCCA CGCCC CT	53	7826	7842	5-7-5	656
	599074	2592	2608	Exón 18	ATTCA ATCCC ACGCC CC	56	7827	7843	5-7-5	657
	599075	2593	2609	Exón 18	AATTC AATCC CACGC CC	49	7828	7844	5-7-5	658
	599076	2594	2610	Exón 18	TAATT CAATC CCACG CC	54	7829	7845	5-7-5	659
	599077	2595	2611	Exón 18	TTAAT TCAAT CCCAC GC	79	7830	7846	5-7-5	660
	599078	2596	2612	Exón 18	TTTAA TTCAA TCCCA CG	67	7831	7847	5-7-5	661

599079	2597	2613	Exón 18	TTTTAATTCAATCCCAC	69	7832	7848	5-7-5	662
599080	2598	2614	Exón 18	GTTTTAATTCAATCCCA	79	7833	7849	5-7-5	663
599081	2599	2615	Exón 18	TGTTTTAATTCAATCCC	57	7834	7850	5-7-5	664
599082	2600	2616	Exón 18	CTGTTTTAATTCAATCC	50	7835	7851	5-7-5	665
599083	2601	2617	Exón 18	GCTGTTTTAATTCAATC	67	7836	7852	5-7-5	666
599084	2602	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTCAAT	60	7837	7853	5-7-5	667

	599085	2603	2619	Exón 18	CAGCTGTTTTAATTCAA	71	7838	7854	5-7-5	668
	532917	2604	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	82	7839	7858	5-10-5	317
	599086	2604	2620	Exón 18	GCAGCTGTTTTAATTCA	81	7839	7855	5-7-5	669
	599087	2605	2621	Exón 18	CGCAGCTGTTTTAATTC	88	7840	7856	5-7-5	670
	599088	2606	2622	Exón 18	TCGCAGCTGTTTTAATT	84	7841	7857	5-7-5	671
	599089	2607	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAAT	81	7842	7858	5-7-5	672

599090	2608	2624	Exón 18	TGTCGCAGCTGTTTTAA	77	7843	7859	5-7-5	673
599091	2609	2625	Exón 18	TTGTCGCAGCTGTTTTA	74	7844	7860	5-7-5	674
599092	2610	2626	Exón 18	GTTGTCGCAGCTGTTTT	66	7845	7861	5-7-5	675
599093	2611	2627	Exón 18	TGTTGTCGCAGCTGTTT	89	7846	7862	5-7-5	676
599094	2612	2628	Exón 18/ Repetición	TTGTTGTCGCAGCTGTT	82	n/a	n/a	5-7-5	677
599095	2613	2629	Exón 18/ Repetición	TTTGTTGTCGCAGCTGT	87	n/a	n/a	5-7-5	678

599096	2614	2630	Exón 18/ Repetición	TTTTGTTGTCGCAGCTG	85	n/a	n/a	5-7-5	679
599097	2615	2631	Exón 18/ Repetición	TTTTTGTTGTCGCAGCT	78	n/a	n/a	5-7-5	680

Tabla 136

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2

N.° ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO: 1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio SEQ ID NO: 2	Sitio de detención SEQ ID NO: 2	Motivo	SEQ ID NO:
599510	2552	2570	Exón 18	TAGAAAACCCAAATCCTCA	45	7787	7805	5-9-5	681

599331	2553	2571	Exón 18	ATAGA AACCC CAAAT CCTC	46	7788	7806	5-9-5	682
599332	2554	2572	Exón 18	TATAG AAAAC CCAAA TCCT	38	7789	7807	5-9-5	683
599333	2556	2574	Exón 18	CTTAT AGAAA ACCCA AATC	1	7791	7809	5-9-5	684
599334	2557	2575	Exón 18	CCTTA TAGAA AACCC AAAT	5	7792	7810	5-9-5	685
599335	2558	2576	Exón 18	CCCTT ATAGA AAACC CAAA	34	7793	7811	5-9-5	686
599336	2559	2577	Exón 18	CCCCT TATAG AAAAC CCAA	40	7794	7812	5-9-5	687

599337	2560	2578	Exón 18	ACCCC TTATA GAAAA CCCA	39	7795	7813	5-9-5	688
599338	2561	2579	Exón 18	AACCC CTTAT AGAAA ACCC	57	7796	7814	5-9-5	689
599339	2562	2580	Exón 18	AAACC CCTTA TAGAA AACC	26	7797	7815	5-9-5	690
599281	2562	2580	Exón 18	AAACC CCTTA TAGAA AACC	15	7797	7815	6-7-6	690
599340	2563	2581	Exón 18	GAAAC CCCTT ATAGA AAAC	17	7798	7816	5-9-5	691
599282	2563	2581	Exón 18	GAAAC CCCTT ATAGA AAAC	12	7798	7816	6-7-6	691

599341	2564	2582	Exón 18	GGAAA CCCCT TATAG AAAA	23	7799	7817	5-9-5	692
599283	2564	2582	Exón 18	GGAAA CCCCT TATAG AAAA	18	7799	7817	6-7-6	692
599342	2565	2583	Exón 18	AGGAA ACCCC TTATA GAAA	10	7800	7818	5-9-5	693
599284	2565	2583	Exón 18	AGGAA ACCCC TTATA GAAA	14	7800	7818	6-7-6	693
599343	2566	2584	Exón 18	CAGGA AACCC CTTAT AGAA	10	7801	7819	5-9-5	694
599285	2566	2584	Exón 18	CAGGA AACCC CTTAT AGAA	13	7801	7819	6-7-6	694

599344	2567	2585	Exón 18	GCAGGAAACCCCTTATAGA	22	7802	7820	5-9-5	695
599286	2567	2585	Exón 18	GCAGGAAACCCCTTATAGA	31	7802	7820	6-7-6	695
599345	2568	2586	Exón 18	AGCAGGAAACCCCTTATAG	19	7803	7821	5-9-5	696
599287	2568	2586	Exón 18	AGCAGGAAACCCCTTATAG	12	7803	7821	6-7-6	696
599346	2569	2587	Exón 18	CAGCAGGAAACCCCTTATA	30	7804	7822	5-9-5	697
599288	2569	2587	Exón 18	CAGCAGGAAACCCCTTATA	28	7804	7822	6-7-6	697

599347	2570	2588	Exón 18	CCAGC AGGAA ACCCC TTAT	46	7805	7823	5-9-5	698
599289	2570	2588	Exón 18	CCAGC AGGAA ACCCC TTAT	32	7805	7823	6-7-6	698
599348	2571	2589	Exón 18	TCCAG CAGGA AACCC CTTA	44	7806	7824	5-9-5	699
599290	2571	2589	Exón 18	TCCAG CAGGA AACCC CTTA	24	7806	7824	6-7-6	699
599349	2572	2590	Exón 18	GTCCA GCAGG AAACC CCTT	60	7807	7825	5-9-5	700
599291	2572	2590	Exón 18	GTCCA GCAGG AAACC CCTT	38	7807	7825	6-7-6	700

599350	2573	2591	Exón 18	TGTCC AGCAG GAAAC CCCT	49	7808	7826	5-9-5	701
599292	2573	2591	Exón 18	TGTCC AGCAG GAAAC CCCT	35	7808	7826	6-7-6	701
599351	2575	2593	Exón 18	CCTGT CCAGC AGGAA ACCC	46	7810	7828	5-9-5	702
599293	2575	2593	Exón 18	CCTGT CCAGC AGGAA ACCC	12	7810	7828	6-7-6	702
599352	2576	2594	Exón 18	CCCTG TCCAG CAGGA AACC	49	7811	7829	5-9-5	703
599294	2576	2594	Exón 18	CCCTG TCCAG CAGGA AACC	38	7811	7829	6-7-6	703

599353	2577	2595	Exón 18	CCCCTGTCCAGCAGGAAAC	64	7812	7830	5-9-5	704
599295	2577	2595	Exón 18	CCCCTGTCCAGCAGGAAAC	33	7812	7830	6-7-6	704
599354	2578	2596	Exón 18	GCCCCTGTCCAGCAGGAAA	56	7813	7831	5-9-5	705
599296	2578	2596	Exón 18	GCCCCTGTCCAGCAGGAAA	13	7813	7831	6-7-6	705
599355	2580	2598	Exón 18	ACGCCCCTGTCCAGCAGGA	81	7815	7833	5-9-5	706
599297	2580	2598	Exón 18	ACGCCCCTGTCCAGCAGGA	57	7815	7833	6-7-6	706

599356	2581	2599	Exón 18	CACGCCCCTGTCCAGCAGG	64	7816	7834	5-9-5	707
599298	2581	2599	Exón 18	CACGCCCCTGTCCAGCAGG	39	7816	7834	6-7-6	707
599299	2582	2600	Exón 18	CCACGCCCCTGTCCAGCAG	55	7817	7835	6-7-6	708
599300	2583	2601	Exón 18	CCCACGCCCCTGTCCAGCA	45	7818	7836	6-7-6	709
599301	2584	2602	Exón 18	TCCCACGCCCCTGTCCAGC	39	7819	7837	6-7-6	710
599302	2585	2603	Exón 18	ATCCCACGCCCCTGTCCAG	27	7820	7838	6-7-6	711

599303	2586	2604	Exón 18	AATCCCACGCCCCTGTCCA	35	7821	7839	6-7-6	712
599304	2587	2605	Exón 18	CAATCCCACGCCCCTGTCC	16	7822	7840	6-7-6	713
599305	2588	2606	Exón 18	TCAATCCCACGCCCCTGTC	41	7823	7841	6-7-6	714
599306	2589	2607	Exón 18	TTCAATCCCACGCCCCTGT	70	7824	7842	6-7-6	715
599307	2590	2608	Exón 18	ATTCAATCCCACGCCCCTG	66	7825	7843	6-7-6	716
599308	2591	2609	Exón 18	AATTCAATCCCACGCCCCT	68	7826	7844	6-7-6	717

599309	2592	2610	Exón 18	TAATTCAATCCCACGCCCC	52	7827	7845	6-7-6	718
599310	2593	2611	Exón 18	TTAATTCAATCCCACGCCC	39	7828	7846	6-7-6	719
599311	2594	2612	Exón 18	TTTAATTCAATCCCACGCC	83	7829	7847	6-7-6	720
599312	2595	2613	Exón 18	TTTTAATTCAATCCCACGC	72	7830	7848	6-7-6	721
599313	2596	2614	Exón 18	GTTTTAATTCAATCCCACG	86	7831	7849	6-7-6	722
599314	2597	2615	Exón 18	TGTTTTAATTCAATCCCAC	91	7832	7850	6-7-6	723

599315	2598	2616	Exón 18	CTGTTTTAATTCAATCCCA	71	7833	7851	6-7-6	724
599316	2599	2617	Exón 18	GCTGTTTTAATTCAATCCC	89	7834	7852	6-7-6	725
599317	2600	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTCAATCC	87	7835	7853	6-7-6	726
599318	2601	2619	Exón 18	CAGCTGTTTTAATTCAATC	81	7836	7854	6-7-6	727
599319	2602	2620	Exón 18	GCAGCTGTTTTAATTCAAT	75	7837	7855	6-7-6	728
599320	2603	2621	Exón 18	CGCAGCTGTTTTAATTCAA	84	7838	7856	6-7-6	729

532917	2604	2623	Exón 18	GTCGC AGCTG TTTTA ATTCA	92	7839	7858	5-10-5	317
599321	2604	2622	Exón 18	TCGCA GCTGT TTTAA TTCA	90	7839	7857	6-7-6	730
599322	2605	2623	Exón 18	GTCGC AGCTG TTTTA ATTC	89	7840	7858	6-7-6	731
599323	2606	2624	Exón 18	TGTCG CAGCT GTTTT AATT	81	7841	7859	6-7-6	732
599324	2607	2625	Exón 18	TTGTC GCAGC TGTTT TAAT	68	7842	7860	6-7-6	733
599325	2608	2626	Exón 18	GTTGT CGCAG CTGTT TTAA	71	7843	7861	6-7-6	734

599326	2609	2627	Exón 18	TGTTG TCGCA GCTGT TTTA	52	7844	7862	6-7-6	735
599327	2610	2628	Exón 18/ Repetición	TTGTT GTCGC AGCTG TTTT	88	n/a	n/a	6-7-6	736
599328	2611	2629	Exón 18/ Repetición	TTTGT TGTCG CAGCT GTTT	87	n/a	n/a	6-7-6	737
599329	2612	2630	Exón 18/ Repetición	TTTTG TTGTC GCAGC TGTT	84	n/a	n/a	6-7-6	738
599330	2613	2631	Exón 18/ Repetición	TTTTT GTTGT CGCAG CTGT	87	n/a	n/a	6-7-6	739

Tabla 137

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2

N.° ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO: 1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio SEQ ID NO: 2	Sitio de detención SEQ ID NO: 2	Motivo	SEQ ID NO:
599512	2552	2571	Exón 18	ATAGAAAACCCAAATCCTCA	74	7787	7806	3-10-7	410
599449	2553	2572	Exón 18	TATAGAAAACCCAAATCCTC	43	7788	7807	3-10-7	411
599450	2554	2573	Exón 18	TTATAGAAAACCCAAATCCT	51	7789	7808	3-10-7	412
599451	2555	2574	Exón 18	CTTATAGAAAACCCAAATCC	35	7790	7809	3-10-7	413

599452	2556	2575	Exón 18	CCTTATAGAAAACCCAAATC	34	7791	7810	3-10-7	414
599453	2557	2576	Exón 18	CCCTTATAGAAACCCAAAT	44	7792	7811	3-10-7	415
599454	2558	2577	Exón 18	CCCCTTATAGAAAACCCAAA	54	7793	7812	3-10-7	416
599455	2559	2578	Exón 18	ACCCCTTATAGAAAACCCAA	53	7794	7813	3-10-7	417
599456	2560	2579	Exón 18	AACCCCTTATAGAAAACCCA	69	7795	7814	3-10-7	418
599457	2561	2580	Exón 18	AAACCCCTTATAGAAAACCC	46	7796	7815	3-10-7	419

599458	2562	2581	Exón 18	GAAAC CCCTT ATAGA AAACC	0	7797	7816	3-10 -7	420
599459	2563	2582	Exón 18	GGAAA CCCCT TATAG AAAAC	12	7798	7817	3-10 -7	421
599460	2564	2583	Exón 18	AGGAA ACCCC TTATA GAAAA	17	7799	7818	3-10 -7	422
599461	2565	2584	Exón 18	CAGGA AACCC CTTAT AGAAA	24	7800	7819	3-10 -7	423
599462	2566	2585	Exón 18	GCAGG AAACC CCTTA TAGAA	33	7801	7820	3-10 -7	424
599463	2567	2586	Exón 18	AGCAG GAAAC CCCTT ATAGA	38	7802	7821	3-10 -7	425

599464	2568	2587	Exón 18	CAGCA GGAAA CCCCT TATAG	33	7803	7822	3-10 -7	426
599465	2569	2588	Exón 18	CCAGC AGGAA ACCCC TTATA	49	7804	7823	3-10 -7	427
599466	2570	2589	Exón 18	TCCAG CAGGA AACCC CTTAT	45	7805	7824	3-10 -7	428
599467	2571	2590	Exón 18	GTCCA GCAGG AAACC CCTTA	60	7806	7825	3-10 -7	237
599468	2572	2591	Exón 18	TGTCC AGCAG GAAAC CCCTT	61	7807	7826	3-10 -7	429
599469	2573	2592	Exón 18	CTGTC CAGCA GGAAA CCCCT	52	7808	7827	3-10 -7	430

599470	2574	2593	Exón 18	CCTGT CCAGC AGGAA ACCCC	45	7809	7828	3-10 -7	431
599471	2575	2594	Exón 18	CCCTG TCCAG CAGGA AACCC	67	7810	7829	3-10 -7	432
599472	2576	2595	Exón 18	CCCCT GTCCA GCAGG AAACC	79	7811	7830	3-10 -7	433
599473	2577	2596	Exón 18	GCCCC TGTCC AGCAG GAAAC	72	7812	7831	3-10 -7	238
599474	2578	2597	Exón 18	CGCCC CTGTC CAGCA GGAAA	87	7813	7832	3-10 -7	434
599475	2579	2598	Exón 18	ACGCC CCTGT CCAGC AGGAA	76	7814	7833	3-10 -7	435

599476	2580	2599	Exón 18	CACGCCCCTGTCCAGCAGGA	81	7815	7834	3-10-7	436
599477	2581	2600	Exón 18	CCACGCCCCTGTCCAGCAGG	83	7816	7835	3-10-7	437
599478	2582	2601	Exón 18	CCCACGCCCCTGTCCAGCAG	72	7817	7836	3-10-7	438
599479	2583	2602	Exón 18	TCCCACGCCCCTGTCCAGCA	81	7818	7837	3-10-7	439
599480	2584	2603	Exón 18	ATCCCACGCCCCTGTCCAGC	77	7819	7838	3-10-7	440
599481	2585	2604	Exón 18	AATCCCACGCCCCTGTCCAG	83	7820	7839	3-10-7	441

599482	2586	2605	Exón 18	CAATCCCACGCCCCTGTCCA	87	7821	7840	3-10-7	442
599483	2587	2606	Exón 18	TCAATCCCACGCCCCTGTCC	90	7822	7841	3-10-7	443
599484	2588	2607	Exón 18	TTCAATCCCACGCCCCTGTC	72	7823	7842	3-10-7	444
599485	2589	2608	Exón 18	ATTCAATCCCACGCCCCTGT	82	7824	7843	3-10-7	445
599486	2590	2609	Exón 18	AATTCAATCCCACGCCCCTG	84	7825	7844	3-10-7	446
599487	2591	2610	Exón 18	TAATTCAATCCCACGCCCCT	84	7826	7845	3-10-7	447

599488	2592	2611	Exón 18	TTAATTCAATCCCACGCCCC	87	7827	7846	3-10-7	448
599489	2593	2612	Exón 18	TTTAATTCAATCCCACGCCC	87	7828	7847	3-10-7	449
599490	2594	2613	Exón 18	TTTTAATTCAATCCCACGCC	86	7829	7848	3-10-7	450
599491	2595	2614	Exón 18	GTTTTAATTCAATCCCACGC	87	7830	7849	3-10-7	451
599492	2596	2615	Exón 18	TGTTTTAATTCAATCCCACG	88	7831	7850	3-10-7	452
599493	2597	2616	Exón 18	CTGTTTTAATTCAATCCCAC	75	7832	7851	3-10-7	453

599433	2597	2616	Exón 18	CTGTTTTAATTCAATCCCAC	89	7832	7851	6-8-6	453
599494	2598	2617	Exón 18	GCTGTTTTAATTCAATCCCA	90	7833	7852	3-10-7	454
599434	2598	2617	Exón 18	GCTGTTTTAATTCAATCCCA	89	7833	7852	6-8-6	454
599495	2599	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTCAATCCC	88	7834	7853	3-10-7	239
599435	2599	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTCAATCCC	91	7834	7853	6-8-6	239
599496	2600	2619	Exón 18	CAGCTGTTTTAATTCAATCC	89	7835	7854	3-10-7	455

599436	2600	2619	Exón 18	CAGCTGTTTTAATTCAATCC	89	7835	7854	6-8-6	455
599497	2601	2620	Exón 18	GCAGCTGTTTTAATTCAATC	89	7836	7855	3-10-7	456
599437	2601	2620	Exón 18	GCAGCTGTTTTAATTCAATC	91	7836	7855	6-8-6	456
599498	2602	2621	Exón 18	CGCAGCTGTTTTAATTCAAT	88	7837	7856	3-10-7	457
599438	2602	2621	Exón 18	CGCAGCTGTTTTAATTCAAT	90	7837	7856	6-8-6	457
599499	2603	2622	Exón 18	TCGCAGCTGTTTTAATTCAA	81	7838	7857	3-10-7	458

599439	2603	2622	Exón 18	TCGCAGCTGTTTAATTCAA	88	7838	7857	6-8-6	458
532917	2604	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	90	7839	7858	5-10-5	317
599500	2604	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	88	7839	7858	3-10-7	317
599440	2604	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	88	7839	7858	6-8-6	317
599501	2605	2624	Exón 18	TGTCGCAGCTGTTTTAATTC	78	7840	7859	3-10-7	459
599441	2605	2624	Exón 18	TGTCGCAGCTGTTTTAATTC	90	7840	7859	6-8-6	459

599502	2606	2625	Exón 18	TTGTC GCAGC TGTTT TAATT	87	7841	7860	3-10-7	460
599442	2606	2625	Exón 18	TTGTC GCAGC TGTTT TAATT	76	7841	7860	6-8-6	460
599503	2607	2626	Exón 18	GTTGT CGCAG CTGTT TTAAT	83	7842	7861	3-10-7	461
599443	2607	2626	Exón 18	GTTGT CGCAG CTGTT TTAAT	77	7842	7861	6-8-6	461
599504	2608	2627	Exón 18	TGTTG TCGCA GCTGT TTTAA	89	7843	7862	3-10-7	395
599444	2608	2627	Exón 18	TGTTG TCGCA GCTGT TTTAA	69	7843	7862	6-8-6	395

599505	2609	2628	Exón 19/ Repetición	TTGTTGTCGCAGCTGTTTTA	83	n/a	n/a	3-10-7	462
599445	2609	2628	Exón 19/ Repetición	TTGTTGTCGCAGCTGTTTTA	85	n/a	n/a	6-8-6	462
599506	2610	2629	Exón 19/ Repetición	TTTGTTGTCGCAGCTGTTTT	89	n/a	n/a	3-10-7	463
599446	2610	2629	Exón 19/ Repetición	TTTGTTGTCGCAGCTGTTTT	85	n/a	n/a	6-8-6	463
599507	2611	2630	Exón 19/ Repetición	TTTTGTTGTCGCAGCTGTTT	82	n/a	n/a	3-10-7	464
599447	2611	2630	Exón 19/ Repetición	TTTTGTTGTCGCAGCTGTTT	83	n/a	n/a	6-8-6	464

599508	2612	2631	Exón 19/ Repetición	TTTTTGTTGTCGCAGCTGTT	90	n/a	n/a	3-10-7	465
599448	2612	2631	Exón 19/ Repetición	TTTTTGTTGTCGCAGCTGTT	87	n/a	n/a	6-8-6	465

Ejemplo 119: Inhibición antisentido del Factor B del Complemento (CFB) humano en células HepG2 mediante gapmers de MOE

Se diseñaron oligonucleótidos antisentido adicionales para dirigirse a un ácido nucleico del Factor B del Complemento (CFB) humano y se analizaron para ver sus efectos en el ARNm de CFB in vitro. Los oligonucleótidos antisentido se analizaron en una serie de experimentos que tenían condiciones de cultivo similares. Los resultados de cada experimento se presentan en tablas separadas que se muestran más adelante. Las células HepG2 cultivadas a una densidad de 20.000 células por pocillo se transfectaron utilizando electroporación con 2000 nM de oligonucleótido antisentido.

Luego de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, el ARN se aisló de las células y los niveles de ARNm de CFB se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó un conjunto de cebador y sonda de RTS3459 humano para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de CFB se ajustaron de acuerdo con el contenido de ARN total, tal como se midió con RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB, con respecto a las células de control no tratadas.

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos recientemente diseñados en las Tablas a continuación se diseñaron como gapmers 4-8-5 MOE, 5-8-5 MOE, 5-9-5 MOE, 5-10-5 MOE, 6-7-6-MOE, 3-10-5 MOE, or 6-8-6 MOE .

Los gapmers 4-8-5 de MOE tienen una longitud de 17 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende ocho 2’-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprenden cuatro y cinco nucleósidos, respectivamente. Los gapmers 5-8-5 de MOE tienen una longitud de 18 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende ocho 2’-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprende cinco

nucleósidos cada una. Los gapmers 5-9-5 de MOE tienen una longitud de 19 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende nueve 2’-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprende cinco nucleósidos cada una. Los gapmers de MOE 5-10-5 tienen una longitud de 20 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende diez 2’-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprenden cinco nucleósidos cada una. Los gapmers de MOE 3-10-5 tienen una longitud de 18 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende diez 2’-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprenden tres y cinco nucleósidos, respectivamente. Los gapmers 6-7-6 de MOE tienen una longitud de 19 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende siete 2’-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprende seis nucleósidos cada una. Los gapmers 6-8-6 de MOE tienen una longitud de 20 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende ocho 2’-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprende seis nucleósidos cada una. Cada nucleósido en el segmento de ala

5’ y cada nucleósido en el segmento de ala 3’ tiene una modificación 2'-MOE. Los enlaces internucleósidos en cada gapmer son enlaces de fosforotioato (P=S). Todos los residuos de citosina en cada gapmer son 5-metilcitosinas.

"Sitio de inicio" indica el nucleósido más cercano a 5’ al cual el gapmer se dirige en la secuencia génica humana. "Sitio de detención" indica el nucleósido más cercano a 3’ al cual el gapmer se dirige en la secuencia génica humana. Cada gapmer enumerado en las Tablas que figuran más adelante se dirige ya sea al ARNm de CFB humano, designado en la presente como SEQ ID NO: 1 (n.° de acceso GENBANK NM_001710.5) o a la secuencia genómica de CFB, designada en la presente como SEQ ID NO: 2 (n.° de acceso GENBANK NT_007592.15 truncada a partir de los nucleótidos 31852000 a 31861000), o ambos. "n/a" indica que el oligonucleótido antisentido no se dirige a esa secuencia génica particular con 100 % de complementariedad.

Tabla 138

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2

N.° ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO: 1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio SEQ ID NO: 2	Sitio de detención SEQ ID NO: 2	Motivo	SEQ ID NO:
599160	2560	2577	Exón 18	CCCCTTATAGAAAACCCA	26	7795	7812	5-8-5	740
599161	2561	2578	Exón 18	ACCCCTTATAGAAAACCC	20	7796	7813	5-8-5	741
599162	2562	2579	Exón 18	AACCCCTTATAGAAAACC	12	7797	7814	5-8-5	742
599163	2563	2580	Exón 18	AAACCCCTTATAGAAAAC	11	7798	7815	5-8-5	743
599164	2564	2581	Exón 18	GAAACCCCTTATAGAAAA	11	7799	7816	5-8-5	744

599165	2566	2583	Exón 18	AGGAAACCCCTTATAGAA	0	7801	7818	5-8-5	745
599166	2567	2584	Exón 18	CAGGAAACCCCTTATAGA	12	7802	7819	5-8-5	746
599167	2568	2585	Exón 18	GCAGGAAACCCCTTATAG	14	7803	7820	5-8-5	747
599168	2569	2586	Exón 18	AGCAGGAAACCCCTTATA	16	7804	7821	5-8-5	748
599169	2570	2587	Exón 18	CAGCAGGAAACCCCTTAT	24	7805	7822	5-8-5	749
599170	2571	2588	Exón 18	CCAGCAGGAAACCCCTTA	37	7806	7823	5-8-5	750
599171	2572	2589	Exón 18	TCCAGCAGGAAACCCCTT	30	7807	7824	5-8-5	751
599172	2573	2590	Exón 18	GTCCAGCAGGAAACCCCT	43	7808	7825	5-8-5	752
599173	2574	2591	Exón 18	TGTCCAGCAGGAAACCCC	47	7809	7826	5-8-5	753

599174	2575	2592	Exón 18	CTGTCCAGCAGGAAACCC	27	7810	7827	5-8-5	754
599175	2576	2593	Exón 18	CCTGTCCAGCAGGAAACC	30	7811	7828	5-8-5	755
599176	2577	2594	Exón 18	CCCTGTCCAGCAGGAAAC	34	7812	7829	5-8-5	756
599177	2578	2595	Exón 18	CCCCTGTCCAGCAGGAAA	41	7813	7830	5-8-5	757
599178	2580	2597	Exón 18	CGCCCCTGTCCAGCAGGA	67	7815	7832	5-8-5	758
599179	2581	2598	Exón 18	ACGCCCCTGTCCAGCAGG	61	7816	7833	5-8-5	759
599180	2582	2599	Exón 18	CACGCCCCTGTCCAGCAG	62	7817	7834	5-8-5	760
599181	2583	2600	Exón 18	CCACGCCCCTGTCCAGCA	63	7818	7835	5-8-5	761
599128	2584	2600	Exón 18	CCACGCCCCTGTCCAGC	55	7819	7835	4-8-5	649

599182	2584	2601	Exón 18	CCCACGCCCTGTCCAGC	58	7819	7836	5-8-5	762
599129	2585	2601	Exón 18	CCCACGCCCTGTCCAG	41	7820	7836	4-8-5	650
599183	2585	2602	Exón 18	TCCCACGCCCCTGTCCAG	43	7820	7837	5-8-5	763
599130	2586	2602	Exón 18	TCCCACGCCCCTGTCCA	46	7821	7837	4-8-5	651
599184	2586	2603	Exón 18	ATCCCACGCCCCTGTCCA	32	7821	7838	5-8-5	764
599131	2587	2603	Exón 18	ATCCCACGCCCCTGTCC	30	7822	7838	4-8-5	652
599185	2587	2604	Exón 18	AATCCCACGCCCCTGTCC	35	7822	7839	5-8-5	765
599132	2588	2604	Exón 18	AATCCCACGCCCCTGTC	52	7823	7839	4-8-5	653
599186	2588	2605	Exón 18	CAATCCCACGCCCCTGTC	55	7823	7840	5-8-5	766

599133	2589	2605	Exón 18	CAATCCCACGCCCCTGT	66	7824	7840	4-8-5	654
599187	2589	2606	Exón 18	TCAATCCCACGCCCCTGT	72	7824	7841	5-8-5	767
599134	2590	2606	Exón 18	TCAATCCCACGCCCCTG	80	7825	7841	4-8-5	655
599188	2590	2607	Exón 18	TTCAATCCCACGCCCCTG	92	7825	7842	5-8-5	768
599135	2591	2607	Exón 18	TTCAATCCCACGCCCCT	61	7826	7842	4-8-5	656
599189	2591	2608	Exón 18	ATTCAATCCCACGCCCCT	52	7826	7843	5-8-5	769
599136	2592	2608	Exón 18	ATTCAATCCCACGCCCC	68	7827	7843	4-8-5	657
599190	2592	2609	Exón 18	AATTCAATCCCACGCCCC	62	7827	7844	5-8-5	770
599137	2593	2609	Exón 18	AATTCAATCCCACGCCC	51	7828	7844	4-8-5	658

599191	2593	2610	Exón 18	TAATTCAATCCCACGCCC	54	7828	7845	5-8-5	771
599138	2594	2610	Exón 18	TAATTCAATCCCACGCC	71	7829	7845	4-8-5	659
599192	2594	2611	Exón 18	TTAATTCAATCCCACGCC	66	7829	7846	5-8-5	772
599139	2595	2611	Exón 18	TTAATTCAATCCCACGC	80	7830	7846	4-8-5	660
599193	2595	2612	Exón 18	TTTAATTCAATCCCACGC	74	7830	7847	5-8-5	773
599140	2596	2612	Exón 18	TTTAATTCAATCCCACG	66	7831	7847	4-8-5	786
599194	2596	2613	Exón 18	TTTTAATTCAATCCCACG	66	7831	7848	5-8-5	774
599141	2597	2613	Exón 18	TTTTAATTCAATCCCAC	63	7832	7848	4-8-5	662
599195	2597	2614	Exón 18	GTTTTAATTCAATCCCAC	86	7832	7849	5-8-5	775

599142	2598	2614	Exón 18	GTTTTAATTCAATCCCA	69	7833	7849	4-8-5	663
599196	2598	2615	Exón 18	TGTTTTAATTCAATCCCA	82	7833	7850	5-8-5	776
599143	2599	2615	Exón 18	TGTTTTAATTCAATCCC	59	7834	7850	4-8-5	664
599197	2599	2616	Exón 18	CTGTTTTAATTCAATCCC	79	7834	7851	5-8-5	777
599144	2600	2616	Exón 18	CTGTTTTAATTCAATCC	52	7835	7851	4-8-5	665
599198	2600	2617	Exón 18	GCTGTTTTAATTCAATCC	86	7835	7852	5-8-5	778
599145	2601	2617	Exón 18	GCTGTTTTAATTCAATC	53	7836	7852	4-8-5	666
599199	2601	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTCAATC	72	7836	7853	5-8-5	779
599146	2602	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTCAAT	42	7837	7853	4-8-5	667

599200	2602	2619	Exón 18	CAGCTGTTTTAATTCAAT	76	7837	7854	5-8-5	780
599147	2603	2619	Exón 18	CAGCTGTTTAATTCAA	55	7838	7854	4-8-5	668
599201	2603	2620	Exón 18	GCAGCTGTTTTAATTCAA	87	7838	7855	5-8-5	781
532917	2604	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	93	7839	7858	5-10-5	317
599148	2604	2620	Exón 18	GCAGCTGTTTTAATTCA	84	7839	7855	4-8-5	669
599202	2604	2621	Exón 18	CGCAGCTGTTTTAATTCA	89	7839	7856	5-8-5	782
599149	2605	2621	Exón 18	CGCAGCTGTTTTAATTC	92	7840	7856	4-8-5	670
599203	2605	2622	Exón 18	TCGCAGCTGTTTTAATTC	90	7840	7857	5-8-5	783
599150	2606	2622	Exón 18	TCGCAGCTGTTTTAATT	75	7841	7857	4-8-5	671

599151	2607	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAAT	80	7842	7858	4-8-5	672
599152	2608	2624	Exón 18	TGTCGCAGCTGTTTTAA	76	7843	7859	4-8-5	673
599153	2609	2625	Exón 18	TTGTCGCAGCTGTTTTA	56	7844	7860	4-8-5	674
599154	2610	2626	Exón 18	GTTGTCGCAGCTGTTTT	85	7845	7861	4-8-5	675
599155	2611	2627	Exón 18	TGTTGTCGCAGCTGTTT	89	7846	7862	4-8-5	676
599156	2612	2628	Exón 18/ Repetición	TTGTTGTCGCAGCTGTT	83	n/a	n/a	4-8-5	813
599157	2613	2629	Exón 18/ Repeat	TTTGTTGTCGCAGCTGT	78	n/a	n/a	4-8-5	678
599158	2614	2630	Exón 18/ Repetición	TTTTGTTGTCGCAGCTG	83	n/a	n/a	4-8-5	679

599159	2615	2631	Exón 18/ Repetición	TTTTTGTTGTCGCAGCT	65	n/a	n/a	4-8-5	680
599204	2606	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATT	83	7841	7858	5-8-5	784

Tabla 139

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2

N.º ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO: 1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio SEQ ID NO: 2	Sitio de detención SEQ ID NO: 2	Motivo	SEQ ID NO:
599509	2552	2570	Exón 18	TAGAAAACCCAAATCCTCA	45	7787	7805	6-7-6	681
599213	2553	2570	Exón 18	TAGAAAACCCAAATCCTC	89	7788	7805	3-10-5	785

599273	2553	2571	Exón 18	ATAGAAA ACCCAAA TCCTC	85	7788	7806	6-7-6	682
599214	2554	2571	Exón 18	ATAGAAA ACCCAAA TCCT	79	7789	7806	3-10-5	786
599274	2554	2572	Exón 18	TATAGAA AACCCAA ATCCT	75	7789	7807	6-7-6	683
599215	2555	2572	Exón 18	TATAGAA AACCCAA ATCC	81	7790	7807	3-10-5	787
599216	2556	2573	Exón 18	TTATAGA AAACCCA AATC	87	7791	7808	3-10-5	788
599275	2556	2574	Exón 18	CTTATAG AAAACCC AAATC	84	7791	7809	6-7-6	684
599217	2557	2574	Exón 18	CTTATAG AAAACCC AAAT	84	7792	7809	3-10-5	789
599276	2557	2575	Exón 18	CCTTATA GAAAACC CAAAT	68	7792	7810	6-7-6	685
599218	2558	2575	Exón 18	CCTTATA GAAAACC CAAA	82	7793	7810	3-10-5	790

599277	2558	2576	Exón 18	CCCTTATAGAAAACCCAAA	82	7793	7811	6-7-6	686
599219	2559	2576	Exón 18	CCCTTATAGAAAACCCAA	81	7794	7811	3-10-5	791
599278	2559	2577	Exón 18	CCCCTTATAGAAAACCCAA	84	7794	7812	6-7-6	687
599220	2560	2577	Exón 18	CCCCTTATAGAAAACCCA	92	7795	7812	3-10-5	740
599279	2560	2578	Exón 18	ACCCCTTATAGAAAACCCA	92	7795	7813	6-7-6	688
599221	2561	2578	Exón 18	ACCCCTTATAGAAAACCC	93	7796	7813	3-10-5	741
599280	2561	2579	Exón 18	AACCCCTTATAGAAAACCC	90	7796	7814	6-7-6	689
599222	2562	2579	Exón 18	AACCCCTTATAGAAAACC	95	7797	7814	3-10-5	742
599223	2563	2580	Exón 18	AAACCCCTTATAGAAAAC	93	7798	7815	3-10-5	743

599224	2564	2581	Exón 18	GAAACCCCTTATAGAAAA	90	7799	7816	3-10-5	744
599225	2566	2583	Exón 18	AGGAAACCCCTTATAGAA	93	7801	7818	3-10-5	745
599226	2567	2584	Exón 18	CAGGAAACCCCTTATAGA	95	7802	7819	3-10-5	746
599227	2568	2585	Exón 18	GCAGGAAACCCCTTATAG	94	7803	7820	3-10-5	747
599228	2569	2586	Exón 18	AGCAGGAAACCCCTTATA	96	7804	7821	3-10-5	748
599229	2570	2587	Exón 18	CAGCAGGAAACCCCTTAT	92	7805	7822	3-10-5	749
599230	2571	2588	Exón 18	CCAGCAGGAAACCCCTTA	88	7806	7823	3-10-5	750
599231	2572	2589	Exón 18	TCCAGCAGGAAACCCCTT	83	7807	7824	3-10-5	751
599232	2573	2590	Exón 18	GTCCAGCAGGAAACCCCT	89	7808	7825	3-10-5	752

599233	2574	2591	Exón 18	TGTCCAG CAGGAAA CCCC	83	7809	7826	3-10-5	753
599234	2575	2592	Exón 18	CTGTCCA GCAGGAA ACCC	88	7810	7827	3-10-5	754
599235	2576	2593	Exón 18	CCTGTCC AGCAGGA AACC	91	7811	7828	3-10-5	755
599236	2577	2594	Exón 18	CCCTGTC CAGCAGG AAAC	90	7812	7829	3-10-5	756
599237	2578	2595	Exón 18	CCCCTGT CCAGCAG GAAA	34	7813	7830	3-10-5	757
599238	2580	2597	Exón 18	CGCCCCT GTCCAGC AGGA	14	7815	7832	3-10-5	758
599239	2581	2598	Exón 18	ACGCCCC TGTCCAG CAGG	10	7816	7833	3-10-5	759
599240	2582	2599	Exón 18	CACGCCC CTGTCCA GCAG	26	7817	7834	3-10-5	760
599241	2583	2600	Exón 18	CCACGCC CCTGTCC AGCA	11	7818	7835	3-10-5	761

599242	2584	2601	Exón 18	CCCACGCCCTGTCCAGC	24	7819	7836	3-10-5	762
599243	2585	2602	Exón 18	TCCCACGCCCCTGTCCAG	23	7820	7837	3-10-5	763
599244	2586	2603	Exón 18	ATCCCACGCCCCTGTCCA	29	7821	7838	3-10-5	764
599245	2587	2604	Exón 18	AATCCCACGCCCCTGTCC	11	7822	7839	3-10-5	765
599246	2588	2605	Exón 18	CAATCCCACGCCCCTGTC	0	7823	7840	3-10-5	766
599247	2589	2606	Exón 18	TCAATCCCACGCCCCTGT	21	7824	7841	3-10-5	767
599248	2590	2607	Exón 18	TTCAATCCCACGCCCCTG	0	7825	7842	3-10-5	768
599249	2591	2608	Exón 18	ATTCAATCCCACGCCCCT	9	7826	7843	3-10-5	769
599250	2592	2609	Exón 18	AATTCAATCCCACGCCCC	4	7827	7844	3-10-5	770

599251	2593	2610	Exón 18	TAATTCAATCCCACGCCC	12	7828	7845	3-10-5	771
599252	2594	2611	Exón 18	TTAATTCAATCCCACGCC	2	7829	7846	3-10-5	772
599253	2595	2612	Exón 18	TTTAATTCAATCCCACGC	28	7830	7847	3-10-5	773
599254	2596	2613	Exón 18	TTTTAATTCAATCCCACG	27	7831	7848	3-10-5	774
599255	2597	2614	Exón 18	GTTTTAATTCAATCCCAC	38	7832	7849	3-10-5	775
599256	2598	2615	Exón 18	TGTTTTAATTCAATCCCA	36	7833	7850	3-10-5	776
599257	2599	2616	Exón 18	CTGTTTTAATTCAATCCC	48	7834	7851	3-10-5	777
599258	2600	2617	Exón 18	GCTGTTTTAATTCAATCC	19	7835	7852	3-10-5	778
599259	2601	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTCAATC	36	7836	7853	3-10-5	779

599260	2602	2619	Exón 18	CAGCTGTTTTAATTCAAT	58	7837	7854	3-10-5	780
599261	2603	2620	Exón 18	GCAGCTGTTTTAATTCAA	35	7838	7855	3-10-5	781
532917	2604	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	96	7839	7858	5-10-5	317
599262	2604	2621	Exón 18	CGCAGCTGTTTTAATTCA	52	7839	7856	3-10-5	782
599263	2605	2622	Exón 18	TCGCAGCTGTTTTAATTC	66	7840	7857	3-10-5	783
599264	2606	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATT	48	7841	7858	3-10-5	784
599265	2607	2624	Exón 18	TGTCGCAGCTGTTTTAAT	46	7842	7859	3-10-5	792
599205	2607	2624	Exón 18	TGTCGCAGCTGTTTTAAT	83	7842	7859	5-8-5	792
599266	2608	2625	Exón 18	TTGTCGCAGCTGTTTTAA	76	7843	7860	3-10-5	793

599206	2608	2625	Exón 18	TTGTCGCAGCTGTTTTAA	90	7843	7860	5-8-5	793
599267	2609	2626	Exón 18	GTTGTCGCAGCTGTTTTA	53	7844	7861	3-10-5	794
599207	2609	2626	Exón 18	GTTGTCGCAGCTGTTTTA	82	7844	7861	5-8-5	794
599268	2610	2627	Exón 18	TGTTGTCGCAGCTGTTTT	58	7845	7862	3-10-5	795
599208	2610	2627	Exón 18	TGTTGTCGCAGCTGTTTT	70	7845	7862	5-8-5	795
599269	2611	2628	Exón 18/Repetición	TTGTTGTCGCAGCTGTTT	38	n/a	n/a	3-10-5	796
599209	2611	2628	Exón 18/Repetición	TTGTTGTCGCAGCTGTTT	50	n/a	n/a	5-8-5	796
599270	2612	2629	Exón 18/Repetición	TTTGTTGTCGCAGCTGTT	46	n/a	n/a	3-10-5	797

599210	2612	2629	Exón 18 /Repetición	TTTGTTGTCGCAGCTGTT	76	n/a	n/a	5-8-5	797
599271	2613	2630	Exón 18 /Repetición	TTTTGTTGTCGCAGCTGT	64	n/a	n/a	3-10-5	798
599211	2613	2630	Exón 18 /Repetición	TTTTGTTGTCGCAGCTGT	78	n/a	n/a	5-8-5	798
599272	2614	2631	Exón 18 /Repetición	TTTTTGTTGTCGCAGCTG	89	n/a	n/a	3-10-5	799
599212	2614	2631	Exón 18 /Repetición	TTTTTGTTGTCGCAGCTG	84	n/a	n/a	5-8-5	799

Tabla 140

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2

N.° ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO: 1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio SEQ ID NO: 2	Sitio de detención SEQ ID NO: 2	Motivo	SEQ ID NO:
599511	2552	2571	Exón 18	ATAGAAAACCCAAATCCTCA	38	7787	7806	6-8-6	410
599389	2553	2572	Exón 18	TATAGAAAACCCAAATCCTC	80	7788	7807	6-8-6	411
599390	2554	2573	Exón 18	TTATAGAAAACCCAAATCCT	92	7789	7808	6-8-6	412
599391	2555	2574	Exón 18	CTTATAGAAAACCCAAATCC	90	7790	7809	6-8-6	413
599392	2556	2575	Exón 18	CCTTATAGAAAACCCAAATC	87	7791	7810	6-8-6	414

599393	2557	2576	Exón 18	CCCTTATAGAAAACCCAAAT	87	7792	7811	6-8-6	415
599394	2558	2577	Exón 18	CCCCTTATAGAAAACCCAAA	74	7793	7812	6-8-6	416
599395	2559	2578	Exón 18	ACCCCTTATAGAAAACCCAA	78	7794	7813	6-8-6	417
599396	2560	2579	Exón 18	AACCCCTTATAGAAAACCCA	77	7795	7814	6-8-6	418
599397	2561	2580	Exón 18	AAACCCCTTATAGAAAACCC	89	7796	7815	6-8-6	419
599398	2562	2581	Exón 18	GAAACCCCTTATAGAAAACC	90	7797	7816	6-8-6	420
599399	2563	2582	Exón 18	GGAAACCCCTTATAGAAAAC	91	7798	7817	6-8-6	421
599400	2564	2583	Exón 18	AGGAAACCCCTTATAGAAAA	88	7799	7818	6-8-6	422
599401	2565	2584	Exón 18	CAGGAAACCCCTTATAGAAA	85	7800	7819	6-8-6	423

599402	2566	2585	Exón 18	GCAGGAA ACCCCTT ATAGAA	77	7801	7820	6-8-6	424
599403	2567	2586	Exón 18	AGCAGGA AACCCCT TATAGA	85	7802	7821	6-8-6	425
599404	2568	2587	Exón 18	CAGCAGG AAACCCC TTATAG	90	7803	7822	6-8-6	426
599405	2569	2588	Exón 18	CCAGCAG GAAACCC CTTATA	89	7804	7823	6-8-6	427
599406	2570	2589	Exón 18	TCCAGCA GGAAACC CCTTAT	72	7805	7824	6-8-6	428
599407	2571	2590	Exón 18	GTCCAGC AGGAAAC CCCTTA	87	7806	7825	6-8-6	237
599408	2572	2591	Exón 18	TGTCCAG CAGGAAA CCCCTT	87	7807	7826	6-8-6	429
599409	2573	2592	Exón 18	CTGTCCA GCAGGAA ACCCCT	83	7808	7827	6-8-6	430
599410	2574	2593	Exón 18	CCTGTCC AGCAGGA AACCCC	88	7809	7828	6-8-6	431

599411	2575	2594	Exón 18	CCCTGTC CAGCAGG AAACCC	45	7810	7829	6-8-6	432
599412	2576	2595	Exón 18	CCCCTGT CCAGCAG GAAACC	66	7811	7830	6-8-6	433
599413	2577	2596	Exón 18	GCCCCTG TCCAGCA GGAAAC	92	7812	7831	6-8-6	238
599414	2578	2597	Exón 18	CGCCCCT GTCCAGC AGGAAA	92	7813	7832	6-8-6	434
599415	2579	2598	Exón 18	ACGCCCC TGTCCAG CAGGAA	87	7814	7833	6-8-6	435
599416	2580	2599	Exón 18	CACGCCC CTGTCCA GCAGGA	91	7815	7834	6-8-6	436
599417	2581	2600	Exón 18	CCACGCC CCTGTCC AGCAGG	84	7816	7835	6-8-6	437
599357	2582	2600	Exón 18	CCACGCC CCTGTCC AGCAG	88	7817	7835	5-9-5	708
599418	2582	2601	Exón 18	CCCACGC CCCTGTC CAGCAG	85	7817	7836	6-8-6	438

599358	2583	2601	Exón 18	CCCACGCCCCTGTCCAGCA	86	7818	7836	5-9-5	709
599419	2583	2602	Exón 18	TCCCACGCCCCTGTCCAGCA	91	7818	7837	6-8-6	833
599359	2584	2602	Exón 18	TCCCACGCCCCTGTCCAGC	85	7819	7837	5-9-5	834
599420	2584	2603	Exón 18	ATCCCACGCCCCTGTCCAGC	91	7819	7838	6-8-6	440
599360	2585	2603	Exón 18	ATCCCACGCCCCTGTCCAG	89	7820	7838	5-9-5	711
599421	2585	2604	Exón 18	AATCCCACGCCCCTGTCCAG	87	7820	7839	6-8-6	441
599361	2586	2604	Exón 18	AATCCCACGCCCCTGTCCA	89	7821	7839	5-9-5	712
599422	2586	2605	Exón 18	CAATCCCACGCCCCTGTCCA	90	7821	7840	6-8-6	442
599362	2587	2605	Exón 18	CAATCCCACGCCCCTGTCC	94	7822	7840	5-9-5	713

599423	2587	2606	Exón 18	TCAATCCCACGCCCCTGTCC	85	7822	7841	6-8-6	841
599363	2588	2606	Exón 18	TCAATCCCACGCCCCTGTC	88	7823	7841	5-9-5	714
599424	2588	2607	Exón 18	TTCAATCCCACGCCCCTGTC	88	7823	7842	6-8-6	444
599364	2589	2607	Exón 18	TTCAATCCCACGCCCCTGT	88	7824	7842	5-9-5	715
599425	2589	2608	Exón 18	ATTCAATCCCACGCCCCTGT	68	7824	7843	6-8-6	445
599365	2590	2608	Exón 18	ATTCAATCCCACGCCCCTG	48	7825	7843	5-9-5	716
599426	2590	2609	Exón 18	AATTCAATCCCACGCCCCTG	55	7825	7844	6-8-6	446
599366	2591	2609	Exón 18	AATTCAATCCCACGCCCCT	28	7826	7844	5-9-5	717
599427	2591	2610	Exón 18	TAATTCAATCCCACGCCCCT	13	7826	7845	6-8-6	849

599367	2592	2610	Exón 18	TAATTCA ATCCCAC GCCCC	21	7827	7845	5-9-5	718
599428	2592	2611	Exón 18	TTAATTC AATCCCA CGCCCC	39	7827	7846	6-8-6	448
599368	2593	2611	Exón 18	TTAATTC AATCCCA CGCCC	20	7828	7846	5-9-5	719
599429	2593	2612	Exón 18	TTTAATT CAATCCC ACGCCC	18	7828	7847	6-8-6	449
599369	2594	2612	Exón 18	TTTAATT CAATCCC ACGCC	78	7829	7847	5-9-5	720
599430	2594	2613	Exón 18	TTTTAAT TCAATCC CACGCC	24	7829	7848	6-8-6	450
599370	2595	2613	Exón 18	TTTTAAT TCAATCC CACGC	25	7830	7848	5-9-5	721
599431	2595	2614	Exón 18	GTTTTAA TTCAATC CCACGC	30	7830	7849	6-8-6	451
599371	2596	2614	Exón 18	GTTTTAA TTCAATC CCACG	84	7831	7849	5-9-5	722

599432	2596	2615	Exón 18	TGTTTTA ATTCAAT CCCACG	29	7831	7850	6-8-6	452
599372	2597	2615	Exón 18	TGTTTTA ATTCAAT CCCAC	83	7832	7850	5-9-5	723
599373	2598	2616	Exón 18	CTGTTTT AATTCAA TCCCA	81	7833	7851	5-9-5	724
599374	2599	2617	Exón 18	GCTGTTT TAATTCA ATCCC	26	7834	7852	5-9-5	725
599375	2600	2618	Exón 18	AGCTGTT TTAATTC AATCC	26	7835	7853	5-9-5	726
599376	2601	2619	Exón 18	CAGCTGT TTTAATT CAATC	62	7836	7854	5-9-5	727
599377	2602	2620	Exón 18	GCAGCTG TTTTAAT TCAAT	21	7837	7855	5-9-5	728
599378	2603	2621	Exón 18	CGCAGCT GTTTTAA TTCAA	90	7838	7856	5-9-5	729
532917	2604	2623	Exón 18	GTCGCAG CTGTTTT AATTCA	95	7839	7858	5-10-5	867

599379	2604	2622	Exón 18	TCGCAGCTGTTTTAATTCA	88	7839	7857	5-9-5	730
599380	2605	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTC	37	7840	7858	5-9-5	869
599381	2606	2624	Exón 18	TGTCGCAGCTGTTTTAATT	33	7841	7859	5-9-5	732
599382	2607	2625	Exón 18	TTGTCGCAGCTGTTTTAAT	81	7842	7860	5-9-5	733
599383	2608	2626	Exón 18	GTTGTCGCAGCTGTTTTAA	54	7843	7861	5-9-5	734
599384	2609	2627	Exón 18	TGTTGTCGCAGCTGTTTTA	85	7844	7862	5-9-5	873
599385	2610	2628	Exón 18/ Repetición	TTGTTGTCGCAGCTGTTTT	59	n/a	n/a	5-9-5	736
599386	2611	2629	Exón 18/ Repetición	TTTGTTGTCGCAGCTGTTT	81	n/a	n/a	5-9-5	737

599387	2612	2630	Exón 18/ Repetición	TTTTGTTGTCGCAGCTGTT	80	n/a	n/a	5-9-5	738
599388	2613	2631	Exón 18/ Repetición	TTTTTGTTGTCGCAGCTGT	84	n/a	n/a	5-9-5	739

Ejemplo 120: Inhibición antisentido del Factor B del Complemento (CFB) humano en células HepG2 mediante gapmers de MOE

Se diseñaron oligonucleótidos antisentido adicionales para dirigirse a un ácido nucleico del Factor B del Complemento (CFB) humano y se analizaron para ver sus efectos en el ARNm de CFB in vitro. Las células HepG2 cultivadas a una densidad de 20.000 células por pocillo se transfectaron utilizando electroporación con 1000 nM de oligonucleótido antisentido. Luego de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, el ARN se aisló de las células y los niveles de ARNm de CFB se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó un conjunto de cebador y sonda de RTS3459 humano para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de CFB se ajustaron de acuerdo con el contenido de ARN total, tal como

se midió con RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB, con respecto a las células de control no tratadas.

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos nuevamente diseñados en las Tablas más adelante fueron diseñados como oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt. Los oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt tienen 16 nucleótidos de longitud donde los nucleósidos tienen una modificación de azúcar de MOE, una modificación de azúcar de (S)-cEt o una modificación de desoxi. La columna "Química" describe las modificaciones de azúcar de cada oligonucleótido. 'k' indica una modificación de azúcar de (S)-cEt; 'd' indica desoxirribosa; y 'e' indica una modificación de MOE.

El "sitio de inicio" indica el nucleósido más cercano a la posición 5', al cual se dirige el gapmer en la secuencia génica humana. El "sitio de terminación" indica el nucleósido más cercano a la posición 3' al cual se dirige el gapmer en la secuencia génica humana. Cada gapmer enumerado en las Tablas que figuran más adelante se dirige ya sea al ARNm de CFB humano, designado en la presente como SEQ ID NO: 1 (n.° de acceso GENBANK NM_001710.5) o a la secuencia genómica de CFB, designada en la presente como SEQ ID NO: 2 (n.° de

acceso GENBANK NT_007592.15 truncada a partir de los nucleótidos 31852000 a 31861000), o ambos. "n/a" indica que el oligonucleótido antisentido no se dirige a esa secuencia génica particular con 100 % de complementariedad.

Tabla 141

Inhibición del ARNm de CFB mediante oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt que se dirigen a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2

N.° ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO: 1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio SEQ ID NO: 2	Sitio de detención SEQ ID NO: 2	Motivo	SEQ ID NO:
599513	2551	2566	Exón 18	AAACCCAAATCCTCAT	11	7786	7801	ekkeekkddddddkk	557
599514	2553	2568	Exón 18	GAAAACCCAAATCCTC	13	7788	7803	ekkeekkddddddkk	801
599515	2555	2570	Exón 18	TAGAAAACCCAAATCC	54	7790	7805	ekkeekkddddddkk	559
599516	2559	2574	Exón 18	CTTATAGAAAACCCAA	16	7794	7809	ekkeekkddddddkk	561

599517	2560	2575	Exón 18	CCTTATAGAAAACCCA	29	7795	7810	ekkeekkddddddddkk	562
599518	2561	2576	Exón 18	CCCTTATAGAAAACCC	55	7796	7811	ekkeekkddddddddkk	563
599519	2562	2577	Exón 18	CCCCTTATAGAAAACC	31	7797	7812	ekkeekkddddddddkk	564
599520	2563	2578	Exón 18	ACCCCTTATAGAAAAC	14	7798	7813	ekkeekkddddddddkk	565
599521	2564	2579	Exón 18	AACCCCTTATAGAAAA	9	7799	7814	ekkeekkddddddddkk	566
599522	2565	2580	Exón 18	AAACCCCTTATAGAAA	8	7800	7815	ekkeekkddddddddkk	567
599523	2566	2581	Exón 18	GAAACCCCTTATAGAA	6	7801	7816	ekkeekkddddddddkk	568
599524	2567	2582	Exón 18	GGAAACCCCTTATAGA	14	7802	7817	ekkeekkddddddddkk	569
599525	2568	2583	Exón 18	AGGAAACCCCTTATAG	6	7803	7818	ekkeekkddddddddkk	570

599526	2569	2584	Exón 18	CAGGAAACCC CTTATA	16	7804	7819	ekkeekk ddddddd kk	571
599527	2570	2585	Exón 18	GCAGGAAACC CCTTAT	0	7805	7820	ekkeekk ddddddd kk	572
599528	2571	2586	Exón 18	AGCAGGAAAC CCCTTA	6	7806	7821	ekkeekk ddddddd kk	573
599529	2572	2587	Exón 18	CAGCAGGAAA CCCCTT	6	7807	7822	ekkeekk ddddddd kk	574
599530	2574	2589	Exón 18	TCCAGCAGGA AACCCC	29	7809	7824	ekkeekk ddddddd kk	576
599531	2575	2590	Exón 18	GTCCAGCAGG AAACCC	64	7810	7825	ekkeekk ddddddd kk	577
599532	2576	2591	Exón 18	TGTCCAGCAG GAAACC	43	7811	7826	ekkeekk ddddddd kk	578
599533	2577	2592	Exón 18	CTGTCCAGCA GGAAAC	25	7812	7827	ekkeekk ddddddd kk	820
599534	2578	2593	Exón 18	CCTGTCCAGC AGGAAA	12	7813	7828	ekkeekk ddddddd kk	580

	599535	2580	2595	Exón 18	CCCCTGTCCAGCAGGA	16	7815	7830	ekkeekkddddddkk	582
5	599536	2582	2597	Exón 18	CGCCCCTGTCCAGCAG	27	7817	7832	ekkeekkddddddkk	584
	599537	2583	2598	Exón 18	ACGCCCCTGTCCAGCA	35	7818	7833	ekkeekkddddddkk	585
10	599538	2584	2599	Exón 18	CACGCCCCTGTCCAGC	26	7819	7834	ekkeekkddddddkk	586
	599539	2585	2600	Exón 18	CCACGCCCCTGTCCAG	33	7820	7835	ekkeekkddddddkk	587
15	599540	2586	2601	Exón 18	CCCACGCCCCTGTCCA	27	7821	7836	ekkeekkddddddkk	588
	599541	2587	2602	Exón 18	TCCCACGCCCCTGTCC	52	7822	7837	ekkeekkddddddkk	589
20	599542	2588	2603	Exón 18	ATCCCACGCCCCTGTC	16	7823	7838	ekkeekkddddddkk	590
	599543	2589	2604	Exón 18	AATCCCACGCCCCTGT	19	7824	7839	ekkeekkddddddkk	591

599544	2590	2605	Exón 18	CAATCCCACG CCCCTG	33	7825	7840	ekkeekk ddddddd kk	831
599545	2591	2606	Exón 18	TCAATCCCAC GCCCCT	24	7826	7841	ekkeekk ddddddd kk	593
599546	2592	2607	Exón 18	TTCAATCCCA CGCCCC	54	7827	7842	ekkeekk ddddddd kk	594
599547	2593	2608	Exón 18	ATTCAATCCC ACGCCC	87	7828	7843	ekkeekk ddddddd kk	595
599548	2594	2609	Exón 18	AATTCAATCC CACGCC	79	7829	7844	ekkeekk ddddddd kk	596
599549	2595	2610	Exón 18	TAATTCAATC CCACGC	62	7830	7845	ekkeekk ddddddd kk	597
599550	2596	2611	Exón 18	TTAATTCAAT CCCACG	52	7831	7846	ekkeekk ddddddd kk	598
599551	2597	2612	Exón 18	TTTAATTCAA TCCCAC	27	7832	7847	ekkeekk ddddddd kk	599
599577	2597	2613	Exón 18	TTTTAATTCA ATCCCAC	90	7832	7848	eeekkdd dddddkk eee	662

	599552	2598	2613	Exón 18	TTTTAATTCAATCCCA	92	7833	7848	ekkeekkddddddkk	600
5	599578	2598	2614	Exón 18	GTTTTAATTCAATCCCA	88	7833	7849	eeekkdddddddkkeee	663
	599553	2599	2614	Exón 18	GTTTTAATTCAATCCC	91	7834	7849	ekkeekkddddddkk	601
10	599579	2599	2615	Exón 18	TGTTTTAATTCAATCCC	79	7834	7850	eeekkdddddddkkeee	664
	599554	2600	2615	Exón 18	TGTTTTAATTCAATCC	90	7835	7850	ekkeekkddddddkk	602
15	599580	2600	2616	Exón 18	CTGTTTTAATTCAATCC	79	7835	7851	eeekkdddddddkkeee	665
	599555	2601	2616	Exón 18	CTGTTTTAATTCAATC	79	7836	7851	ekkeekkddddddkk	846
20	599581	2601	2617	Exón 18	GCTGTTTTAATTCAATC	90	7836	7852	eeekkdddddddkkeee	666
	599556	2602	2617	Exón 18	GCTGTTTTAATTCAAT	47	7837	7852	ekkeekkddddddkk	604

	599582	2602	2618	Exón 18	AGCTGTTTTA ATTCAAT	89	7837	7853	eeekkdd dddddkk eee	849
5	599557	2603	2618	Exón 18	AGCTGTTTTA ATTCAA	67	7838	7853	ekkeekk ddddddd kk	850
	599583	2603	2619	Exón 18	CAGCTGTTTT AATTCAA	49	7838	7854	eeekkdd dddddkk eee	668
10	532917	2604	2623	Exón 18	GTCGCAGCTG TTTTAATTCA	78	7839	7858	eeeeedd ddddddd deeeee	317
	599558	2604	2619	Exón 18	CAGCTGTTTT AATTCA	80	7839	7854	ekkeekk ddddddd kk	606
15	599584	2604	2620	Exón 18	GCAGCTGTTT TAATTCA	66	7839	7855	eeekkdd dddddkk eee	669
	599559	2605	2620	Exón 18	GCAGCTGTTT TAATTC	38	7840	7855	ekkeekk ddddddd kk	607
20	599585	2605	2621	Exón 18	CGCAGCTGTT TTAATTC	80	7840	7856	eeekkdd dddddkk eee	670
	599560	2606	2621	Exón 18	CGCAGCTGTT TTAATT	16	7841	7856	ekkeekk ddddddd kk	608

599586	2606	2622	Exón 18	TCGCAGCTGTTTTAATT	78	7841	7857	eeekkddddddddkkeee	671
599561	2607	2622	Exón 18	TCGCAGCTGTTTTAAT	58	7842	7857	ekkeekkddddddddkk	609
599587	2607	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAAT	81	7842	7858	eeekkddddddddkkeee	672
588860	2608	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAA	92	7843	7858	eekddddddddddkke	610
599562	2608	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAA	78	7843	7858	ekkeekkddddddddkk	610
599588	2608	2624	Exón 18	TGTCGCAGCTGTTTTAA	81	7843	7859	eeekkddddddddkkeee	673
599563	2609	2624	Exón 18	TGTCGCAGCTGTTTTA	86	7844	7859	ekkeekkddddddddkk	611
599589	2609	2625	Exón 18	TTGTCGCAGCTGTTTTA	75	7844	7860	eeekkddddddddkkeee	674
599564	2610	2625	Exón 18	TTGTCGCAGCTGTTTT	75	7845	7860	ekkeekkddddddddkk	612

599590	2610	2626	Exón 18	GTTGTCGCAG CTGTTTT	88	7845	7861	eeekkddddddddkkeee	675
599565	2611	2626	Exón 18	GTTGTCGCAG CTGTTT	65	7846	7861	ekkeekkddddddddkk	613
599591	2611	2627	Exón 18	TGTTGTCGCA GCTGTTT	94	7846	7862	eeekkddddddddkkeee	676
599566	2612	2627	Exón 18	TGTTGTCGCA GCTGTT	72	7847	7862	ekkeekkddddddddkk	614
599592	2612	2628	Exón 18/ Repetición	TTGTTGTCGC AGCTGTT	90	n/a	n/a	eeekkddddddddkkeee	677
599567	2613	2628	Exón 18/ Repetición	TTGTTGTCGC AGCTGT	82	n/a	n/a	ekkeekkddddddddkk	615
599593	2613	2629	Exón 18/ Repetición	TTTGTTGTCG CAGCTGT	95	n/a	n/a	eeekkddddddddkkeee	678
599568	2614	2629	Exón 18/ Repetición	TTTGTTGTCG CAGCTG	92	n/a	n/a	ekkeekkddddddddkk	616

599594	2614	2630	Exón 18/ Repetición	TTTTGTTGTCGCAGCTG	86	n/a	n/a	eeekkddddddkkeee	679
599569	2615	2630	Exón 18/ Repetición	TTTTGTTGTCGCAGCT	89	n/a	n/a	ekkeekkddddddkk	617
599595	2615	2631	Exón 18/ Repetición	TTTTTGTTGTCGCAGCT	76	n/a	n/a	eeekkddddddkkeee	680
599570	2616	2631	Exón 18/ Repetición	TTTTTGTTGTCGCAGC	95	n/a	n/a	ekkeekkddddddkk	618

Ejemplo 121: Inhibición antisentido del Factor B del Complemento (CFB) humano en células HepG2 mediante gapmers de MOE

Se diseñaron oligonucleótidos antisentido adicionales para dirigirse a un ácido nucleico del Factor B del Complemento (CFB) humano y se analizaron para ver sus efectos en el ARNm de CFB in vitro. Los oligonucleótidos antisentido se analizaron en una serie de experimentos que tenían

condiciones de cultivo similares. Los resultados de cada experimento se presentan en tablas separadas que se muestran más adelante. Las células HepG2 cultivadas a una densidad de 20.000 células por pocillo se transfectaron utilizando electroporación con 500 nM de oligonucleótido antisentido. Luego de un período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, el ARN se aisló de las células y los niveles de ARNm de CFB se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó un conjunto de cebador y sonda de RTS3459 humano para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de CFB se ajustaron de acuerdo con el contenido de ARN total, tal como se midió con RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB, con respecto a las células de control no tratadas.

Los oligonucleótidos antisentido quiméricos recientemente diseñados en las Tablas a continuación se diseñaron como oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt o como los gapmers 5-8-5 MOE, 5-9-5 MOE, 5-10-5 MOE, 6-7-6- MOE, 3-10-5 MOE, or 6-8-6 MOE .

Los oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt tienen 16 nucleótidos de longitud donde los nucleósidos tienen una modificación de azúcar de MOE, una modificación de azúcar de

(S)-cEt o una modificación de desoxi. La columna "Química" describe las modificaciones de azúcar de cada oligonucleótido. 'k' indica una modificación de azúcar de (S)-cEt; 'd' indica desoxirribosa; y 'e' indica una modificación de MOE.

Los gapmers 5-8-5 de MOE tienen una longitud de 18 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende ocho 2'-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprende cinco nucleósidos cada una. Los gapmers 5-9-5 de MOE tienen una longitud de 19 nucleósidos, donde el segmento de intermedio central comprende nueve 2'-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprende cinco nucleósidos cada una. Los gapmers de MOE 5-10-5 tienen una longitud de 20 nucleósidos, donde el segmento de intermedio central comprende diez 2'-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprenden cinco nucleósidos cada una. Los gapmers de MOE 3-10-5 tienen una longitud de 18 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende diez 2'-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprenden tres y cinco nucleósidos,

respectivamente. Los gapmers 6-7-6 de MOE tienen una longitud de 19 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende siete 2’-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprende seis nucleósidos cada una. Los gapmers 6-8-6 de MOE tienen una longitud de 20 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende ocho 2’-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado por segmentos de ala en la dirección 5' y la dirección 3' que comprende seis nucleósidos cada una. Cada nucleósido en el segmento de ala 5’ y cada nucleósido en el segmento de ala 3’ tiene una modificación 2'-MOE. Los enlaces internucleósidos en cada gapmer son enlaces de fosforotioato (P=S). Todos los residuos de citosina en cada gapmer son 5-metilcitosinas.

"Sitio de inicio" indica el nucleósido más cercano a 5’ al cual el gapmer se dirige en la secuencia génica humana. "Sitio de detención" indica el nucleósido más cercano a 3’ al cual el gapmer se dirige en la secuencia génica humana. Cada gapmer enumerado en las Tablas que figuran más adelante se dirige ya sea al ARNm de CFB humano, designado en la presente como SEQ ID NO: 1 (n.° de acceso GENBANK NM_001710.5) o a la secuencia genómica de CFB, designada en la presente como SEQ ID NO: 2 (n.° de acceso GENBANK NT_007592.15 truncada a partir de los nucleótidos 31852000 a 31861000), o ambos.

"n/a" indica que el oligonucleótido antisentido no se dirige a esa secuencia génica particular con 100 % de complementariedad.

Tabla 142

Inhibición del ARNm de CFB mediante oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt que se dirigen a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2

N.° ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO: 1	Sitio de deten-ción SEQ ID NO: 1	Región objeti-vo	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio SEQ ID NO: 2	Sitio de deten-ción SEQ ID NO: 2	Motivo	SEQ ID NO:
601152	2551	2566	Exón 18	AAACCCAAATCCTCAT	22	7786	7801	eekkddddddddkkee	557
601218	2551	2566	Exón 18	AAACCCAAATCCTCAT	21	7786	7801	ekkkddddddddkeee	557
601153	2552	2567	Exón 18	AAAACCCAAATCCTCA	27	7787	7802	eekkddddddddkkee	800
601219	2552	2567	Exón 18	AAAACCCAAATCCTCA	19	7787	7802	ekkkddddddddkeee	800

601154	2553	2568	Exón 18	GAAAACCCAAATCCTC	23	7788	7803	eekkdddddddkkee	558
601220	2553	2568	Exón 18	GAAAACCCAAATCCTC	24	7788	7803	ekkkddddddkkee	558
601155	2554	2569	Exón 18	AGAAAACCCAAATCCT	20	7789	7804	eekkdddddddkkee	801
601221	2554	2569	Exón 18	AGAAAACCCAAATCCT	0	7789	7804	ekkkddddddkkee	801
601156	2555	2570	Exón 18	TAGAAAACCCAAATCC	11	7790	7805	eekkdddddddkkee	559
601222	2555	2570	Exón 18	TAGAAAACCCAAATCC	23	7790	7805	ekkkddddddkkee	559
601157	2556	2571	Exón 18	ATAGAAAACCCAAATC	9	7791	7806	eekkdddddddkkee	560
601223	2556	2571	Exón 18	ATAGAAAACCCAAATC	0	7791	7806	ekkkddddddkkee	560
601158	2557	2572	Exón 18	TATAGAAAACCCAAAT	0	7792	7807	eekkdddddddkkee	802

601224	2557	2572	Exón 18	TATAGAAAACCCAAAT	0	7792	7807	ekkkddddddddkeee	802
601159	2558	2573	Exón 18	TTATAGAAAACCCAAA	2	7793	7808	eekkddddddddkkee	803
601225	2558	2573	Exón 18	TTATAGAAAACCCAAA	0	7793	7808	ekkkddddddddkeee	803
601160	2559	2574	Exón 18	CTTATAGAAAACCCAA	0	7794	7809	eekkddddddddkkee	561
601226	2559	2574	Exón 18	CTTATAGAAAACCCAA	0	7794	7809	ekkkddddddddkeee	561
601161	2560	2575	Exón 18	CCTTATAGAAAACCCA	1	7795	7810	eekkddddddddkkee	562
601227	2560	2575	Exón 18	CCTTATAGAAAACCCA	14	7795	7810	ekkkddddddddkeee	562
601162	2561	2576	Exón 18	CCCTTATAGAAAACCC	9	7796	7811	eekkddddddddkkee	563
601228	2561	2576	Exón 18	CCCTTATAGAAAACCC	9	7796	7811	ekkkddddddddkeee	563

601163	2562	2577	Exón 18	CCCCTTATAGAAAACC	0	7797	7812	eekkdddddddddkkee	564
601164	2563	2578	Exón 18	ACCCCTTATAGAAAAC	3	7798	7813	eekkdddddddddkkee	565
601165	2564	2579	Exón 18	AACCCCTTATAGAAAA	0	7799	7814	eekkdddddddddkkee	566
601166	2565	2580	Exón 18	AAACCCCTTATAGAAA	0	7800	7815	eekkdddddddddkkee	567
601167	2566	2581	Exón 18	GAAACCCCTTATAGAA	0	7801	7816	eekkdddddddddkkee	568
601168	2567	2582	Exón 18	GGAAACCCCTTATAGA	0	7802	7817	eekkdddddddddkkee	569
601169	2568	2583	Exón 18	AGGAAACCCCTTATAG	0	7803	7818	eekkdddddddddkkee	570
601170	2569	2584	Exón 18	CAGGAAACCCCTTATA	10	7804	7819	eekkdddddddddkkee	571
601171	2570	2585	Exón 18	GCAGGAAACCCCTTAT	9	7805	7820	eekkdddddddddkkee	572

601172	2571	2586	Exón 18	AGCAGGAAACCCCTTA	15	7806	7821	eekkdddddddddkkee	573
601173	2572	2587	Exón 18	CAGCAGGAAACCCCTT	29	7807	7822	eekkdddddddddkkee	574
601174	2573	2588	Exón 18	CCAGCAGGAAACCCCT	25	7808	7823	eekkdddddddddkkee	575
601175	2574	2589	Exón 18	TCCAGCAGGAAACCCC	15	7809	7824	eekkdddddddddkkee	576
601176	2575	2590	Exón 18	GTCCAGCAGGAAACCC	18	7810	7825	eekkdddddddddkkee	577
601177	2576	2591	Exón 18	TGTCCAGCAGGAAACC	10	7811	7826	eekkdddddddddkkee	578
601178	2577	2592	Exón 18	CTGTCCAGCAGGAAAC	11	7812	7827	eekkdddddddddkkee	579
601179	2578	2593	Exón 18	CCTGTCCAGCAGGAAA	19	7813	7828	eekkdddddddddkkee	580
601180	2579	2594	Exón 18	CCCTGTCCAGCAGGAA	7	7814	7829	eekkdddddddddkkee	581

601181	2580	2595	Exón 18	CCCCTGTCCAG CAGGA	3	7815	7830	eekkddd dddddkk ee	582
601182	2581	2596	Exón 18	GCCCCTGTCCA GCAGG	0	7816	7831	eekkddd dddddkk ee	583
601183	2582	2597	Exón 18	CGCCCCTGTCC AGCAG	4	7817	7832	eekkddd dddddkk ee	584
601184	2583	2598	Exón 18	ACGCCCCTGTC CAGCA	14	7818	7833	eekkddd dddddkk ee	585
601185	2584	2599	Exón 18	CACGCCCCTGT CCAGC	26	7819	7834	eekkddd dddddkk ee	586
601186	2585	2600	Exón 18	CCACGCCCCTG TCCAG	8	7820	7835	eekkddd dddddkk ee	587
601187	2586	2601	Exón 18	CCCACGCCCCT GTCCA	18	7821	7836	eekkddd dddddkk ee	588
601188	2587	2602	Exón 18	TCCCACGCCCC TGTCC	20	7822	7837	eekkddd dddddkk ee	589
601189	2588	2603	Exón 18	ATCCCACGCCC CTGTC	12	7823	7838	eekkddd dddddkk ee	590

601190	2589	2604	Exón 18	AATCCCACGCCCCTGT	33	7824	7839	eekkddddddddkkee	591
601191	2590	2605	Exón 18	CAATCCCACGCCCCTG	52	7825	7840	eekkddddddddkkee	592
601192	2591	2606	Exón 18	TCAATCCCACGCCCCT	46	7826	7841	eekkddddddddkkee	593
601193	2592	2607	Exón 18	TTCAATCCCACGCCCC	30	7827	7842	eekkddddddddkkee	594
601194	2593	2608	Exón 18	ATTCAATCCCACGCCC	41	7828	7843	eekkddddddddkkee	595
601195	2594	2609	Exón 18	AATTCAATCCCACGCC	40	7829	7844	eekkddddddddkkee	596
601196	2595	2610	Exón 18	TAATTCAATCCCACGC	71	7830	7845	eekkddddddddkkee	597
601197	2596	2611	Exón 18	TTAATTCAATCCCACG	42	7831	7846	eekkddddddddkkee	598
601198	2597	2612	Exón 18	TTTAATTCAATCCCAC	63	7832	7847	eekkddddddddkkee	599

601199	2598	2613	Exón 18	TTTTAATTCAATCCCA	51	7833	7848	eekkddddddddkkee	600
601200	2599	2614	Exón 18	GTTTTAATTCAATCCC	65	7834	7849	eekkddddddddkkee	601
601201	2600	2615	Exón 18	TGTTTTAATTCAATCC	49	7835	7850	eekkddddddddkkee	602
601202	2601	2616	Exón 18	CTGTTTTAATTCAATC	33	7836	7851	eekkddddddddkkee	603
601203	2602	2617	Exón 18	GCTGTTTTAATTCAAT	63	7837	7852	eekkddddddddkkee	604
601204	2603	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTCAA	69	7838	7853	eekkddddddddkkee	605
532917	2604	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	73	7839	7858	eeeeeddddddddeeeee	317
601205	2604	2619	Exón 18	CAGCTGTTTTAATTCA	51	7839	7854	eekkddddddddkkee	606
601206	2605	2620	Exón 18	GCAGCTGTTTTAATTC	43	7840	7855	eekkddddddddkkee	607

601207	2606	2621	Exón 18	CGCAGCTGTTTTAATT	52	7841	7856	eekkddddddddkkee	608
601208	2607	2622	Exón 18	TCGCAGCTGTTTTAAT	61	7842	7857	eekkddddddddkkee	609
588860	2608	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAA	75	7843	7858	eekddddddddddkke	610
601209	2608	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAA	73	7843	7858	eekkddddddddkkee	610
601210	2609	2624	Exón 18	TGTCGCAGCTGTTTTA	80	7844	7859	eekkddddddddkkee	611
601211	2610	2625	Exón 18	TTGTCGCAGCTGTTTT	64	7845	7860	eekkddddddddkkee	612
601212	2611	2626	Exón 18	GTTGTCGCAGCTGTTT	86	7846	7861	eekkddddddddkkee	613
601213	2612	2627	Exón 18	TGTTGTCGCAGCTGTT	87	7847	7862	eekkddddddddkkee	614
601214	2613	2628	Exón 18/Repetición	TTGTTGTCGCAGCTGT	84	n/a	n/a	eekkddddddddkkee	615

601215	2614	2629	Exón 18 /Repetición	TTTGTTGTCGCAGCTG	78	n/a	n/a	eekkddddddddkkee	616
601216	2615	2630	Exón 18 /Repetición	TTTTGTTGTCGCAGCT	73	n/a	n/a	eekkddddddddkkee	617
601217	2616	2631	Exón 18 /Repetición	TTTTTGTTGTCGCAGC	66	n/a	n/a	eekkddddddddkkee	618

Tabla 143

Inhibición del ARNm de CFB mediante oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt que se dirigen a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2

N.° ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO: 1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio SEQ ID NO: 2	Sitio de detención SEQ ID NO: 2	Motivo	SEQ ID NO:
601284	2551	2566	Exón 18	AAACCCAAATCCTCAT	8	7786	7801	ekkddddddddkkeee	557
601285	2552	2567	Exón 18	AAAACCCAAATCCTCA	15	7787	7802	ekkddddddddkkeee	800

601286	2553	2568	Exón 18	GAAAACCCAA ATCCTC	21	7788	7803	ekkddd dddddk keee	558
601287	2554	2569	Exón 18	AGAAAACCCA AATCCT	9	7789	7804	ekkddd dddddk keee	801
601288	2555	2570	Exón 18	TAGAAAACCC AAATCC	0	7790	7805	ekkddd dddddk keee	559
601289	2556	2571	Exón 18	ATAGAAAACC CAAATC	40	7791	7806	ekkddd dddddk keee	560
601290	2557	2572	Exón 18	TATAGAAAAC CCAAAT	16	7792	7807	ekkddd dddddk keee	802
601291	2558	2573	Exón 18	TTATAGAAAA CCCAAA	15	7793	7808	ekkddd dddddk keee	803
601292	2559	2574	Exón 18	CTTATAGAAA ACCCAA	5	7794	7809	ekkddd dddddk keee	561
601293	2560	2575	Exón 18	CCTTATAGAA AACCCA	15	7795	7810	ekkddd dddddk keee	562
601294	2561	2576	Exón 18	CCCTTATAGA AAACCC	3	7796	7811	ekkddd dddddk keee	563

	601229	2562	2577	Exón 18	CCCCTTATAG AAAACC	15	7797	7812	ekkkddddddddkeee	564
	601295	2562	2577	Exón 18	CCCCTTATAG AAAACC	5	7797	7812	ekkkddddddddkeee	564
	601230	2563	2578	Exón 18	ACCCCTTATA GAAAAC	14	7798	7813	ekkkddddddddkeee	565
	601296	2563	2578	Exón 18	ACCCCTTATA GAAAAC	0	7798	7813	ekkkddddddddkeee	565
	601231	2564	2579	Exón 18	AACCCCTTAT AGAAAA	14	7799	7814	ekkkddddddddkeee	566
	601297	2564	2579	Exón 18	AACCCCTTAT AGAAAA	14	7799	7814	ekkkddddddddkeee	566
	601232	2565	2580	Exón 18	AAACCCCTTA TAGAAA	15	7800	7815	ekkkddddddddkeee	567
	601298	2565	2580	Exón 18	AAACCCCTTA TAGAAA	7	7800	7815	ekkkddddddddkeee	567
	601233	2566	2581	Exón 18	GAAACCCCTT ATAGAA	0	7801	7816	ekkkddddddddkeee	568

601299	2566	2581	Exón 18	GAAACCCCTT ATAGAA	0	7801	7816	ekkddd dddddk keee	568
601234	2567	2582	Exón 18	GGAAACCCCT TATAGA	0	7802	7817	ekkddd dddddd keee	569
601300	2567	2582	Exón 18	GGAAACCCCT TATAGA	9	7802	7817	ekkddd dddddk keee	569
601235	2568	2583	Exón 18	AGGAAACCCC TTATAG	3	7803	7818	ekkddd dddddd keee	570
601301	2568	2583	Exón 18	AGGAAACCCC TTATAG	14	7803	7818	ekkddd dddddk keee	570
601236	2569	2584	Exón 18	CAGGAAACCC CTTATA	0	7804	7819	ekkddd dddddd keee	571
601302	2569	2584	Exón 18	CAGGAAACCC CTTATA	0	7804	7819	ekkddd dddddk keee	571
601237	2570	2585	Exón 18	GCAGGAAACC CCTTAT	16	7805	7820	ekkddd dddddd keee	572

601303	2570	2585	Exón 18	GCAGGAAACC CCTTAT	16	7805	7820	ekkddd ddddddk keee	572
601238	2571	2586	Exón 18	AGCAGGAAAC CCCTTA	11	7806	7821	ekkkdd ddddddd keee	573
601304	2571	2586	Exón 18	AGCAGGAAAC CCCTTA	10	7806	7821	ekkddd dddddk keee	573
601239	2572	2587	Exón 18	CAGCAGGAAA CCCCTT	21	7807	7822	ekkkdd ddddddd keee	574
601305	2572	2587	Exón 18	CAGCAGGAAA CCCCTT	7	7807	7822	ekkddd dddddk keee	574
601240	2573	2588	Exón 18	CCAGCAGGAA ACCCCT	6	7808	7823	ekkkdd ddddddd keee	575
601241	2574	2589	Exón 18	TCCAGCAGGA AACCCC	10	7809	7824	ekkkdd ddddddd keee	576
601242	2575	2590	Exón 18	GTCCAGCAGG AAACCC	19	7810	7825	ekkkdd ddddddd keee	577
601243	2576	2591	Exón 18	TGTCCAGCAG GAAACC	10	7811	7826	ekkkdd ddddddd keee	578

601244	2577	2592	Exón 18	CTGTCCAGCA GGAAAC	28	7812	7827	ekkkddddddddkeee	579
601245	2578	2593	Exón 18	CCTGTCCAGC AGGAAA	5	7813	7828	ekkkddddddddkeee	580
601246	2579	2594	Exón 18	CCCTGTCCAG CAGGAA	18	7814	7829	ekkkddddddddkeee	581
601247	2580	2595	Exón 18	CCCCTGTCCA GCAGGA	4	7815	7830	ekkkddddddddkeee	582
601248	2581	2596	Exón 18	GCCCCTGTCC AGCAGG	6	7816	7831	ekkkddddddddkeee	583
601249	2582	2597	Exón 18	CGCCCCTGTC CAGCAG	18	7817	7832	ekkkddddddddkeee	584
601250	2583	2598	Exón 18	ACGCCCCTGT CCAGCA	26	7818	7833	ekkkddddddddkeee	585
601251	2584	2599	Exón 18	CACGCCCCTG TCCAGC	27	7819	7834	ekkkddddddddkeee	586
601252	2585	2600	Exón 18	CCACGCCCCT GTCCAG	21	7820	7835	ekkkddddddddkeee	587

601253	2586	2601	Exón 18	CCCACGCCCC TGTCCA	0	7821	7836	ekkkddddddddkeee	588
601254	2587	2602	Exón 18	TCCCACGCCC CTGTCC	31	7822	7837	ekkkddddddddkeee	589
601255	2588	2603	Exón 18	ATCCCACGCC CCTGTC	3	7823	7838	ekkkddddddddkeee	590
601256	2589	2604	Exón 18	AATCCCACGC CCCTGT	21	7824	7839	ekkkddddddddkeee	591
601257	2590	2605	Exón 18	CAATCCCACG CCCCTG	47	7825	7840	ekkkddddddddkeee	592
601258	2591	2606	Exón 18	TCAATCCCAC GCCCCT	48	7826	7841	ekkkddddddddkeee	593
601259	2592	2607	Exón 18	TTCAATCCCA CGCCCC	38	7827	7842	ekkkddddddddkeee	594
601260	2593	2608	Exón 18	ATTCAATCCC ACGCCC	33	7828	7843	ekkkddddddddkeee	595
601261	2594	2609	Exón 18	AATTCAATCC CACGCC	17	7829	7844	ekkkddddddddkeee	596

601262	2595	2610	Exón 18	TAATTCAATCCCACGC	40	7830	7845	ekkkddddddddkeee	597
601263	2596	2611	Exón 18	TTAATTCAATCCCACG	31	7831	7846	ekkkddddddddkeee	598
601264	2597	2612	Exón 18	TTTAATTCAATCCCAC	72	7832	7847	ekkkddddddddkeee	599
601265	2598	2613	Exón 18	TTTTAATTCAATCCCA	48	7833	7848	ekkkddddddddkeee	600
601266	2599	2614	Exón 18	GTTTTAATTCAATCCC	64	7834	7849	ekkkddddddddkeee	601
601267	2600	2615	Exón 18	TGTTTTAATTCAATCC	43	7835	7850	ekkkddddddddkeee	602
601268	2601	2616	Exón 18	CTGTTTTAATTCAATC	44	7836	7851	ekkkddddddddkeee	603
601269	2602	2617	Exón 18	GCTGTTTTAATTCAAT	66	7837	7852	ekkkddddddddkeee	604
601270	2603	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTCAA	47	7838	7853	ekkkddddddddkeee	605

532917	2604	2623	Exón 18	GTCGCAGCTG TTTTAATTCA	3	7839	7858	eeeeed ddddddd ddeeee ee	317
601271	2604	2619	Exón 18	CAGCTGTTTT AATTCA	26	7839	7854	ekkkdd ddddddd keee	606
601272	2605	2620	Exón 18	GCAGCTGTTT TAATTC	33	7840	7855	ekkkdd ddddddd keee	607
601273	2606	2621	Exón 18	CGCAGCTGTT TTAATT	34	7841	7856	ekkkdd ddddddd keee	608
601274	2607	2622	Exón 18	TCGCAGCTGT TTTAAT	39	7842	7857	ekkkdd ddddddd keee	609
588860	2608	2623	Exón 18	GTCGCAGCTG TTTTAA	72	7843	7858	eekddd ddddddd dkke	610
601275	2608	2623	Exón 18	GTCGCAGCTG TTTTAA	65	7843	7858	ekkkdd ddddddd keee	610
601276	2609	2624	Exón 18	TGTCGCAGCT GTTTTA	65	7844	7859	ekkkdd ddddddd keee	611
601277	2610	2625	Exón 18	TTGTCGCAGC TGTTTT	51	7845	7860	ekkkdd ddddddd keee	612

601278	2611	2626	Exón 18	GTTGTCGCAG CTGTTT	78	7846	7861	ekkkddddddddkeee	613
601279	2612	2627	Exón 18	TGTTGTCGCA GCTGTT	79	7847	7862	ekkkddddddddkeee	614
601280	2613	2628	Exón 18 /Repetición	TTGTTGTCGC AGCTGT	70	n/a	n/a	ekkkddddddddkeee	615
601281	2614	2629	Exón 18 /Repetición	TTTGTTGTCG CAGCTG	78	n/a	n/a	ekkkddddddddkeee	616
601282	2615	2630	Exón 18 /Repetición	TTTTGTTGTC GCAGCT	68	n/a	n/a	ekkkddddddddkeee	617
601283	2616	2631	Exón 18 /Repetición	TTTTTGTTGT CGCAGC	61	n/a	n/a	ekkkddddddddkeee	618

Tabla 144

Inhibición del ARNm de CFB mediante oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt que se dirigen a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2

N.° ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO: 1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio SEQ ID NO: 2	Sitio de detención SEQ ID NO: 2	Motivo	SEQ ID NO:
601306	2573	2588	Exón 18	CCAGCAGGAAACCCCT	22	7808	7823	ekkddddddddkkeee	575
601307	2574	2589	Exón 18	TCCAGCAGGAAACCCC	22	7809	7824	ekkddddddddkkeee	576
601308	2575	2590	Exón 18	GTCCAGCAGGAAACCC	33	7810	7825	ekkddddddddkkeee	577
601309	2576	2591	Exón 18	TGTCCAGCAGGAAACC	33	7811	7826	ekkddddddddkkeee	578
601310	2577	2592	Exón 18	CTGTCCAGCAGGAAAC	28	7812	7827	ekkddddddddkkeee	579

601311	2578	2593	Exón 18	CCTGTCCAG CAGGAAA	33	7813	7828	ekkddd dddddk keee	580
601312	2579	2594	Exón 18	CCCTGTCCA GCAGGAA	13	7814	7829	ekkddd dddddk keee	581
601313	2580	2595	Exón 18	CCCCTGTCC AGCAGGA	32	7815	7830	ekkddd dddddk keee	582
601314	2581	2596	Exón 18	GCCCCTGTC CAGCAGG	0	7816	7831	ekkddd dddddk keee	583
601315	2582	2597	Exón 18	CGCCCCTGT CCAGCAG	36	7817	7832	ekkddd dddddk keee	584
601316	2583	2598	Exón 18	ACGCCCCTG TCCAGCA	39	7818	7833	ekkddd dddddk keee	585
601317	2584	2599	Exón 18	CACGCCCCT GTCCAGC	33	7819	7834	ekkddd dddddk keee	586
601356	2584	2599	Exón 18	CACGCCCCT GTCCAGC	27	7819	7834	kkkddd dddddk eeee	586
601318	2585	2600	Exón 18	CCACGCCCC TGTCCAG	35	7820	7835	ekkddd dddddk keee	587

601357	2585	2600	Exón 18	CCACGCCCC TGTCCAG	26	7820	7835	kkkddd dddddk eeee	587
601319	2586	2601	Exón 18	CCCACGCCC CTGTCCA	33	7821	7836	ekkddd dddddk keee	588
601358	2586	2601	Exón 18	CCCACGCCC CTGTCCA	26	7821	7836	kkkddd dddddk eeee	588
601320	2587	2602	Exón 18	TCCCACGCC CCTGTCC	25	7822	7837	ekkddd dddddk keee	589
601359	2587	2602	Exón 18	TCCCACGCC CCTGTCC	23	7822	7837	kkkddd dddddk eeee	589
601321	2588	2603	Exón 18	ATCCCACGC CCCTGTC	50	7823	7838	ekkddd dddddk keee	590
601360	2588	2603	Exón 18	ATCCCACGC CCCTGTC	33	7823	7838	kkkddd dddddk eeee	590
601322	2589	2604	Exón 18	AATCCCACG CCCCTGT	52	7824	7839	ekkddd dddddk keee	591
601361	2589	2604	Exón 18	AATCCCACG CCCCTGT	48	7824	7839	kkkddd dddddk eeee	591

601323	2590	2605	Exón 18	CAATCCCAC GCCCCTG	67	7825	7840	ekkddd dddddk keee	592
601362	2590	2605	Exón 18	CAATCCCAC GCCCCTG	51	7825	7840	kkkddd dddddk eeee	592
601324	2591	2606	Exón 18	TCAATCCCA CGCCCCT	42	7826	7841	ekkddd dddddk keee	593
601363	2591	2606	Exón 18	TCAATCCCA CGCCCCT	42	7826	7841	kkkddd dddddk eeee	593
601325	2592	2607	Exón 18	TTCAATCCC ACGCCCC	52	7827	7842	ekkddd dddddk keee	594
601364	2592	2607	Exón 18	TTCAATCCC ACGCCCC	48	7827	7842	kkkddd dddddk eeee	594
601326	2593	2608	Exón 18	ATTCAATCC CACGCCC	27	7828	7843	ekkddd dddddk keee	595
601365	2593	2608	Exón 18	ATTCAATCC CACGCCC	36	7828	7843	kkkddd dddddk eeee	595
601327	2594	2609	Exón 18	AATTCAATC CCACGCC	66	7829	7844	ekkddd dddddk keee	596

601366	2594	2609	Exón 18	AATTCAATCCCACGCC	49	7829	7844	kkkddddddddkeeee	596
601328	2595	2610	Exón 18	TAATTCAATCCCACGC	55	7830	7845	ekkddddddddkkeee	597
601367	2595	2610	Exón 18	TAATTCAATCCCACGC	57	7830	7845	kkkddddddddkeeee	597
601329	2596	2611	Exón 18	TTAATTCAATCCCACG	69	7831	7846	ekkddddddddkkeee	598
601368	2596	2611	Exón 18	TTAATTCAATCCCACG	68	7831	7846	kkkddddddddkeeee	598
601330	2597	2612	Exón 18	TTTAATTCAATCCCAC	58	7832	7847	ekkddddddddkkeee	599
601369	2597	2612	Exón 18	TTTAATTCAATCCCAC	65	7832	7847	kkkddddddddkeeee	599
601331	2598	2613	Exón 18	TTTTAATTCAATCCCA	45	7833	7848	ekkddddddddkkeee	600
601370	2598	2613	Exón 18	TTTTAATTCAATCCCA	42	7833	7848	kkkddddddddkeeee	600

601332	2599	2614	Exón 18	GTTTTAATT CAATCCC	84	7834	7849	ekkddd dddddk keee	601
601371	2599	2614	Exón 18	GTTTTAATT CAATCCC	79	7834	7849	kkkddd dddddk eeee	601
601333	2600	2615	Exón 18	TGTTTTAAT TCAATCC	61	7835	7850	ekkddd dddddk keee	602
601372	2600	2615	Exón 18	TGTTTTAAT TCAATCC	71	7835	7850	kkkddd dddddk eeee	602
601334	2601	2616	Exón 18	CTGTTTTAA TTCAATC	61	7836	7851	ekkddd dddddk keee	603
601373	2601	2616	Exón 18	CTGTTTTAA TTCAATC	57	7836	7851	kkkddd dddddk eeee	603
601335	2602	2617	Exón 18	GCTGTTTTA ATTCAAT	73	7837	7852	ekkddd dddddk keee	604
601374	2602	2617	Exón 18	GCTGTTTTA ATTCAAT	66	7837	7852	kkkddd dddddk eeee	604
601336	2603	2618	Exón 18	AGCTGTTTT AATTCAA	64	7838	7853	ekkddd dddddk keee	605

601375	2603	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTCAA	61	7838	7853	kkkddddddddkeeee	605
532917	2604	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	66	7839	7858	eeeeeddddddddddeeeee	317
601337	2604	2619	Exón 18	CAGCTGTTTTAATTCA	53	7839	7854	ekkddddddddkkeee	606
601376	2604	2619	Exón 18	CAGCTGTTTTAATTCA	39	7839	7854	kkkddddddddkeeee	606
601338	2605	2620	Exón 18	GCAGCTGTTTTAATTC	67	7840	7855	ekkddddddddkkeee	607
601377	2605	2620	Exón 18	GCAGCTGTTTTAATTC	67	7840	7855	kkkddddddddkeeee	607
601339	2606	2621	Exón 18	CGCAGCTGTTTTAATT	63	7841	7856	ekkddddddddkkeee	608
601378	2606	2621	Exón 18	CGCAGCTGTTTTAATT	60	7841	7856	kkkddddddddkeeee	608
601340	2607	2622	Exón 18	TCGCAGCTGTTTTAAT	40	7842	7857	ekkddddddddkkeee	609

601379	2607	2622	Exón 18	TCGCAGCTG TTTTAAT	36	7842	7857	kkkddd dddddk eeee	609
588860	2608	2623	Exón 18	GTCGCAGCT GTTTTAA	84	7843	7858	eekddd dddddd dkke	610
601341	2608	2623	Exón 18	GTCGCAGCT GTTTTAA	74	7843	7858	ekkddd dddddk keee	610
601380	2608	2623	Exón 18	GTCGCAGCT GTTTTAA	78	7843	7858	kkkddd dddddk eeee	610
601342	2609	2624	Exón 18	TGTCGCAGC TGTTTTA	68	7844	7859	ekkddd dddddk keee	611
601381	2609	2624	Exón 18	TGTCGCAGC TGTTTTA	66	7844	7859	kkkddd dddddk eeee	611
601343	2610	2625	Exón 18	TTGTCGCAG CTGTTTT	71	7845	7860	ekkddd dddddk keee	612
601382	2610	2625	Exón 18	TTGTCGCAG CTGTTTT	84	7845	7860	kkkddd dddddk eeee	612
601344	2611	2626	Exón 18	GTTGTCGCA GCTGTTT	87	7846	7861	ekkddd dddddk keee	613

601383	2611	2626	Exón 18	GTTGTCGCAGCTGTTT	85	7846	7861	kkkddddddddkeeee	613
601345	2612	2627	Exón 18	TGTTGTCGCAGCTGTT	82	7847	7862	ekkddddddddkkeee	614
601384	2612	2627	Exón 18	TGTTGTCGCAGCTGTT	79	7847	7862	kkkddddddddkeeee	614
601346	2613	2628	Exón 18 /Repetición	TTGTTGTCGCAGCTGT	73	n/a	n/a	ekkddddddddkkeee	615
601385	2613	2628	Exón 18 /Repetición	TTGTTGTCGCAGCTGT	84	n/a	n/a	kkkddddddddkeeee	615
601347	2614	2629	Exón 18 /Repetición	TTTGTTGTCGCAGCTG	70	n/a	n/a	ekkddddddddkkeee	616
601386	2614	2629	Exón 18 /Repetición	TTTGTTGTCGCAGCTG	71	n/a	n/a	kkkddddddddkeeee	616

601348	2615	2630	Exón 18 /Repetición	TTTTGTTGTCGCAGCT	71	n/a	n/a	ekkdddddddkkeee	617
601387	2615	2630	Exón 18 /Repetición	TTTTGTTGTCGCAGCT	76	n/a	n/a	kkkddddddddkeeee	617
601349	2616	2631	Exón 18 /Repetición	TTTTTGTTGTCGCAGC	71	n/a	n/a	ekkdddddddkkeee	618
601388	2616	2631	Exón 18 /Repetición	TTTTTGTTGTCGCAGC	67	n/a	n/a	kkkddddddddkeeee	618

Tabla 145

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2

N.° ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO: 1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio SEQ ID NO: 2	Sitio de detención SEQ ID NO: 2	Motivo	SEQ ID NO:
599357	2582	2600	Exón 18	CCACGCCCCTGTCCAGCAG	26	7817	7835	5-9-5	708
599358	2583	2601	Exón 18	CCCACGCCCCTGTCCAGCA	22	7818	7836	5-9-5	709
599359	2584	2602	Exón 18	TCCCACGCCCCTGTCCAGC	13	7819	7837	5-9-5	710
599360	2585	2603	Exón 18	ATCCCACGCCCCTGTCCAG	7	7820	7838	5-9-5	711
599361	2586	2604	Exón 18	AATCCCACGCCCCTGTCCA	11	7821	7839	5-9-5	712

599362	2587	2605	Exón 18	CAATCCCACGCCCCTGTCC	14	7822	7840	5-9-5	713
599363	2588	2606	Exón 18	TCAATCCCACGCCCCTGTC	17	7823	7841	5-9-5	714
599364	2589	2607	Exón 18	TTCAATCCCACGCCCCTGT	20	7824	7842	5-9-5	715
599365	2590	2608	Exón 18	ATTCAATCCCACGCCCCTG	22	7825	7843	5-9-5	716
599366	2591	2609	Exón 18	AATTCAATCCCACGCCCCT	13	7826	7844	5-9-5	717
599367	2592	2610	Exón 18	TAATTCAATCCCACGCCCC	11	7827	7845	5-9-5	718
599368	2593	2611	Exón 18	TTAATTCAATCCCACGCCC	10	7828	7846	5-9-5	719
599369	2594	2612	Exón 18	TTTAATTCAATCCCACGCC	19	7829	7847	5-9-5	720
599370	2595	2613	Exón 18	TTTTAATTCAATCCCACGC	23	7830	7848	5-9-5	721

599371	2596	2614	Exón 18	GTTTTAATTCAATCCCACG	4	7831	7849	5-9-5	722
599372	2597	2615	Exón 18	TGTTTTAATTCAATCCCAC	16	7832	7850	5-9-5	723
599373	2598	2616	Exón 18	CTGTTTTAATTCAATCCCA	3	7833	7851	5-9-5	724
599374	2599	2617	Exón 18	GCTGTTTTAATTCAATCCC	10	7834	7852	5-9-5	725
599375	2600	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTCAATCC	17	7835	7853	5-9-5	726
599376	2601	2619	Exón 18	CAGCTGTTTTAATTCAATC	18	7836	7854	5-9-5	727
599377	2602	2620	Exón 18	GCAGCTGTTTTAATTCAAT	22	7837	7855	5-9-5	728
599378	2603	2621	Exón 18	CGCAGCTGTTTTAATTCAA	11	7838	7856	5-9-5	729
599511	2552	2571	Exón 18	ATAGAAAACCCAAATCCTCA	7	7787	7806	6-8-6	410

599389	2553	2572	Exón 18	TATAGAAA ACCCAAAT CCTC	22	7788	7807	6-8-6	411
599390	2554	2573	Exón 18	TTATAGAA AACCCAAA TCCT	21	7789	7808	6-8-6	412
599391	2555	2574	Exón 18	CTTATAGA AAACCCAA ATCC	27	7790	7809	6-8-6	413
599392	2556	2575	Exón 18	CCTTATAG AAAACCCA AATC	30	7791	7810	6-8-6	414
599393	2557	2576	Exón 18	CCCTTATA GAAAACCC AAAT	30	7792	7811	6-8-6	415
599394	2558	2577	Exón 18	CCCCTTAT AGAAAACC CAAA	28	7793	7812	6-8-6	416
599395	2559	2578	Exón 18	ACCCCTTA TAGAAAAC CCAA	23	7794	7813	6-8-6	417
599396	2560	2579	Exón 18	AACCCCTT ATAGAAAA CCCA	53	7795	7814	6-8-6	418
599397	2561	2580	Exón 18	AAACCCCT TATAGAAA ACCC	33	7796	7815	6-8-6	419

599398	2562	2581	Exón 18	GAAACCCC TTATAGAA AACC	58	7797	7816	6-8-6	420
599399	2563	2582	Exón 18	GGAAACCC CTTATAGA AAAC	23	7798	7817	6-8-6	421
599400	2564	2583	Exón 18	AGGAAACC CCTTATAG AAAA	54	7799	7818	6-8-6	422
599401	2565	2584	Exón 18	CAGGAAAC CCCTTATA GAAA	30	7800	7819	6-8-6	423
599402	2566	2585	Exón 18	GCAGGAAA CCCCTTAT AGAA	25	7801	7820	6-8-6	424
599403	2567	2586	Exón 18	AGCAGGAA ACCCCTTA TAGA	17	7802	7821	6-8-6	425
599404	2568	2587	Exón 18	CAGCAGGA AACCCCTT ATAG	20	7803	7822	6-8-6	426
599405	2569	2588	Exón 18	CCAGCAGG AAACCCCT TATA	12	7804	7823	6-8-6	427
599406	2570	2589	Exón 18	TCCAGCAG GAAACCCC TTAT	51	7805	7824	6-8-6	428

599407	2571	2590	Exón 18	GTCCAGCAGGAAACCCCTTA	39	7806	7825	6-8-6	237
599408	2572	2591	Exón 18	TGTCCAGCAGGAAACCCCTT	53	7807	7826	6-8-6	429
599409	2573	2592	Exón 18	CTGTCCAGCAGGAAACCCCT	65	7808	7827	6-8-6	430
599410	2574	2593	Exón 18	CCTGTCCAGCAGGAAACCCC	56	7809	7828	6-8-6	431
599411	2575	2594	Exón 18	CCCTGTCCAGCAGGAAACCC	60	7810	7829	6-8-6	432
599412	2576	2595	Exón 18	CCCCTGTCCAGCAGGAAACC	61	7811	7830	6-8-6	433
599413	2577	2596	Exón 18	GCCCCTGTCCAGCAGGAAAC	40	7812	7831	6-8-6	238
599414	2578	2597	Exón 18	CGCCCCTGTCCAGCAGGAAA	41	7813	7832	6-8-6	434
599415	2579	2598	Exón 18	ACGCCCCTGTCCAGCAGGAA	37	7814	7833	6-8-6	435

599416	2580	2599	Exón 18	CACGCCCC TGTCCAGC AGGA	54	7815	7834	6-8-6	436
599417	2581	2600	Exón 18	CCACGCCC CTGTCCAG CAGG	36	7816	7835	6-8-6	437
599418	2582	2601	Exón 18	CCCACGCC CCTGTCCA GCAG	53	7817	7836	6-8-6	438
599419	2583	2602	Exón 18	TCCCACGC CCCTGTCC AGCA	54	7818	7837	6-8-6	439
599420	2584	2603	Exón 18	ATCCCACG CCCCTGTC CAGC	50	7819	7838	6-8-6	440
599421	2585	2604	Exón 18	AATCCCAC GCCCCTGT CCAG	48	7820	7839	6-8-6	441
599422	2586	2605	Exón 18	CAATCCCA CGCCCCTG TCCA	55	7821	7840	6-8-6	442
599423	2587	2606	Exón 18	TCAATCCC ACGCCCCT GTCC	75	7822	7841	6-8-6	443
599424	2588	2607	Exón 18	TTCAATCC CACGCCCC TGTC	69	7823	7842	6-8-6	444

599425	2589	2608	Exón 18	ATTCAATCCCACGCCCCTGT	77	7824	7843	6-8-6	445
599426	2590	2609	Exón 18	AATTCAATCCCACGCCCCTG	60	7825	7844	6-8-6	446
599427	2591	2610	Exón 18	TAATTCAATCCCACGCCCCT	72	7826	7845	6-8-6	447
599428	2592	2611	Exón 18	TTAATTCAATCCCACGCCCC	81	7827	7846	6-8-6	448
599429	2593	2612	Exón 18	TTTAATTCAATCCCACGCCC	68	7828	7847	6-8-6	449
599430	2594	2613	Exón 18	TTTTAATTCAATCCCACGCC	58	7829	7848	6-8-6	450
599431	2595	2614	Exón 18	GTTTTAATTCAATCCCACGC	70	7830	7849	6-8-6	451
599432	2596	2615	Exón 18	TGTTTTAATTCAATCCCACG	85	7831	7850	6-8-6	452
532917	2604	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	85	7839	7858	5-10-5	317

599379	2604	2622	Exón 18	TCGCAGCTGTTTTAATTCA	73	7839	7857	5-9-5	730
599380	2605	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTC	77	7840	7858	5-9-5	731
599381	2606	2624	Exón 18	TGTCGCAGCTGTTTTAATT	69	7841	7859	5-9-5	732
599382	2607	2625	Exón 18	TTGTCGCAGCTGTTTTAAT	58	7842	7860	5-9-5	733
599383	2608	2626	Exón 18	GTTGTCGCAGCTGTTTTAA	52	7843	7861	5-9-5	734
599384	2609	2627	Exón 18	TGTTGTCGCAGCTGTTTTA	63	7844	7862	5-9-5	735
599385	2610	2628	Exón 18 /Repetición	TTGTTGTCGCAGCTGTTTT	53	n/a	n/a	5-9-5	736
599386	2611	2629	Exón 18 /Repetición	TTTGTTGTCGCAGCTGTTT	63	n/a	n/a	5-9-5	737

599387	2612	2630	Exón 18 /Repetición	TTTTGTTGTCGCAGCTGTT	64	n/a	n/a	5-9-5	438
599388	2613	2631	Exón 18 /Repetición	TTTTTGTTGTCGCAGCTGT	66	n/a	n/a	5-9-5	739

Tabla 146

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2

N.° ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO: 1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio SEQ ID NO: 2	Sitio de detención SEQ ID NO: 2	Motivo	SEQ ID NO:
599213	2553	2570	Exón 18	TAGAAAACCCAAATCCTC	0	7788	7805	3-10-5	785
599214	2554	2571	Exón 18	ATAGAAAACCCAAATCCT	0	7789	7806	3-10-5	786

599215	2555	2572	Exón 18	TATAGAAAACCCAAATCC	36	7790	7807	3-10-5	787
599216	2556	2573	Exón 18	TTATAGAAAACCCAAATC	8	7791	7808	3-10-5	788
599217	2557	2574	Exón 18	CTTATAGAAAACCCAAAT	5	7792	7809	3-10-5	789
599218	2558	2575	Exón 18	CCTTATAGAAAACCCAAA	0	7793	7810	3-10-5	790
599219	2559	2576	Exón 18	CCCTTATAGAAAACCCAA	8	7794	7811	3-10-5	791
599220	2560	2577	Exón 18	CCCCTTATAGAAAACCCA	0	7795	7812	3-10-5	740
599221	2561	2578	Exón 18	ACCCCTTATAGAAAACCC	54	7796	7813	3-10-5	741
599222	2562	2579	Exón 18	AACCCCTTATAGAAAACC	3	7797	7814	3-10-5	742
599223	2563	2580	Exón 18	AAACCCCTTATAGAAAAC	0	7798	7815	3-10-5	743

599224	2564	2581	Exón 18	GAAACCCCTTATAGAAAA	0	7799	7816	3-10-5	744
599225	2566	2583	Exón 18	AGGAAACCCCTTATAGAA	60	7801	7818	3-10-5	745
599226	2567	2584	Exón 18	CAGGAAACCCCTTATAGA	0	7802	7819	3-10-5	746
599227	2568	2585	Exón 18	GCAGGAAACCCCTTATAG	37	7803	7820	3-10-5	747
599228	2569	2586	Exón 18	AGCAGGAAACCCCTTATA	0	7804	7821	3-10-5	748
599229	2570	2587	Exón 18	CAGCAGGAAACCCCTTAT	39	7805	7822	3-10-5	749
599230	2571	2588	Exón 18	CCAGCAGGAAACCCCTTA	10	7806	7823	3-10-5	750
599231	2572	2589	Exón 18	TCCAGCAGGAAACCCCTT	16	7807	7824	3-10-5	751
599232	2573	2590	Exón 18	GTCCAGCAGGAAACCCCT	9	7808	7825	3-10-5	752

599233	2574	2591	Exón 18	TGTCCAG CAGGAAA CCCC	44	7809	7826	3-10-5	753
599234	2575	2592	Exón 18	CTGTCCA GCAGGAA ACCC	14	7810	7827	3-10-5	754
599235	2576	2593	Exón 18	CCTGTCC AGCAGGA AACC	0	7811	7828	3-10-5	755
599236	2577	2594	Exón 18	CCCTGTC CAGCAGG AAAC	43	7812	7829	3-10-5	756
599237	2578	2595	Exón 18	CCCCTGT CCAGCAG GAAA	0	7813	7830	3-10-5	757
599238	2580	2597	Exón 18	CGCCCCT GTCCAGC AGGA	9	7815	7832	3-10-5	758
599239	2581	2598	Exón 18	ACGCCCC TGTCCAG CAGG	36	7816	7833	3-10-5	759
599240	2582	2599	Exón 18	CACGCCC CTGTCCA GCAG	11	7817	7834	3-10-5	760
599241	2583	2600	Exón 18	CCACGCC CCTGTCC AGCA	51	7818	7835	3-10-5	761

599242	2584	2601	Exón 18	CCCACGCCCCTGTCCAGC	7	7819	7836	3-10-5	762
599243	2585	2602	Exón 18	TCCCACGCCCCTGTCCAG	47	7820	7837	3-10-5	763
599244	2586	2603	Exón 18	ATCCCACGCCCCTGTCCA	37	7821	7838	3-10-5	764
599245	2587	2604	Exón 18	AATCCCACGCCCCTGTCC	35	7822	7839	3-10-5	765
599246	2588	2605	Exón 18	CAATCCCACGCCCCTGTC	21	7823	7840	3-10-5	766
599247	2589	2606	Exón 18	TCAATCCCACGCCCCTGT	61	7824	7841	3-10-5	767
599248	2590	2607	Exón 18	TTCAATCCCACGCCCCTG	51	7825	7842	3-10-5	768
599249	2591	2608	Exón 18	ATTCAATCCCACGCCCCT	58	7826	7843	3-10-5	769
599250	2592	2609	Exón 18	AATTCAATCCCACGCCCC	49	7827	7844	3-10-5	770

599251	2593	2610	Exón 18	TAATTCAATCCCACGCCC	46	7828	7845	3-10-5	771
599252	2594	2611	Exón 18	TTAATTCAATCCCACGCC	32	7829	7846	3-10-5	772
599253	2595	2612	Exón 18	TTTAATTCAATCCCACGC	23	7830	7847	3-10-5	773
599254	2596	2613	Exón 18	TTTTAATTCAATCCCACG	0	7831	7848	3-10-5	774
599255	2597	2614	Exón 18	GTTTTAATTCAATCCCAC	61	7832	7849	3-10-5	775
599256	2598	2615	Exón 18	TGTTTTAATTCAATCCCA	64	7833	7850	3-10-5	776
599257	2599	2616	Exón 18	CTGTTTTAATTCAATCCC	66	7834	7851	3-10-5	777
599258	2600	2617	Exón 18	GCTGTTTTAATTCAATCC	59	7835	7852	3-10-5	778
599259	2601	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTCAATC	40	7836	7853	3-10-5	779

599260	2602	2619	Exón 18	CAGCTGTTTTAATTCAAT	38	7837	7854	3-10-5	780
599261	2603	2620	Exón 18	GCAGCTGTTTTAATTCAA	54	7838	7855	3-10-5	781
599509	2552	2570	Exón 18	TAGAAAACCCAAATCCTCA	54	7787	7805	6-7-6	681
599273	2553	2571	Exón 18	ATAGAAAACCCAAATCCTC	0	7788	7806	6-7-6	682
599274	2554	2572	Exón 18	TATAGAAAACCCAAATCCT	57	7789	7807	6-7-6	683
599275	2556	2574	Exón 18	CTTATAGAAAACCCAAATC	0	7791	7809	6-7-6	684
599276	2557	2575	Exón 18	CCTTATAGAAAACCCAAAT	44	7792	7810	6-7-6	685
599277	2558	2576	Exón 18	CCCTTATAGAAAACCCAAA	0	7793	7811	6-7-6	686
599278	2559	2577	Exón 18	CCCCTTATAGAAAACCCAA	0	7794	7812	6-7-6	687

599279	2560	2578	Exón 18	ACCCCTTATAGAAAACCCA	20	7795	7813	6-7-6	688
599280	2561	2579	Exón 18	AACCCCTTATAGAAAACCC	70	7796	7814	6-7-6	689
532917	2604	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	85	7839	7858	5-10-5	317
599262	2604	2621	Exón 18	CGCAGCTGTTTTAATTCA	49	7839	7856	3-10-5	782
599263	2605	2622	Exón 18	TCGCAGCTGTTTTAATTC	49	7840	7857	3-10-5	783
599264	2606	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATT	62	7841	7858	3-10-5	784
599265	2607	2624	Exón 18	TGTCGCAGCTGTTTTAAT	63	7842	7859	3-10-5	792
599266	2608	2625	Exón 18	TTGTCGCAGCTGTTTTAA	41	7843	7860	3-10-5	793
599267	2609	2626	Exón 18	GTTGTCGCAGCTGTTTTA	52	7844	7861	3-10-5	794

599268	2610	2627	Exón 18	TGTTGTCGCAGCTGTTTT	51	7845	7862	3-10-5	795
599269	2611	2628	Exón 18/Repetición	TTGTTGTCGCAGCTGTTT	58	n/a	n/a	3-10-5	796
599270	2612	2629	Exón 18/Repetición	TTTGTTGTCGCAGCTGTT	69	n/a	n/a	3-10-5	797
599271	2613	2630	Exón 18/Repetición	TTTTGTTGTCGCAGCTGT	69	n/a	n/a	3-10-5	798
599272	2614	2631	Exón 18/Repetición	TTTTTGTTGTCGCAGCTG	72	n/a	n/a	3-10-5	799
599205	2607	2624	Exón 18	TGTCGCAGCTGTTTTAAT	54	7842	7859	5-8-5	792
599206	2608	2625	Exón 18	TTGTCGCAGCTGTTTTAA	62	7843	7860	5-8-5	793
599207	2609	2626	Exón 18	GTTGTCGCAGCTGTTTTA	62	7844	7861	5-8-5	794
599208	2610	2627	Exón 18	TGTTGTCGCAGCTGTTTT	66	7845	7862	5-8-5	795

599209	2611	2628	Exón 18 /Repetición	TTGTTGTCGCAGCTGTTT	60	n/a	n/a	5-8-5	796
599210	2612	2629	Exón 18 /Repetición	TTTGTTGTCGCAGCTGTT	62	n/a	n/a	5-8-5	797
599211	2613	2630	Exón 18 /Repetición	TTTTGTTGTCGCAGCTGT	65	n/a	n/a	5-8-5	798
599212	2614	2631	Exón 18 /Repetición	TTTTTGTTGTCGCAGCTG	67	n/a	n/a	5-8-5	799

Tabla 147

Inhibición del ARNm de CFB mediante gapmers 5-10-5 de MOE dirigidos a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2

N.° ISIS	Sitio de inicio SEQ ID NO: 1	Sitio de detención SEQ ID NO: 1	Región objetivo	Secuencia	% de inhibición	Sitio de inicio SEQ ID NO: 2	Sitio de detención SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO:
588570	150	169	Exón 1	TGGTCACATTCCCTTCCCCT	72	1871	1890	396

588571	152	171	Exón 1	CCTGGTCACATTCCCTTCCC	80	1873	1892	397
532614	154	173	Exón 1	GACCTGGTCACATTCCCTTC	65	1875	1894	12
588572	156	175	Exón 1	TAGACCTGGTCACATTCCCT	74	1877	1896	398
588573	158	177	Exón 1	CCTAGACCTGGTCACATTCC	72	1879	1898	399
588566	2189	2208	Exón 15	CCTTCCGAGTCAGCTTTTTC	66	6977	6996	400
588567	2191	2210	Exón 15	CTCCTTCCGAGTCAGCTTTT	66	6979	6998	401
532770	2193	2212	Exón 15	ACCTCCTTCCGAGTCAGCTT	64	6981	7000	198
588568	2195	2214	Exón 15	AGACCTCCTTCCGAGTCAGC	78	6983	7002	402

588569	2197	2216	Exón 15	GTAGACCTCCTTCCGAGTCA	74	6985	7004	403
588574	2453	2472	Exón 18	TTTGCCGCTTCTGGTTTTTG	71	7688	7707	404
588575	2455	2474	Exón 18	CTTTTGCCGCTTCTGGTTTT	72	7690	7709	405
532800	2457	2476	Exón 18	TGCTTTTGCCGCTTCTGGTT	71	7692	7711	228
588576	2459	2478	Exón 18	CCTGCTTTTGCCGCTTCTGG	59	7694	7713	406
588577	2461	2480	Exón 18	TACCTGCTTTGCCGCTTCT	76	7696	7715	407
516350	2550	2569	Exón 18	AGAAAACCCAAATCCTCATC	58	7785	7804	408
588509	2551	2570	Exón 18	TAGAAAACCCAAATCCTCAT	6	7786	7805	409

588510	2552	2571	Exón 18	ATAGAAAACCCAAATCCTCA	10	7787	7806	410
588511	2553	2572	Exón 18	TATAGAAAACCCAAATCCTC	9	7788	7807	411
588512	2554	2573	Exón 18	TTATAGAAAACCCAAATCCT	80	7789	7808	412
588513	2555	2574	Exón 18	CTTATAGAAAACCCAAATCC	70	7790	7809	413
588514	2556	2575	Exón 18	CCTTATAGAAAACCCAAATC	71	7791	7810	414
588515	2557	2576	Exón 18	CCCTTATAGAAAACCCAAAT	78	7792	7811	415
588516	2558	2577	Exón 18	CCCCTTATAGAAAACCCAAA	72	7793	7812	416
588517	2559	2578	Exón 18	ACCCCTTATAGAAAACCCAA	80	7794	7813	417

588518	2560	2579	Exón 18	AACCCCTTATAGAAAACCCA	80	7795	7814	418
588519	2561	2580	Exón 18	AAACCCCTTATAGAAAACCC	62	7796	7815	419
588520	2562	2581	Exón 18	GAAACCCCTTATAGAAAACC	59	7797	7816	420
588521	2563	2582	Exón 18	GGAAACCCCTTATAGAAAAC	40	7798	7817	421
588522	2564	2583	Exón 18	AGGAAACCCCTTATAGAAAA	66	7799	7818	422
588523	2565	2584	Exón 18	CAGGAAACCCCTTATAGAAA	63	7800	7819	423
588524	2566	2585	Exón 18	GCAGGAAACCCCTTATAGAA	70	7801	7820	424
588525	2567	2586	Exón 18	AGCAGGAAACCCCTTATAGA	67	7802	7821	425

588526	2568	2587	Exón 18	CAGCAGGAAACCCCTTATAG	0	7803	7822	426
588527	2569	2588	Exón 18	CCAGCAGGAAACCCCTTATA	11	7804	7823	427
588528	2570	2589	Exón 18	TCCAGCAGGAAACCCCTTAT	15	7805	7824	428
532809	2571	2590	Exón 18	GTCCAGCAGGAAACCCCTTA	75	7806	7825	237
588529	2572	2591	Exón 18	TGTCCAGCAGGAAACCCCTT	16	7807	7826	429
588530	2573	2592	Exón 18	CTGTCCAGCAGGAAACCCCT	16	7808	7827	430
588531	2574	2593	Exón 18	CCTGTCCAGCAGGAAACCCC	19	7809	7828	431
588532	2575	2594	Exón 18	CCCTGTCCAGCAGGAAACCC	15	7810	7829	432

588533	2576	2595	Exón 18	CCCCTGTCCAGCAGGAAACC	29	7811	7830	433
532810	2577	2596	Exón 18	GCCCCTGTCCAGCAGGAAAC	74	7812	7831	238
588534	2578	2597	Exón 18	CGCCCCTGTCCAGCAGGAAA	21	7813	7832	434
588535	2579	2598	Exón 18	ACGCCCCTGTCCAGCAGGAA	16	7814	7833	435
588536	2580	2599	Exón 18	CACGCCCCTGTCCAGCAGGA	0	7815	7834	436
588537	2581	2600	Exón 18	CCACGCCCCTGTCCAGCAGG	8	7816	7835	437
588538	2582	2601	Exón 18	CCCACGCCCCTGTCCAGCAG	10	7817	7836	438
588539	2583	2602	Exón 18	TCCCACGCCCCTGTCCAGCA	23	7818	7837	439

588540	2584	2603	Exón 18	ATCCCACG CCCCTGTC CAGC	16	7819	7838	440
588541	2585	2604	Exón 18	AATCCCAC GCCCCTGT CCAG	16	7820	7839	441
588542	2586	2605	Exón 18	CAATCCCA CGCCCCTG TCCA	12	7821	7840	442
588543	2587	2606	Exón 18	TCAATCCC ACGCCCCT GTCC	26	7822	7841	443
588544	2588	2607	Exón 18	TTCAATCC CACGCCCC TGTC	26	7823	7842	444
588545	2589	2608	Exón 18	ATTCAATC CCACGCCC CTGT	31	7824	7843	445
588546	2590	2609	Exón 18	AATTCAAT CCCACGCC CCTG	22	7825	7844	446
588547	2591	2610	Exón 18	TAATTCAA TCCCACGC CCCT	12	7826	7845	447

588548	2592	2611	Exón 18	TTAATTCAATCCCACGCCCC	20	7827	7846	448
588549	2593	2612	Exón 18	TTTAATTCAATCCCACGCCC	26	7828	7847	449
588550	2594	2613	Exón 18	TTTTAATTCAATCCCACGCC	32	7829	7848	450
588551	2595	2614	Exón 18	GTTTTAATTCAATCCCACGC	48	7830	7849	451
588552	2596	2615	Exón 18	TGTTTTAATTCAATCCCACG	57	7831	7850	452
588553	2597	2616	Exón 18	CTGTTTTAATTCAATCCCAC	49	7832	7851	453
588554	2598	2617	Exón 18	GCTGTTTTAATTCAATCCCA	64	7833	7852	454
532811	2599	2618	Exón 18	AGCTGTTTTAATTCAATCCC	78	7834	7853	239

588555	2600	2619	Exón 18	CAGCTGTTTTAATTCAATCC	48	7835	7854	455
588556	2601	2620	Exón 18	GCAGCTGTTTTAATTCAATC	55	7836	7855	456
588557	2602	2621	Exón 18	CGCAGCTGTTTTAATTCAAT	51	7837	7856	457
588558	2603	2622	Exón 18	TCGCAGCTGTTTTAATTCAA	51	7838	7857	458
532917	2604	2623	Exón 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	82	7839	7858	317
588559	2605	2624	Exón 18	TGTCGCAGCTGTTTTAATTC	58	7840	7859	459
588560	2606	2625	Exón 18	TTGTCGCAGCTGTTTTAATT	72	7841	7860	460
588561	2607	2626	Exón 18	GTTGTCGCAGCTGTTTTAAT	75	7842	7861	461

532952	2608	2627	Exón 18	TGTTGTCGCAGCTGTTTTAA	39	7843	7862	395
588562	2609	2628	Exón 18/Repetición	TTGTTGTCGCAGCTGTTTTA	53	n/a	n/a	462
588563	2610	2629	Exón 18/Repetición	TTTGTTGTCGCAGCTGTTTT	62	n/a	n/a	463
588564	2611	2630	Exón 18/Repetición	TTTTGTTGTCGCAGCTGTTT	63	n/a	n/a	464
588565	2612	2631	Exón 18/Repetición	TTTTTGTTGTCGCAGCTGTT	64	n/a	n/a	465

Ejemplo 122: Inhibición antisentido dependiente de la dosis de CFB humano en células HepG2 mediante gapmers 5-10-5 de MOE

Los gapmers de los estudios descritos anteriormente que mostraron una inhibición *in vitro* del ARNm de CFB fueron seleccionados y analizados en varias dosis en células HepG2. Las células se colocaron en placas a una densidad de 20.000

células por pocillo y se transfectaron usando electroporación con concentraciones de 0,313 µM, 0,625 µM, 1,25 µM, 2,50 µM, 5,00 µM o 10,00 µM de oligonucleótidos antisentido, como se específica en la Tabla más adelante. Luego de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, el ARN se aisló de las células y los niveles de ARNm de CFB se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó un conjunto de cebador y sonda de RTS3459 humano para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de CFB se ajustaron de acuerdo con el contenido de ARN total, tal como se midió con el RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB, con respecto a las células de control no tratadas.

También se presenta la concentración inhibitoria máxima media (IC_{50}) de cada oligonucleótido. Los niveles de ARNm de CFB se redujeron de manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótido antisentido.

Tabla 148

N.° ISIS	0,313 µM	0,625 µM	1,25 µM	2,50 µM	5,00 µM	10,00 µM	IC_{50} (µM)
532614	7	13	43	72	65	71	2,2
532635	12	0	3	28	0	0	>10
532692	26	0	12	52	55	74	3,7

532770	21	18	32	73	64	88	1,8
532775	8	0	26	35	47	59	6,2
532800	0	5	30	65	50	75	3,1
532809	12	30	28	40	46	66	4,6
532810	28	44	32	69	84	95	1,2
532811	66	83	90	94	97	99	<0,3
532917	64	85	88	96	97	99	<0,3
532952	50	53	68	80	91	94	0,4

Ejemplo 123: Inhibición antisentido dependiente de la dosis de CFB humano en células HepG2

Los gapmers de los estudios descritos anteriormente que mostraron una inhibición *in vitro* del ARNm de CFB fueron seleccionados y analizados en varias dosis en células HepG2. Los oligonucleótidos antisentido se analizaron en una cantidad de experimentos con condiciones de cultivo similares. Los resultados de cada experimento se presentan en tablas separadas que se muestran más adelante. Las células se colocaron en placas a una densidad de 20.000 células por pocillo y se transfectaron usando electroporación con concentraciones de 0,08 µM, 0,25 µM, 0,74 µM, 2,22 µM, 6,67

µM o 20,00 µM de oligonucleótidos antisentido, como se especifica en la Tabla más adelante. Luego de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, el ARN se aisló de las células y los niveles de ARNm de CFB se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó un conjunto de cebador y sonda de RTS3459 humano para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de CFB se ajustaron de acuerdo con el contenido de ARN total, tal como se midió con el RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB, con respecto a las células de control no tratadas.

También se presenta la concentración inhibitoria máxima media (IC_{50}) de cada oligonucleótido. Los niveles de ARNm de CFB se redujeron de manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótido antisentido.

Tabla 149

N.° ISIS	0,08 µM	0,25 µM	0,74 µM	2,22 µM	6,67 µM	20,00 µM	IC_{50} (µM)
532811	19	53	81	87	96	97	0,2
588834	7	42	64	92	98	98	0,5
588835	11	30	66	89	97	97	0,5

588836	14	40	61	91	97	97	0,5
588837	6	39	67	89	96	97	0,5
588838	0	27	41	81	87	97	1,0
588842	17	51	68	86	93	95	0,3
588843	21	38	72	90	95	96	0,4
588870	9	31	56	88	95	97	0,6
588871	14	25	47	79	93	97	0,7
588872	18	28	59	84	92	97	0,6

Tabla 150

N.° ISIS	0,08 µM	0,25 µM	0,74 µM	2,22 µM	6,67 µM	20,00 µM	IC_{50} (µM)
532811	31	70	89	94	97	97	0,1
588844	31	60	77	91	95	96	0,1
588846	32	52	78	89	95	97	0,2
588847	22	52	77	91	95	97	0,2
588848	20	40	73	91	96	98	0,3
588851	40	52	82	94	97	97	0,1
588854	17	55	59	84	94	96	0,4
588855	10	32	56	82	93	96	0,6
588856	13	46	75	90	96	97	0,3
588857	11	52	73	94	96	97	0,3
588858	19	48	75	94	97	98	0,3

Tabla 151

N.° ISIS	0,08 µM	0,25 µM	0,74 µM	2,22 µM	6,67 µM	20,00 µM	IC_{50} (µM)
532811	42	66	88	96	97	98	0,1
588859	18	46	66	90	96	97	0,4
588860	55	80	94	97	97	97	<0,1
588861	24	61	86	93	96	97	0,2
588862	25	64	85	94	96	98	0,1
588863	50	73	89	96	96	98	<0,1
588864	52	80	92	96	98	98	<0,1
588865	46	72	91	96	96	99	<0,1
588866	47	76	88	96	97	98	<0,1
588867	43	69	83	92	96	99	0,1
588868	43	56	65	84	93	97	0,1

Tabla 152

N.° ISIS	0,08 µM	0,25 µM	0,74 µM	2,22 µM	6,67 µM	20,00 µM	IC_{50} (µM)
532810	0	14	38	72	89	96	1,2
532811	18	54	79	93	96	97	0,3
532952	19	34	73	87	94	96	0,4

588534	17	13	44	77	93	97	0,9
588544	12	43	69	86	89	93	0,4
588545	17	55	67	86	91	93	0,3
588546	10	32	67	85	91	93	0,6
588552	27	54	76	90	94	97	0,2
588553	32	68	87	93	95	97	0,1
588560	16	54	76	90	94	96	0,3
588561	18	45	68	85	93	96	0,4

Tabla 153

N.° ISIS	0,08 µM	0,25 µM	0,74 µM	2,22 µM	6,67 µM	20,00 µM	IC_{50} (µM)
532811	22	60	82	94	97	98	0,2
588536	2	38	65	90	96	97	0,6
588537	12	38	63	87	94	97	0,5
588547	19	35	61	86	93	97	0,5
588548	19	36	75	88	95	96	0,4
588554	0	76	92	95	97	97	<0,1
588555	31	61	89	96	97	98	0,1
588556	33	56	82	95	94	97	0,1
588562	12	39	71	87	94	97	0,4

588563	25	48	72	86	94	96	0,3
588564	15	33	63	89	91	97	0,5

Tabla 154

N.° ISIS	0,08 µM	0,25 µM	0,74 µM	2,22 µM	6,67 µM	20,00 µM	IC_{50} (µM)
532811	39	68	86	96	98	98	0,1
588538	0	40	82	94	97	98	0,3
588539	34	65	88	95	98	98	0,1
588540	30	51	81	91	97	98	0,2
588549	31	57	82	95	96	98	0,1
588550	34	65	88	96	98	98	0,1
588551	47	66	87	96	98	99	<0,1
588557	40	84	95	98	98	98	<0,1
588558	45	73	93	97	98	99	<0,1
588559	51	69	83	96	98	99	<0,1
588565	19	56	81	92	96	98	0,2

Ejemplo 124: Inhibición antisentido dependiente de la dosis de CFB humano en células HepG2

Los gapmers de los estudios descritos anteriormente que mostraron una inhibición *in vitro* del ARNm de CFB fueron seleccionados y analizados en varias dosis en células HepG2. Los oligonucleótidos antisentido se analizaron en una cantidad de experimentos con condiciones de cultivo similares. Los resultados de cada experimento se presentan en tablas separadas que se muestran más adelante. Las células se colocaron en placas a una densidad de 20.000 células por pocillo y se transfectaron usando electroporación con concentraciones de 0,06 µM, 0,25 µM, 1,00 µM y 4,00 µM de oligonucleótido antisentido, como se específica en la Tabla que figura a continuación. Luego de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, el ARN se aisló de las células y los niveles de ARNm de CFB se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó un conjunto de cebador y sonda de RTS3459 humano para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de CFB se ajustaron de acuerdo con el contenido de ARN total, tal como se midió con el RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB, con respecto a las células de control no

tratadas.

También se presenta la concentración inhibitoria máxima media (IC_{50}) de cada oligonucleótido. Los niveles de ARNm de CFB se redujeron de manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótido antisentido.

Tabla 155

N.° ISIS	0,06 µM	0,25 µM	1,00 µM	4,00 µM	IC_{50} (µM)
532917	31	58	87	92	0,2
588860	18	50	79	93	0,3
599001	16	28	69	90	0,5
599024	14	32	74	90	0,4
599025	0	31	56	92	0,7
599032	28	44	62	88	0,3
599033	28	46	80	92	0,2
599077	8	20	59	80	0,8
599080	9	33	48	76	0,9
599086	7	22	53	83	0,8
599087	21	31	74	87	0,4
599088	13	37	69	82	0,5
599089	3	36	55	79	0,7

599093	25	59	79	88	0,2
599094	19	29	75	89	0,4
599095	29	43	67	87	0,3
599096	23	51	70	88	0,3
599149	20	53	82	92	0,3
599188	0	21	62	85	0,8

Tabla 156

N.° ISIS	0,06 µM	0,25 µM	1,00 µM	4,00 µM	IC_{50} (µM)
532917	0	42	81	91	0,4
588860	17	49	74	92	0,3
599155	29	52	67	87	0,3
599198	3	25	64	89	0,6
599201	13	26	67	91	0,5
599202	0	44	72	87	0,5
599203	22	41	75	88	0,3
599314	12	34	71	84	0,5
599316	7	37	66	88	0,5
599317	8	1	54	83	1,0
599321	8	33	70	85	0,5
599322	24	38	66	87	0,4

599327	22	32	66	89	0,4
599328	0	31	59	88	0,7
599330	5	43	67	84	0,5
599374	23	42	80	91	0,3
599378	21	57	80	93	0,2
599380	23	56	82	93	0,2
599432	17	37	73	93	0,4

Tabla 157

N.° ISIS	0,06 µM	0,25 µM	1,00 µM	4,00 µM	IC_{50} (µM)
532917	23	65	76	93	0,2
588860	17	60	76	90	0,3
601282	48	68	81	88	0,1
601269	18	59	80	94	0,2
601276	34	64	81	91	0,1
601275	14	39	78	90	0,4
601344	52	84	92	94	<0,06
601383	53	81	86	94	<0,06
601382	41	76	88	94	0,1

601385	52	74	89	91	<0,06
601332	41	69	86	94	0,1
601345	36	75	86	95	0,1
601371	34	72	91	93	0,1
601384	50	78	91	95	<0,06
601380	28	57	83	92	0,2
601387	48	61	82	88	0,1
601341	28	65	83	91	0,2
601346	31	69	82	93	0,1
601335	24	56	85	92	0,2

Tabla 158

N.° ISIS	0,06 µM	0,25 µM	1,00 µM	4,00 µM	IC_{50} (µM)
532917	31	66	86	93	0,1
588860	28	62	85	94	0,2
599208	24	50	71	89	0,3
599261	31	49	81	94	0,2
599267	41	48	80	88	0,2
599268	28	56	75	92	0,2
599313	14	24	71	92	0,5
599441	24	57	80	87	0,2

599494	13	55	86	94	0,3
599552	30	69	93	95	0,1
599553	34	71	93	96	0,1
599554	30	74	93	96	0,1
599568	40	77	90	97	0,1
599570	61	82	93	96	<0,06
599577	18	62	81	93	0,2
599581	27	60	80	94	0,2
599591	49	74	93	96	<0,06
599592	46	76	90	94	0,1
599593	44	72	91	95	0,1

Tabla 159

N.° ISIS	0,06 µM	0,25 µM	1,00 µM	4,00 µM	IC_{50} (µM)
532917	25	56	84	92	0,2
588860	11	51	80	92	0,3
599547	23	60	82	90	0,2
599569	42	73	85	88	0,1
599578	29	49	82	89	0,2
599582	21	56	78	91	0,2

599590	24	62	80	90	0,2
601209	21	49	85	88	0,3
601210	34	64	86	92	0,1
601212	46	68	88	90	0,1
601213	54	80	90	92	<0,06
601214	38	77	88	95	0,1
601215	42	64	85	92	0,1
601216	45	57	76	89	0,1
601264	29	58	86	95	0,2
601278	51	82	83	93	<0,06
601279	44	80	92	96	0,1
601280	44	73	87	94	0,1
601281	51	80	91	94	<0,06

Ejemplo 125: Inhibición antisentido dependiente de la dosis de CFB humano en células HepG2

Los gapmers de los estudios descritos anteriormente que mostraron una inhibición *in vitro* del ARNm de CFB fueron seleccionados y analizados en varias dosis en células HepG2. De manera adicional, un oligonucleótido desoxy, MOE y (S)-

cEt, ISIS 594430, se diseñó con la misma secuencia (CTCCTTCCGAGTCAGC, SEQ ID NO: 549) y región objetivo (sitio de inicio objetivo 2195 de la SEQ ID NO: 1 y sitio de inicio objetivo 6983 de la SEQ ID NO: 2) como ISIS 588870, otro oligonucleótido desoxi, MOE y (S)-cEt. ISIS 594430 es un gapmer (S)-cEt 3-10-3.

Las células se colocaron en placas a una densidad de 20.000 células por pocillo y se transfectaron usando electroporación con concentraciones de 0,01 µM, 0,04 µM, 0,12 µM, 0,37 µM, 1,11 µM, 3,33 µM y 10,00 µM de oligonucleótidos antisentido, como se especifica en la Tabla más adelante. Luego de un período de tratamiento de aproximadamente 16 horas, el ARN se aisló de las células y los niveles de ARNm de CFB se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó un conjunto de cebador y sonda de RTS3459 humano para medir los niveles de ARNm. Los niveles de ARNm de CFB se ajustaron de acuerdo con el contenido de ARN total, tal como se midió con el RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB, con respecto a las células de control no tratadas.

También se presenta la concentración inhibitoria máxima media (IC_{50}) de cada oligonucleótido. Los niveles de ARNm de CFB se

redujeron de manera dependiente de la dosis en células tratadas con oligonucleótido antisentido.

Tabla 160

N.° ISIS	0,01 µM	0,04 µM	0,12 µM	0,37 µM	1,11 µM	3,33 µM	10,00 µM	IC_{50} (µM)
588536	0	0	0	5	45	73	94	1,4
588548	0	0	0	19	52	78	90	1,2
588553	0	0	9	42	76	85	94	0,6
588555	0	52	23	58	78	83	95	0,3
588847	4	1	18	45	67	84	96	0,5
588848	0	3	13	38	67	83	95	0,6
594430	0	0	10	34	50	55	84	1,4

Ejemplo 126: Tolerabilidad de los gapmers de MOE que se dirigen al CFB humano en ratones CD1

Los ratones CD1® (Charles River, MA) son un modelo de ratón multipropósito que se utiliza frecuentemente para evaluar seguridad y eficacia. Los ratones se trataron con oligonucleótidos antisentido ISIS seleccionados a partir de los estudios descritos anteriormente y se evaluaron para determinar cambios en los niveles de diversos marcadores químicos en plasma.

Estudio 1 (con gapmers de MOE 5-10-5)

Se inyectaron grupos de ratones CD1 macho de siete semanas de forma subcutánea una vez por semana durante 6 semanas con 100 mg/kg del oligonucleótido ISIS. A un grupo de ratones CD1 macho se le inyectó por vía subcutánea PBS una vez por semana durante 6 semanas. A un grupo de ratones se le inyectó por vía subcutánea una vez por semana durante 6 semanas 100 mg/kg de oligonucleótido de control ISIS 141923 (CCTTCCCTGAAGGTTCCTCC, designada en la presente como SEQ ID NO: 809, gapmer MOE 5-10-5 sin objetivo murino conocido). Los ratones se sometieron a eutanasia 48 horas después de la última dosis y se les extrajeron los órganos y plasma para análisis adicionales.

Marcadores químicos en plasma

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función hepática y renal, se midieron los niveles en plasma de transaminasas y BUN usando un analizador químico clínico automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los niveles de cualquiera de los marcadores de

función hepática o renal fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 161

Marcadores de química en plasma en plasma de ratones CD1 el día 40

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	BUN (mg/dL)
PBS	25	46	20
ISIS 532614	513	407	22
ISIS 532692	131	130	24
ISIS 532770	36	53	25
ISIS 532775	193	158	23
ISIS 532800	127	110	25
ISIS 532809	36	42	22
ISIS 532810	229	286	26
ISIS 532811	197	183	21
ISIS 532917	207	204	27
ISIS 532952	246	207	25
ISIS 141923	39	67	23

Pesos

Se midieron los pesos corporales de los ratones el día 40 antes de sacrificar los ratones. También se midieron los pesos de los órganos, hígado, riñón y bazo después de que se sacrificaron los ratones. Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los pesos fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 162

Pesos (g) de ratones CD1 el día 40

	Cuerpo	Riñón	Hígado	Bazo
PBS	44	0,8	2,0	0,1
ISIS 532614	43	0,7	4,3	0,2
ISIS 532692	42	0,7	2,6	0,2
ISIS 532770	42	0,6	2,3	0,2
ISIS 532775	42	0,7	2,5	0,2
ISIS 532800	43	0,6	2,8	0,3
ISIS 532809	42	0,6	2,2	0,1
ISIS 532810	43	0,6	2,3	0,2

ISIS 532811	41	0,7	2,4	0,2
ISIS 532917	42	0,7	3,0	0,2
ISIS 532952	44	0,8	2,5	0,3
ISIS 141923	41	0,6	2,0	0,1

Estudio 2 (con gapmers de MOE 5-10-5)

Se inyectaron grupos de ratones CD1 macho de seis a ocho semanas de forma subcutánea una vez por semana durante 6 semanas con 100 mg/kg del oligonucleótido ISIS. A dos grupo de ratones CD1 macho se les inyectó por vía subcutánea PBS una vez por semana durante 6 semanas. A un grupo de ratones se le inyectó por vía subcutánea una vez por semana durante 6 semanas 100 mg/kg de oligonucleótido de control ISIS 141923. Los ratones se sometieron a eutanasia 48 horas después de la última dosis y se les extrajeron los órganos y plasma para análisis adicionales.

Marcadores químicos en plasma

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función hepática y renal, se midieron los niveles en plasma de transaminasas, albúmina y BUN usando un analizador químico

clínico automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los niveles de cualquiera de los marcadores de función hepática o renal fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 163

Marcadores de química en plasma en plasma de ratones CD1 el día 45

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Albúmina (g/dL)	BUN (mg/dL)
PBS	39	53	2,9	29
PBS	50	97	2,9	30
ISIS 141923	163	174	4,1	25
ISIS 532810	321	297	2,5	26
ISIS 532952	182	199	2,7	27
ISIS 588534	276	248	2,6	29
ISIS 588536	48	60	2,9	31
ISIS 588537	72	79	4,0	25
ISIS 588538	63	67	4,5	29

ISIS 588539	238	177	3,9	28
ISIS 588545	496	256	4,4	24
ISIS 588547	323	210	4,4	25
ISIS 588548	61	63	4,2	27
ISIS 588549	127	132	4,1	23
ISIS 588551	302	282	4,2	22
ISIS 588552	76	98	4,0	30
ISIS 588558	1066	521	3,9	27
ISIS 588559	76	94	4,1	26
ISIS 588561	502	500	4,4	26
ISIS 588563	50	99	4,4	28

Pesos

Se midieron los pesos corporales de los ratones el día 42. También se midieron los pesos de los órganos, hígado, riñón y bazo después de que se sacrificaron los ratones el día 45. Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los pesos fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 164

Pesos (g) de ratones CD1 el día 40

	Cuerpo	Riñón	Hígado	Bazo
PBS	44	0,7	2,4	0,1
PBS	43	0,7	2,4	0,2
ISIS 141923	43	0,6	2,4	0,2
ISIS 532810	41	0,6	1,9	0,1
ISIS 532952	43	0,6	2,4	0,2
ISIS 588534	44	0,7	2,8	0,2
ISIS 588536	43	0,7	2,7	0,2
ISIS 588537	43	0,7	2,4	0,2
ISIS 588538	44	0,7	2,8	0,2
ISIS 588539	44	0,6	2,7	0,2
ISIS 588545	44	0,8	3,3	0,3
ISIS 588547	42	0,6	3,3	0,3
ISIS 588548	43	0,6	2,8	0,2
ISIS 588549	42	0,6	2,8	0,3
ISIS 588551	39	0,6	2,2	0,2
ISIS 588552	41	0,6	2,2	0,2
ISIS 588558	44	0,7	3,3	0,3
ISIS 588559	43	0,6	2,7	0,3
ISIS 588561	40	0,7	2,4	0,3
ISIS 588563	41	0,7	2,4	0,2

Estudio 3 (con gapmers de MOE 5-10-5)

Se inyectaron grupos de ratones CD1 macho de seis a ocho semanas de forma subcutánea una vez por semana durante 6 semanas con 100 mg/kg del oligonucleótido ISIS. A dos grupo de ratones CD1 macho se les inyectó por vía subcutánea PBS una vez por semana durante 6 semanas. Los ratones se sometieron a eutanasia 48 horas después de la última dosis y se les extrajeron los órganos y plasma para análisis adicionales.

Marcadores químicos en plasma

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función hepática y renal, se midieron los niveles en plasma de transaminasas, albúmina y BUN usando un analizador químico clínico automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los niveles de cualquiera de los marcadores de función hepática o renal fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 165

Marcadores de química en plasma en plasma de ratones CD1 el día 42

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Albúmina (g/dL)	BUN (mg/dL)
PBS	37	108	3,1	30
PBS	45	51	3,0	27
ISIS 588544	209	168	2,9	26
ISIS 588546	526	279	3,0	22
ISIS 588550	82	136	2,7	25
ISIS 588553	79	105	3,0	24
ISIS 588554	112	220	3,2	19
ISIS 588555	95	162	2,8	25
ISIS 588556	345	236	3,0	26
ISIS 588557	393	420	2,8	24
ISIS 588560	109	148	2,7	27
ISIS 588562	279	284	2,8	22
ISIS 588564	152	188	3,0	23
ISIS 588565	247	271	2,8	28

Pesos

Se midieron los pesos corporales de los ratones el día 42. También se midieron los pesos de los órganos, hígado, riñón y bazo después de que se sacrificaron los ratones el día 42. Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los pesos fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 166

Pesos (g) de ratones CD1 el día 40

	Cuerpo	Riñón	Hígado	Bazo
PBS	42	0,7	2,4	0,1
PBS	41	0,7	2,4	0,2
ISIS 588544	44	0,6	1,9	0,1
ISIS 588546	43	0,6	2,4	0,2
ISIS 588550	41	0,7	2,8	0,2
ISIS 588553	44	0,7	2,7	0,2
ISIS 588554	40	0,7	2,4	0,2
ISIS 588555	44	0,7	2,8	0,2

ISIS 588556	39	0,6	2,7	0,2
ISIS 588557	41	0,8	3,3	0,3
ISIS 588560	38	0,6	3,2	0,3
ISIS 588562	41	0,6	2,8	0,2
ISIS 588564	40	0,6	2,8	0,3
ISIS 588565	39	0,6	2,2	0,2

Estudio 4 (con gapmers de (S) cEt y oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt)

Se inyectaron grupos de ratones CD1 macho de diez semanas de forma subcutánea una vez por semana durante 6 semanas con 50 mg/kg del oligonucleótido ISIS de los estudios descritos anteriormente. Además, dos oligonucleótidos, ISIS 594431 e ISIS 594432, fueron diseñados como gapmers de (S)-cEt 3-10-3 y también se analizaron en este estudio. ISIS 594431(ACCTCCTTCCGAGTCA, SEQ ID NO: 550) se dirige a la misma región que ISIS 588871, un gapmer desoxi, MOE y (S)-cEt (sitio de inicio objetivo 2197 de la SEQ ID NO: 1 y sitio de inicio objetivo 6985 de la SEQ ID NO: 2). ISIS 594432 (TGGTCACATTCCCTTC, SEQ ID NO: 542) se dirige a la misma región que ISIS 588872 un gapmer desoxi, MOE y (S)-cEt (sitio

de inicio objetivo 154 de la SEQ ID NO: 1 y sitio de inicio objetivo 1875 de la SEQ ID NO: 2).

A dos grupos de ratones CD1 macho se les inyectó por vía subcutánea PBS una vez por semana durante 6 semanas. Los ratones se sometieron a eutanasia 48 horas después de la última dosis y se les extrajeron los órganos y plasma para análisis adicionales.

Marcadores químicos en plasma

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función hepática y renal, se midieron los niveles en plasma de transaminasas, albúmina, creatinina y BUN usando un analizador químico clínico automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los niveles de cualquiera de los marcadores de función hepática o renal fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 167

Marcadores de química en plasma en plasma de ratones CD1 el día 42

	Química	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Albúmina (g/dL)	Creatinina (mg/dL)	BUN (mg/dL)
PBS	-	71	77	2,7	0,2	29
PBS	-	30	36	2,7	0,2	26
ISIS 588834	Desoxi, MOE y (S)-cEt	436	510	2,8	0,2	25
ISIS 588835	Desoxi, MOE y (S)-cEt	70	98	3,0	0,2	27
ISIS 588836	Desoxi, MOE y (S)-cEt	442	312	2,7	0,2	27
ISIS 588846	Desoxi, MOE y (S)-cEt	50	75	2,5	0,1	28
ISIS 588847	Desoxi, MOE y (S)-cEt	44	71	2,6	0,1	24
ISIS 588848	Desoxi, MOE y (S)-cEt	47	70	2,4	0,1	27

ISIS 588857	Desoxi, MOE y (S)-cEt	1287	655	2,7	0,2	26
ISIS 588858	Desoxi, MOE y (S)-cEt	1169	676	2,5	0,2	26
ISIS 588859	Desoxi, MOE y (S)-cEt	1036	1300	3,2	0,2	25
ISIS 588861	Desoxi, MOE y (S)-cEt	749	466	3,1	0,1	24
ISIS 588862	Desoxi, MOE y (S)-cEt	1564	1283	2,9	0,2	22
ISIS 588863	Desoxi, MOE y (S)-cEt	477	362	2,8	0,1	23
ISIS 588864	Desoxi, MOE y (S)-cEt	118	165	2,9	0,2	27
ISIS 588866	Desoxi, MOE y (S)-cEt	843	784	3,2	0,2	25

ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	89	99	2,4	0,1	28
ISIS 594431	3-10-3 (S)-cEt	590	433	3,0	0,2	24
ISIS 594432	3-10-3 (S)-cEt	2595	2865	2,4	0,1	25

Pesos

Se midieron los pesos corporales de los ratones el día 39. También se midieron los pesos de los órganos, hígado, riñón y bazo después de que se sacrificaron los ratones el día 42. Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los pesos fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 168

Pesos (g) de ratones CD1

	Química	Cuerpo	Riñón	Hígado	Bazo
PBS	-	37	0,6	2,1	0,1
PBS	-	45	0,7	2,5	0,2

ISIS 588834	Desoxi, MOE y (S)-cEt	40	0,6	3,2	0,2
ISIS 588835	Desoxi, MOE y (S)-cEt	38	0,7	2,8	0,3
ISIS 588836	Desoxi, MOE y (S)-cEt	41	0,7	2,3	0,2
ISIS 588837	Desoxi, MOE y (S)-cEt	38	0,6	2,4	0,3
ISIS 588846	Desoxi, MOE y (S)-cEt	39	0,6	2,3	0,2
ISIS 588847	Desoxi, MOE y (S)-cEt	40	0,7	2,5	0,2
ISIS 588848	Desoxi, MOE y (S)-cEt	43	0,7	2,6	0,3
ISIS 588857	Deoxy, MOE and (S)-cEt	39	0,6	3,3	0,2
ISIS 588858	Desoxi, MOE y (S)-cEt	37	0,6	3,4	0,2
ISIS 588859	Desoxi, MOE y (S)-cEt	41	0,7	2,5	0,3
ISIS 588861	Desoxi, MOE y (S)-cEt	39	0,6	2,6	0,4
ISIS 588862	Desoxi, MOE y (S)-cEt	34	0,6	2,5	0,4

ISIS 588863	Desoxi, MOE y (S)-cEt	40	0,6	2,7	0,3
ISIS 588864	Desoxi, MOE y (S)-cEt	40	0,7	2,3	0,2
ISIS 588866	Desoxi, MOE y (S)-cEt	45	0,7	3,0	0,2
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	39	0,6	2,2	0,2
ISIS 594431	3-10-3 (S)-cEt	36	0,6	3,2	0,2
ISIS 594432	3-10-3 (S)-cEt	31	0,4	1,9	0,1

Estudio 5 (con gapmers de MOE, gapmers de (S) cEt y oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt)

Se inyectaron grupos de ratones CD1 macho de ocho a nueve semanas de forma subcutánea una vez por semana durante 6 semanas con 50 mg/kg del oligonucleótido ISIS. A dos grupo de ratones CD1 macho se les inyectó por vía subcutánea PBS una vez por semana durante 6 semanas. Los ratones se sometieron a eutanasia 48 horas después de la última dosis y se les extrajeron los órganos y plasma para análisis adicionales.

Marcadores químicos en plasma

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función hepática y renal, se midieron los niveles en plasma de

transaminasas, albúmina, creatinina y BUN usando un analizador químico clínico automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los niveles de cualquiera de los marcadores de función hepática o renal fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 169

Marcadores de química en plasma en plasma de ratones CD1 el día 42

	Química	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Albúmina (g/dL)	Creatinina (mg/dL)	BUN (mg/dL)
PBS	-	33	84	2,9	0,2	28
PBS	-	32	65	2,5	0,1	27
ISIS 532692	5-10-5 MOE	363	281	3,0	0,2	30
ISIS 532770	5-10-5 MOE	69	100	2,9	0,1	28
ISIS 532775	5-10-5 MOE	371	333	2,6	0,1	29
ISIS 532800	5-10-5 MOE	104	106	2,7	0,1	31

ISIS 532809	5-10-5 MOE	69	127	2,8	0,1	26
ISIS 588540	5-10-5 MOE	66	110	2,8	0,1	26
ISIS 588838	3-10-3 (S)-cEt	391	330	2,9	0,1	25
ISIS 588842	Desoxi, MOE y (S)-cEt	224	264	2,6	0,1	26
ISIS 588843	3-10-3 (S)-cEt	185	160	2,8	0,1	24
ISIS 588844	Desoxi, MOE y (S)-cEt	304	204	2,7	0,1	25
ISIS 588851	Desoxi, MOE y (S)-cEt	186	123	2,7	0,1	31
ISIS 588854	Desoxi, MOE y (S)-cEt	1232	925	2,7	0,1	25
ISIS 588855	Desoxi, MOE y (S)-cEt	425	321	2,7	0,1	28

ISIS 588856	Desoxi, MOE y (S)-cEt	78	101	2,4	0,1	31
ISIS 588865	Desoxi, MOE y (S)-cEt	126	145	2,5	0,1	23
ISIS 588867	Desoxi, MOE y (S)-cEt	108	112	2,5	0,1	32
ISIS 588868	Desoxi, MOE y (S)-cEt	61	124	2,5	0,1	28
ISIS 588870	Desoxi, MOE y (S)-cEt	48	69	2,4	0,1	31
ISIS 588871	Desoxi, MOE y (S)-cEt	723	881	2,5	0,1	24
ISIS 588872	Desoxi, MOE y (S)-cEt	649	654	2,7	0,1	26

Pesos

Se midieron los pesos corporales de los ratones el día 40. También se midieron los pesos de los órganos, hígado, riñón y bazo después de que se sacrificaron los ratones el día 42. Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los pesos fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 170

Pesos (g) de ratones CD1

	Química	Cuerpo	Riñón	Hígado	Bazo
PBS	-	46	0,7	2,3	0,2
PBS	-	44	0,7	2,3	0,2
ISIS 532692	5-10-5 MOE	44	0,6	2,8	0,2
ISIS 532770	5-10-5 MOE	43	0,6	2,2	0,2
ISIS 532775	5-10-5 MOE	43	0,6	2,8	0,2
ISIS 532800	5-10-5 MOE	47	0,7	2,9	0,2
ISIS 532809	5-10-5 MOE	44	0,7	2,6	0,2
ISIS 588540	5-10-5 MOE	44	0,7	2,5	0,2
ISIS 588838	3-10-3 (S)-cEt	45	0,7	3,1	0,2

ISIS 588842	Desoxi, MOE y (S)-cEt	41	0,6	2,6	0,2
ISIS 588843	3-10-3 (S)-cEt	43	0,7	2,9	0,2
ISIS 588844	Desoxi, MOE y (S)-cEt	43	0,7	2,8	0,2
ISIS 588851	Desoxi, MOE y (S)-cEt	46	0,6	2,6	0,2
ISIS 588854	Desoxi, MOE y (S)-cEt	45	0,7	4,1	0,2
ISIS 588855	Desoxi, MOE y (S)-cEt	44	0,7	2,9	0,3
ISIS 588856	Desoxi, MOE y (S)-cEt	44	0,7	3,2	0,2
ISIS 588865	Desoxi, MOE y (S)-cEt	45	0,7	2,6	0,3
ISIS 588867	Desoxi, MOE y (S)-cEt	46	0,7	3,2	0,3
ISIS 588868	Desoxi, MOE y (S)-cEt	42	0,7	2,9	0,3
ISIS 588870	Desoxi, MOE y (S)-cEt	43	0,6	2,2	0,2
ISIS 588871	Desoxi, MOE y (S)-cEt	41	0,7	3,1	0,2

ISIS 588872	Desoxi, MOE y (S)-cEt	39	0,6	3,2	0,3

Estudio 6 (con oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt)

Se inyectaron grupos de ratones CD1 macho de ocho a nueve semanas de forma subcutánea una vez por semana durante 6 semanas con 50 mg/kg de oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt. A dos grupo de ratones CD1 macho se les inyectó por vía subcutánea PBS una vez por semana durante 6 semanas. Los ratones se sometieron a eutanasia 48 horas después de la última dosis y se les extrajeron los órganos y plasma para análisis adicionales.

Marcadores químicos en plasma

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función hepática y renal, se midieron los niveles en plasma de transaminasas, albúmina, creatinina, bilirrubina y BUN usando un analizador químico clínico automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los niveles de cualquiera de los

marcadores de función hepática o renal fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 171

Marcadores de química en plasma en plasma de ratones CD1 el día 45

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Albúmina (g/dL)	Creatinina (mg/dL)	Bilirrubina (mg/dL)	BUN (mg/dL)
PBS	39	78	3,4	0,2	0,2	31
PBS	37	59	2,9	0,1	0,2	27
ISIS 599552	167	208	3,0	0,1	0,2	32
ISIS 599553	43	86	2,9	0,1	0,2	28
ISIS 599554	57	101	2,2	0,2	0,2	31
ISIS 599569	469	530	3,5	0,2	0,3	27
ISIS 599577	37	84	2,9	0,1	0,1	31
ISIS 599578	45	104	2,8	0,1	0,2	30
ISIS 599581	54	88	3,1	0,1	0,2	31
ISIS 599590	1741	1466	3,1	0,1	0,3	25
ISIS 599591	2230	1183	3,2	0,1	0,3	27
ISIS 601209	68	104	2,9	0,1	0,2	30
ISIS 601212	1795	968	3,2	0,1	0,3	22
ISIS 601215	424	385	3,1	0,1	0,4	25
ISIS 601216	90	125	2,9	0,1	0,2	29

ISIS 601276	946	366	2,9	0,1	0,5	31
ISIS 601282	831	540	3,3	0,2	0,2	32

Pesos

Se midieron los pesos corporales de los ratones el día 40. También se midieron los pesos de los órganos, hígado, riñón y bazo después de que se sacrificaron los ratones el día 45. Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los pesos fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 172

Pesos (g) de ratones CD1

	Cuerpo	Riñón	Hígado	Bazo
PBS	40	0,7	2,1	0,2
PBS	42	0,8	2,3	0,2
ISIS 599552	38	0,6	2,3	0,2
ISIS 599553	39	0,7	2,2	0,2
ISIS 599554	39	0,7	2,4	0,2

ISIS 599569	39	0,7	2,2	0,2
ISIS 599577	41	0,7	2,5	0,2
ISIS 599578	37	0,6	2,0	0,2
ISIS 599581	40	0,6	2,5	0,2
ISIS 599590	34	0,6	3,5	0,2
ISIS 599591	38	0,8	2,7	0,2
ISIS 601209	42	0,7	2,6	0,3
ISIS 601212	38	0,6	2,9	0,2
ISIS 601215	36	0,7	2,6	0,2
ISIS 601216	42	0,6	2,7	0,2
ISIS 601276	42	0,7	3,2	0,2
ISIS 601282	38	0,7	3,2	0,2

Estudio 7 (con gapmers de MOE y oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt)

Se inyectaron grupos de ratones CD1 macho de ocho a nueve semanas de forma subcutánea una vez por semana durante 6 semanas con 100 mg/kg de oligonucleótidos ISIS. A un grupo de ratones CD1 macho se le inyectó por vía subcutánea PBS una vez por semana durante 6 semanas. Los ratones se sometieron a eutanasia 48 horas después de la última dosis y se les extrajeron los órganos y plasma para análisis adicionales.

Marcadores químicos en plasma

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función hepática y renal, se midieron los niveles en plasma de transaminasas, albúmina, creatinina y BUN usando un analizador químico clínico automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los niveles de cualquiera de los marcadores de función hepática o renal fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 173

Marcadores de química en plasma en plasma de ratones CD1 el día 45

	Química	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Albúmina (g/dL)	Creatinina (mg/dL)	BUN (mg/dL)
PBS	-	120	102	2,7	0,2	26
ISIS 588842	Desoxi, MOE y (S)-cEt	177	164	2,7	0,1	23

ISIS 588843	Desoxi, MOE y (S)-cEt	98	194	2,7	0,1	24
ISIS 588851	Desoxi, MOE y (S)-cEt	91	142	2,6	0,1	23
ISIS 588856	Desoxi, MOE y (S)-cEt	78	110	2,7	0,1	23
ISIS 599024	3-10-4 MOE	91	108	2,7	0,1	23
ISIS 599087	5-7-5 MOE	198	183	2,6	0,2	28
ISIS 599093	5-7-5 MOE	3285	2518	2,6	0,2	24
ISIS 599149	4-8-5 MOE	30	64	2,9	0,2	25
ISIS 599155	4-8-5 MOE	145	189	2,6	0,2	25
ISIS 599202	5-8-5 MOE	150	128	2,8	0,2	23
ISIS 599203	5-8-5 MOE	111	127	2,8	0,2	24
ISIS 599208	5-8-5 MOE	146	178	2,9	0,2	22
ISIS 599261	3-10-5 MOE	144	165	2,8	0,2	26
ISIS 599267	3-10-5 MOE	96	132	2,6	0,2	27

ISIS 599268	3-10-5 MOE	87	115	2,6	0,1	23
ISIS 599322	6-7-6 MOE	115	138	2,7	0,1	22
ISIS 599374	5-9-5 MOE	375	271	2,6	0,1	21
ISIS 599378	5-9-5 MOE	77	99	2,7	0,1	23
ISIS 599441	6-8-6 MOE	150	250	2,9	0,1	23

Pesos

Se midieron los pesos corporales de los ratones el día 44. También se midieron los pesos de los órganos, hígado, riñón y bazo después de que se sacrificaron los ratones el día 49. Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los pesos fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 174

Pesos (g) de ratones CD1

	Química	Cuerpo	Riñón	Hígado	Bazo
PBS	-	39	0,6	1,9	0,1
ISIS 588842	Desoxy, MOE y (S)-cEt	38	0,5	2,1	0,1
ISIS 588843	Desoxy, MOE y (S)-cEt	41	0,6	2,4	0,2
ISIS 588851	Desoxy, MOE y (S)-cEt	42	0,6	2,2	0,2
ISIS 588856	Desoxy, MOE y (S)-cEt	42	0,7	2,6	0,2
ISIS 599024	3-10-4 MOE	41	0,6	4,0	0,2
ISIS 599087	5-7-5 MOE	44	0,8	2,6	0,3
ISIS 599093	5-7-5 MOE	39	0,6	2,3	0,2
ISIS 599149	4-8-5 MOE	42	0,7	2,8	0,2
ISIS 599155	4-8-5 MOE	41	0,7	2,1	0,2
ISIS 599202	5-8-5 MOE	43	0,6	2,6	0,2
ISIS 599203	5-8-5 MOE	42	0,6	2,6	0,2
ISIS 599208	5-8-5 MOE	40	0,6	2,1	0,2
ISIS 599261	3-10-5 MOE	39	0,7	3,4	0,3
ISIS 599267	3-10-5 MOE	42	0,8	2,5	0,3
ISIS 599268	3-10-5 MOE	41	0,7	2,1	0,2

ISIS 599322	6-7-6 MOE	43	0,6	2,2	0,2
ISIS 599374	5-9-5 MOE	37	0,6	2,2	0,2
ISIS 599378	5-9-5 MOE	43	0,7	2,7	0,2
ISIS 599441	6-8-6 MOE	42	0,6	2,5	0,3

Estudio 8 (con gapmers de MOE, oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt oligonucleotides y gapmers (S)-cEt)

Se inyectaron grupos de ratones CD1 macho de ocho a nueve semanas de forma subcutánea una vez por semana durante 6 semanas con 100 mg/kg de gapmers de MOE o 50 mg/kg de oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt o gapmers de (S)-cEt. A un grupo de ratones CD1 macho se le inyectó por vía subcutánea PBS una vez por semana durante 6 semanas. Los ratones se sometieron a eutanasia 48 horas después de la última dosis y se les extrajeron los órganos y plasma para análisis adicionales.

Marcadores químicos en plasma

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función hepática y renal, se midieron los niveles en plasma de transaminasas, albúmina, creatinina y BUN usando un analizador químico clínico automático (Hitachi Olympus

AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación.

Tabla 175

Marcadores de química en plasma en plasma de ratones CD1 el día 43

	Química	Dosis (mg/kg/sem)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Albúmina (g/dL)	Creatinina (mg/dL)	BUN (mg/dL)
PBS	-	-	37	57	2,5	0,08	26
ISIS 532770	5-10-5 MOE	100	57	73	2,5	0,07	24
ISIS 532800	5-10-5 MOE	100	74	126	2,8	0,10	26
ISIS 532809	5-10-5 MOE	100	83	73	2,5	0,07	23
ISIS 588540	5-10-5 MOE	100	106	102	2,7	0,09	27
ISIS 588544	5-10-5 MOE	100	66	62	2,6	0,10	24
ISIS 588548	5-10-5 MOE	100	48	67	2,6	0,08	23
ISIS 588550	5-10-5 MOE	100	65	106	2,5	0,10	25

ISIS 588553	5-10-5 MOE	100	78	90	2,6	0,09	25
ISIS 588555	5-10-5 MOE	100	94	89	2,5	0,08	23
ISIS 588848	Desoxi, MOE y (S)-cEt	50	38	54	2,3	0,07	25
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	50	63	72	2,5	0,10	27

Pesos

Se midieron los pesos corporales de los ratones el día 36. También se midieron los pesos de los órganos, hígado, riñón y bazo después de que se sacrificaron los ratones el día 43. Los resultados de los pesos de los órganos se expresaron como una relación con respecto a los pesos corporales y se normalizaron a la relación de control de PBS.

Tabla 176

Pesos de los órganos/Peso corporal (BW) de ratones CD1

	Química	Dosis (mg/kg/sem)	Riñón/BW	Hígado/BW	Bazo/BW
PBS	-	-	1,0	1,0	1,0
ISIS 532770	5-10-5 MOE	100	1,4	1,1	1,0
ISIS 532800	5-10-5 MOE	100	1,5	1,1	0,9
ISIS 532809	5-10-5 MOE	100	1,3	1,2	0,9
ISIS 588540	5-10-5 MOE	100	1,3	1,2	1,0
ISIS 588544	5-10-5 MOE	100	1,6	1,1	1,0
ISIS 588548	5-10-5 MOE	100	1,7	1,2	1,0
ISIS 588550	5-10-5 MOE	100	1,5	1,2	1,0
ISIS 588553	5-10-5 MOE	100	1,5	1,0	0,8
ISIS 588555	5-10-5 MOE	100	1,8	1,2	1,0

ISIS 588848	Desoxi, MOE y (S)-cEt	50	1,3	1,0	0,9
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	50	1,4	1,1	0,9

Ensayos de citocinas

La sangre obtenida de todos los grupos de ratones se envió a Antech Diagnostics para determinar las mediciones de los diversos niveles de citocina, tal como IL-6, MDC, MIP1β, IP-10, MCP1, MIP-1α y RANTES. Los resultados se muestran en la Tabla 54.

Tabla 177

Niveles de citocina (pg/mL) en plasma de ratones CD1

	Química	IL-6	MDC	MIP1β	IP-10	MCP1	MIP-1α	RANTES
PBS	-	70	16	23	20	17	6	2
ISIS 532770	5-10-5 MOE	101	18	146	116	101	24	6
ISIS 532800	5-10-5 MOE	78	17	83	53	105	1	3
ISIS 532809	5-10-5 MOE	66	19	60	32	55	20	4

ISIS 588540	5-10-5 MOE	51	18	126	70	75	4	3
ISIS 588544	5-10-5 MOE	157	14	94	34	102	1	3
ISIS 588548	5-10-5 MOE	164	12	90	66	84	10	4
ISIS 588550	5-10-5 MOE	58	21	222	124	157	3	5
ISIS 588553	5-10-5 MOE	62	14	183	60	103	9	4
ISIS 588555	5-10-5 MOE	70	19	172	171	178	16	9
ISIS 588848	Desoxi, MOE y (S)-cEt	59	13	61	27	63	12	4
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	48	14	56	38	85	10	3

Ensayos hematológicos

La sangre de todos los grupos de ratones se envió a Antech Diagnostics para determinar las mediciones de hematocritos (HCT), así como también las mediciones de varios glóbulos, tal como WBC, RBC y plaquetas, y el contenido total de

hemoglobina (Hb). Los resultados se muestran en la Tabla 55.

Tabla 178

Marcadores hematológicos en el plasma de ratones CD1

	Química	HCT (%)	Hb (g/dL)	WBC (10^3/µL)	RBC (10^6/µL)	Plaquetas (10^3/µL)
PBS	-	46	15	7	9	960
ISIS 532770	5-10-5 MOE	45	14	5	9	879
ISIS 532800	5-10-5 MOE	45	14	5	9	690
ISIS 532809	5-10-5 MOE	46	14	6	9	1005
ISIS 588540	5-10-5 MOE	49	15	6	10	790
ISIS 588544	5-10-5 MOE	36	11	7	7	899
ISIS 588548	5-10-5 MOE	46	14	6	9	883
ISIS 588550	5-10-5 MOE	42	13	8	8	721
ISIS 588553	5-10-5 MOE	45	14	6	9	719
ISIS 588555	5-10-5 MOE	43	13	8	9	838

ISIS 588848	Desoxi, MOE y (S)-cEt	40	15	8	10	840
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	45	14	8	9	993

Ejemplo 127: Tolerabilidad de oligonucleótidos antisentido que se dirigen al CFB humano en ratas Sprague-Dawley

Las ratas Sprague-Dawley son un modelo multipropósito que se utiliza para evaluar la seguridad y eficacia. Las ratas fueron tratadas con oligonucleótidos antisentido ISIS de los estudios descritos en los Ejemplos anteriores y se evaluaron para verificar cambios en los niveles de varios marcadores químicos en plasma.

Estudio 1 (con gapmers de MOE 5-10-5)

Se mantuvieron ratas Sprague-Dawley macho de siete a ocho semanas en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y se alimentaron ad libitum con alimento para ratas normal Purina, diet 5001. Se inyectaron grupos de 4 ratas Sprague-Dawley cada uno de forma subcutánea una vez por semana durante 6

semanas con 100 mg/kg de gapmers de MOE 5-10-5. A un grupo de control de 6 ratas se le inyectó por vía subcutánea PBS una vez por semana durante 6 semanas. Cuarenta y ocho horas después de la última dosis las ratas se sometieron a eutanasia y se les extrajeron los órganos y plasma para analizarlos adicionalmente.

Función hepática

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función hepática, se midieron los niveles en plasma de transaminasas usando un analizador químico clínico automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los niveles en plasma de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) se midieron y los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación expresados en IU/L. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los niveles de cualquiera de los marcadores de función hepática fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 179

Marcadores de función hepática en ratas Sprague-Dawley

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)
PBS	66	134
ISIS 588544	101	329
ISIS 588550	69	157
ISIS 588553	88	304
ISIS 588554	202	243
ISIS 588555	94	113
ISIS 588556	102	117
ISIS 588560	206	317
ISIS 588564	292	594

Función renal

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función renal, se midieron los niveles en plasma de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina usando un analizador químico clínico automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación, expresados en mg/dL. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los niveles de cualquiera de los

marcadores de función renal fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 180

Marcadores de función renal (mg/dL) en ratas Sprague-Dawley

	BUN	Creatinina
PBS	18	3,5
ISIS 588544	21	3,1
ISIS 588550	21	3,0
ISIS 588553	22	2,8
ISIS 588554	23	3,0
ISIS 588555	22	3,5
ISIS 588556	21	3,2
ISIS 588560	26	2,4
ISIS 588564	24	2,7

Pesos

Las mediciones del peso corporal se realizaron el día 39. Se midió el peso del hígado, corazón, bazo y riñón al final del estudio el día 42 y se presenta en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cualquier cambio en el peso de los órganos fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se

excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 181

Pesos (g)

	Cuerpo	Hígado	Bazo	Riñón
PBS	422	16	1,2	3,9
ISIS 588544	353	15	1,7	2,9
ISIS 588550	321	14	2,1	3,2
ISIS 588553	313	15	2,3	3,2
ISIS 588554	265	11	1,6	2,7
ISIS 588555	345	14	1,4	3,3
ISIS 588556	328	13	1,7	3,1
ISIS 588560	270	13	2,4	3,0
ISIS 588564	253	12	2,9	3,0

Estudio 2 (con oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt)

Se mantuvieron ratas Sprague-Dawley macho de nueve a diez semanas en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y se alimentaron ad libitum con alimento para ratas normal Purina, diet 5001. Se inyectaron grupos de 4 ratas Sprague-Dawley cada uno de forma subcutánea una vez por semana durante 6 semanas con 100 mg/kg de oligonucleótidos de desoxi, MOE y (S)-cEt. A dos grupos de control de 3 ratas cada uno se les

inyectó por vía subcutánea PBS una vez por semana durante 6 semanas. Cuarenta y ocho horas después de la última dosis las ratas se sometieron a eutanasia y se les extrajeron los órganos y plasma para analizarlos adicionalmente.

Función hepática

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función hepática, se midieron los niveles en plasma de transaminasas el día 42 usando un analizador químico clínico automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron los niveles en plasma de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa)y albúmina y los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los niveles de cualquiera de los marcadores de función hepática fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 182

Marcadores de función hepática en ratas Sprague-Dawley

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Albúmina (g/dL)
PBS	55	150	3,4
PBS	64	91	3,5
ISIS 588554	52	92	3,2
ISIS 588835	971	844	4,1
ISIS 588842	317	359	3,8
ISIS 588843	327	753	2,9
ISIS 588846	70	111	3,2
ISIS 588847	65	100	3,0
ISIS 588864	91	109	3,0
ISIS 594430	85	106	3,7

Función renal

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función renal, se midieron los niveles en plasma de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina usando un analizador químico clínico automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación, expresados en mg/dL. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los niveles de cualquiera de los

marcadores de función renal fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 183

Marcadores de función renal (mg/dL) en ratas Sprague-Dawley

	BUN	Creatinina
PBS	17	0,4
PBS	21	0,4
ISIS 588554	20	0,4
ISIS 588835	23	0,5
ISIS 588842	22	0,4
ISIS 588843	51	0,4
ISIS 588846	25	0,5
ISIS 588847	23	0,5
ISIS 588864	23	0,4
ISIS 594430	22	0,5

Pesos

Las mediciones del peso corporal se realizaron el día 39. Se midió el peso del hígado, corazón, bazo y riñón al final del estudio el día 42 y se presenta en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron

cualquier cambio en el peso de los órganos fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 184

Pesos (g)

	Cuerpo	Hígado	Bazo	Riñón
PBS	466	16	0,9	3,8
PBS	485	16	0,9	3,6
ISIS 588554	393	15	2,3	2,6
ISIS 588835	387	16	1,0	3,3
ISIS 588842	414	22	1,5	3,7
ISIS 588843	427	20	2,5	4,2
ISIS 588846	366	16	2,1	3,3
ISIS 588847	402	15	1,6	3,1
ISIS 588864	364	15	2,1	3,8
ISIS 594430	420	16	1,2	3,6

Estudio 3 (con gapmers de MOE)

Se mantuvieron ratas Sprague-Dawley macho de nueve a diez semanas en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y se alimentaron ad libitum con alimento para ratas normal Purina, diet 5001. Se inyectaron grupos de 4 ratas Sprague-Dawley

cada uno de forma subcutánea una vez por semana durante 6 semanas con 100 mg/kg de gapmers de MOE. A un grupo de control de 6 ratas se le inyectó por vía subcutánea PBS una vez por semana durante 6 semanas. Cuarenta y ocho horas después de la última dosis las ratas se sometieron a eutanasia y se les extrajeron los órganos y plasma para analizarlos adicionalmente.

Función hepática

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función hepática, se midieron los niveles en plasma de transaminasas el día 43 usando un analizador químico clínico automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los niveles en plasma de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) se midieron y los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación expresados en IU/L. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los niveles de cualquiera de los marcadores de función hepática fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 185

Marcadores de función hepática en ratas Sprague-Dawley

	Química	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Albúmina (g/dL)
PBS	-	52	110	3,7
ISIS 588563	5-10-5 MOE	175	291	2,9
ISIS 599024	3-10-4 MOE	139	173	1,4
ISIS 599093	5-7-5 MOE	116	238	2,6
ISIS 599149	4-8-5 MOE	232	190	3,4
ISIS 599155	4-8-5 MOE	108	215	2,5
ISIS 599202	5-8-5 MOE	65	86	3,5
ISIS 599203	5-8-5 MOE	71	97	3,1
ISIS 599208	5-8-5 MOE	257	467	1,9
ISIS 599261	3-10-5 MOE	387	475	1,5
ISIS 599267	3-10-5 MOE	201	337	2,7

Función renal

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función renal, se midieron los niveles en plasma de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina usando un analizador químico clínico automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación, expresados en mg/dL. Los oligonucleótidos ISIS

que provocaron cambios en los niveles de cualquiera de los marcadores de función renal fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 186

Marcadores de función renal (mg/dL) en ratas Sprague-Dawley

	Química	BUN	Creatinina
PBS	-	16	0,3
ISIS 588563	5-10-5 MOE	26	0,4
ISIS 599024	3-10-4 MOE	135	1,2
ISIS 599093	5-7-5 MOE	29	0,4
ISIS 599149	4-8-5 MOE	23	0,4
ISIS 599155	4-8-5 MOE	29	0,4
ISIS 599202	5-8-5 MOE	19	0,4
ISIS 599203	5-8-5 MOE	22	0,4
ISIS 599208	5-8-5 MOE	26	0,3
ISIS 599261	3-10-5 MOE	228	1,6
ISIS 599267	3-10-5 MOE	24	0,4

Pesos

Las mediciones del peso corporal se realizaron el día 39. Se midió el peso del hígado, corazón, bazo y riñón al final del

estudio el día 42 y se presenta en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cualquier cambio en el peso de los órganos fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 187

Pesos (g)

	Química	Cuerpo	Hígado	Bazo	Riñón
PBS	-	471	16	1,0	4,1
ISIS 588563	5-10-5 MOE	311	16	3,4	4,1
ISIS 599024	3-10-4 MOE	297	11	1,0	3,5
ISIS 599093	5-7-5 MOE	332	18	4,1	5,0
ISIS 599149	4-8-5 MOE	388	16	2,3	3,7
ISIS 599155	4-8-5 MOE	290	15	2,9	4,5
ISIS 599202	5-8-5 MOE	359	13	1,3	3,2
ISIS 599203	5-8-5 MOE	334	14	1,8	3,3
ISIS 599208	5-8-5 MOE	353	29	4,7	4,6
ISIS 599261	3-10-5 MOE	277	10	0,9	3,2
ISIS 599267	3-10-5 MOE	344	21	3,9	4,7

Estudio 4 (con gapmers de MOE)

Se mantuvieron ratas Sprague-Dawley macho de nueve a diez semanas en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y se alimentaron ad libitum con alimento para ratas normal Purina, diet 5001. Se inyectaron grupos de 4 ratas Sprague-Dawley cada uno de forma subcutánea una vez por semana durante 6 semanas con 100 mg/kg de gapmers de MOE. A un grupo de control de 6 ratas se le inyectó por vía subcutánea PBS una vez por semana durante 6 semanas. Cuarenta y ocho horas después de la última dosis las ratas se sometieron a eutanasia y se les extrajeron los órganos y plasma para analizarlos adicionalmente.

Función hepática

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función hepática, se midieron los niveles en plasma de transaminasas el día 42 usando un analizador químico clínico automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los niveles en plasma de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) se midieron y los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación expresados en IU/L. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los niveles

de cualquiera de los marcadores de función hepática fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 188

Marcadores de función hepática en ratas Sprague-Dawley

	Química	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Albúmina (g/dL)
PBS	-	48	77	3,9
ISIS 532800	5-10-5 MOE	72	111	3,4
ISIS 532809	5-10-5 MOE	59	89	3,8
ISIS 588540	5-10-5 MOE	146	259	3,8
ISIS 599268	3-10-5 MOE	175	206	2,7
ISIS 599322	6-7-6 MOE	523	567	3,3
ISIS 599374	5-9-5 MOE	114	176	3,0
ISIS 599378	5-9-5 MOE	124	116	3,2
ISIS 599380	5-9-5 MOE	148	210	3,4
ISIS 599441	6-8-6 MOE	51	91	2,6

Función renal

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función renal, se midieron los niveles en plasma de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina usando un analizador químico

clínico automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación, expresados en mg/dL. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los niveles de cualquiera de los marcadores de función renal fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 189

Marcadores de función renal (mg/dL) en ratas Sprague-Dawley

	Química	BUN	Creatinina
PBS	-	15	0,4
ISIS 532800	5-10-5 MOE	26	0,5
ISIS 532809	5-10-5 MOE	18	0,5
ISIS 588540	5-10-5 MOE	22	0,5
ISIS 599268	3-10-5 MOE	28	0,5
ISIS 599322	6-7-6 MOE	24	0,5
ISIS 599374	5-9-5 MOE	29	0,5
ISIS 599378	5-9-5 MOE	22	0,4
ISIS 599380	5-9-5 MOE	26	0,5
ISIS 599441	6-8-6 MOE	24	0,4

Pesos

Las mediciones del peso corporal se realizaron el día 39. Se midió el peso del hígado, corazón, bazo y riñón al final del estudio el día 42 y se presenta en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cualquier cambio en el peso de los órganos fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 190

Pesos (g)

	Química	Cuerpo	Hígado	Bazo	Riñón
PBS	-	502	16	0,9	3,7
ISIS 532800	5-10-5 MOE	376	16	2,0	3,4
ISIS 532809	5-10-5 MOE	430	16	1,4	3,4
ISIS 588540	5-10-5 MOE	391	16	1,8	3,5
ISIS 599268	3-10-5 MOE	332	16	3,6	3,6
ISIS 599322	6-7-6 MOE	348	13	2,1	3,4
ISIS 599374	5-9-5 MOE	302	12	2,0	3,3
ISIS 599378	5-9-5 MOE	332	11	1,1	2,8
ISIS 599380	5-9-5 MOE	350	11	1,5	3,3
ISIS 599441	6-8-6 MOE	368	16	2,5	3,3

Estudio 5 (con gapmers de MOE y oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt)

Se mantuvieron ratas Sprague-Dawley macho de nueve a diez semanas en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y se alimentaron ad libitum con alimento para ratas normal Purina, diet 5001. Se inyectaron grupos de 4 ratas Sprague-Dawley cada uno de forma subcutánea una vez por semana durante 6 semanas con 100 mg/kg de gapmer MOE o con 50 mg/kg de oligonucleótidos de desoxi, MOE y (S)-cEt. A un grupo de control de 4 ratas se le inyectó por vía subcutánea PBS una vez por semana durante 6 semanas. Cuarenta y ocho horas después de la última dosis las ratas se sometieron a eutanasia y se les extrajeron los órganos y plasma para analizarlos adicionalmente.

Función hepática

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función hepática, se midieron los niveles en plasma de transaminasas el día 42 usando un analizador químico clínico automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los niveles en plasma de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) se midieron y los resultados se presentan en la Tabla que

figura a continuación expresados en IU/L. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los niveles de cualquiera de los marcadores de función hepática fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 191

Marcadores de función hepática en ratas Sprague-Dawley

	Química	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Albúmina (g/dL)
PBS	-	49	74	3,3
ISIS 532770	5-10-5 MOE	95	132	3,3
ISIS 588851	Desoxi, MOE, y (S)-cEt	47	72	3,1
ISIS 588856	Desoxi, MOE, y (S)-cEt	56	75	3,0
ISIS 588865	Desoxi, MOE, y (S)-cEt	62	84	2,9
ISIS 588867	Desoxi, MOE, y (S)-cEt	73	214	2,9
ISIS 588868	Desoxi, MOE, y (S)-cEt	59	83	3,1
ISIS 588870	Desoxi, MOE, y (S)-cEt	144	144	3,4

Función renal

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función renal, se midieron los niveles en plasma y orina de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina usando un analizador químico clínico automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en las Tablas que figuran a continuación, expresados en mg/dL. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los niveles de cualquiera de los marcadores de función renal fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 192

Marcadores de función renal (mg/dL) en el plasma de ratas Sprague-Dawley

	Química	BUN	Creatinina
PBS	-	18	0,3
ISIS 532770	5-10-5 MOE	20	0,4

ISIS 588851	Desoxi, MOE y (S)-cEt	20	0,4
ISIS 588856	Desoxi, MOE y (S)-cEt	22	0,4
ISIS 588865	Desoxi, MOE y (S)-cEt	24	0,5
ISIS 588867	Desoxi, MOE y (S)-cEt	22	0,4
ISIS 588868	Desoxi, MOE y (S)-cEt	19	0,4
ISIS 588870	Desoxi, MOE y (S)-cEt	20	0,5

Tabla 193

Marcadores de función renal (mg/dL) en la orina de ratas Sprague-Dawley

	Química	Proteína total	Creatinina
PBS	-	80	92
ISIS 532770	5-10-5 MOE	466	69
ISIS 588851	Desoxi, MOE, y (S)-cEt	273	64

ISIS 588856	Desoxi, MOE, y (S)-cEt	259	68
ISIS 588865	Desoxi, MOE, y (S)-cEt	277	67
ISIS 588867	Desoxi, MOE, y (S)-cEt	337	68
ISIS 588868	Desoxi, MOE, y (S)-cEt	326	75
ISIS 588870	Desoxi, MOE, y (S)-cEt	388	82

Pesos

Las mediciones del peso corporal se realizaron el día 39. Se midió el peso del hígado, corazón, bazo y riñón al final del estudio el día 42 y se presenta en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cualquier cambio en el peso de los órganos fuera del intervalo previsto para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 194

Pesos (g)

	Química	Cuerpo	Hígado	Bazo	Riñón
PBS	-	489	16	0,9	3,5
ISIS 532770	5-10-5 MOE	372	15	1,7	3,1
ISIS 588851	Desoxi, MOE, y (S)-cEt	285	14	1,4	3,2
ISIS 588856	Desoxi, MOE, y (S)-cEt	415	15	1,1	3,3
ISIS 588865	Desoxi, MOE, y (S)-cEt	362	14	2,0	3,3
ISIS 588867	Desoxi, MOE, y (S)-cEt	406	15	2,4	3,4
ISIS 588868	Desoxi, MOE, y (S)-cEt	399	15	1,5	3,4
ISIS 588870	Desoxi, MOE, y (S)-cEt	446	14	1,4	3,3

Estudio 6 (con gapmers de MOE, oligonucleótidos desoxi, MOE y (S)-cEt oligonucleotides y gapmers (S)-cEt)

Se mantuvieron ratas macho en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y se alimentaron ad libitum con alimento para ratas normal Purina, diet 5001. Se inyectaron grupos de 4

ratas cada uno de forma subcutánea una vez por semana durante 6 semanas con 100 mg/kg de gapmers de MOE o con 50 mg/kg de oligonucleótidos de desoxi, MOE y (S)-cEt o gapmer (S)-cEt. A un grupo de control de 4 ratas se le inyectó por vía subcutánea PBS una vez por semana durante 6 semanas. Cuarenta y ocho horas después de la última dosis las ratas se sometieron a eutanasia y se les extrajeron los órganos y plasma para analizarlos adicionalmente.

Función hepática

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función hepática, se midieron los niveles en plasma de transaminasas el día 42 usando un analizador químico clínico automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los niveles en plasma de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) se midieron y los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación expresados en IU/L.

Tabla 195

Marcadores de función hepática

	Química	Dosis (mg/kg/wk)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Albúmina (g/dL)
PBS	-	-	54	73	4,3
ISIS 532770	5-10-5 MOE	100	57	114	4,4
ISIS 532800	5-10-5 MOE	100	176	180	4,3
ISIS 532809	5-10-5 MOE	100	71	132	4,1
ISIS 588540	5-10-5 MOE	100	89	202	4,4
ISIS 588544	5-10-5 MOE	100	75	152	3,9
ISIS 588548	5-10-5 MOE	100	50	71	4,1
ISIS 588550	5-10-5 MOE	100	80	133	3,6
ISIS 588553	5-10-5 MOE	100	59	112	3,9
ISIS 588555	5-10-5 MOE	100	97	142	3,8
ISIS 588848	Desoxi, MOE y (S)-cEt	50	53	82	3,9
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	50	198	172	4,4

Función renal

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, se midieron los niveles de proteína total y creatinina en orina usando un analizador químico clínico

automático (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación. Los oligonucleótidos ISIS que provocaron cambios en los niveles de cualquiera de los marcadores de función renal fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos antisentido se excluyeron de los estudios adicionales.

Tabla 196

Relación total de proteína/creatinina en la orina de ratas

	Química	Dosis (mg/kg/wk)	Relación P/C
PBS	-	-	1,1
ISIS 532770	5-10-5 MOE	100	8,3
ISIS 532800	5-10-5 MOE	100	6,5
ISIS 532809	5-10-5 MOE	100	6,1
ISIS 588540	5-10-5 MOE	100	10,1
ISIS 588544	5-10-5 MOE	100	7,9
ISIS 588548	5-10-5 MOE	100	6,6
ISIS 588550	5-10-5 MOE	100	7,6
ISIS 588553	5-10-5 MOE	100	7,0
ISIS 588555	5-10-5 MOE	100	6,2

ISIS 588848	Desoxi, MOE y (S)-cEt	50	5,2
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	50	5,3

Pesos

Las mediciones del peso corporal se realizaron el día 39. Se midió el peso del hígado, corazón, bazo y riñón al final del estudio el día 42 y se presenta en la Tabla que figura a continuación. Los resultados de los pesos de los órganos se expresaron como una relación con respecto a los pesos corporales y se normalizaron a la relación de control de PBS.

Tabla 197

Relaciones de pesos de los órganos/Peso corporal (BW)

	Química	Dosis (mg/kg/sem)	Bazo/BW	Hígado/BW	Riñón/BW
PBS	-	-	1,0	1,0	1,0
ISIS 532770	5-10-5 MOE	100	2,0	1,2	1,0
ISIS 532800	5-10-5 MOE	100	2,8	1,3	1,0
ISIS 532809	5-10-5 MOE	100	2,2	1,1	1,0

ISIS 588540	5-10-5 MOE	100	2,2	1,4	1,0
ISIS 588544	5-10-5 MOE	100	2,5	1,3	1,1
ISIS 588548	5-10-5 MOE	100	2,1	1,3	1,1
ISIS 588550	5-10-5 MOE	100	3,9	1,4	1,1
ISIS 588553	5-10-5 MOE	100	4,1	1,4	1,4
ISIS 588555	5-10-5 MOE	100	1,8	1,3	1,0
ISIS 588848	Desoxi, MOE y (S)-cEt	50	3,1	1,3	1,1
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	50	1,7	1,0	1,1

Ejemplo 128: Eficacia de los oligonucleótidos antisentido contra ARNm de CFB humano en ratones hCFB

Los compuestos seleccionados se analizaron para determinar la eficacia en ratones transgénicos de CFB humano, línea fundadora #6 El gen del CFB humano se ubica en el cromosoma 6: posición 31913721- 31919861. Se seleccionó un fásmido (ABC14-50933200C23) que contiene la secuencia de CFB para porducir ratones transgénicos que expresan el gen del CFB humano. Se utilizaron las enzimas de restricción Cla I (31926612) y Age I (31926815) para generar un fragmento de 22,127 bp que contiene el gen de CFB para inyección

pronuclear. El ADN se confirmó mediante el análisis de enzimas de restricción usando Pvu I. El fragmento de ADN de 22,127 bp se inyectó en embriones C57BL/6NTac. Se cultivaron 6 fundadoras positivas. La fundadora #6 expresó el ARNm de CFB humano en el hígado y se cruzó con la 3.ª generación. La progenie de los ratones de la 3.ª generación se utilizó para evaluar los ASO de CFB humano para la reducción del ARNm de CFB humano.

Tratamiento

A grupos de 3 ratones se les inyectó de forma subcutánea dos veces a la semana durante la primera semana con 50 mg/kg de oligonucleótidos ISIS, seguido de una dosificación una vez por semana con 50 mg/kg de oligonucleótidos ISIS durante tres semanas adicionales. A un grupo de control de 4 ratones se le inyectó de forma subcutánea dos veces a la semana durante 2 semanas durante la primera semana con PBS durante la primera semana durante tres semanas adicionales. Cuarenta y ocho horas después de la última dosis los ratones se sometieron a eutanasia y se les extrajeron los órganos y plasma para analizarlos adicionalmente.

Análisis de ARN

Al final del período de dosificación, se extrajo el ARN del hígado y riñón para realizar el análisis PCR en tiempo real de los niveles de ARNm de CFB. Se midieron los niveles de ARNm de CFB humano usando el conjunto de sonda y cebador RTS3459 humano. Los niveles de ARNm de CFB se normalizaron a RIBOGREEN®, y también el gen constitutivo, Ciclofilina. Se calcularon los resultados como porcentaje de inhibición de la expresión de ARNm de CFB en comparación con el control. Todos los oligonucleótidos antisentido produjeron una inhibición significativa de los niveles de ARNm de CFB humano en el hígado.

Tabla 198

Porcentaje de reducción de los niveles de ARNm de CFB humano en ratones hCFB

N.° ISIS	Normalizado a RIBOGREEN	Normalizado a Ciclofilina
532770	86	87
532800	88	87
532809	69	69
588540	95	94
588544	91	91

588548	78	77
588550	89	88
588553	94	94
588555	94	94
588848	83	82
594430	78	76

Ejemplo 129: Inhibición antisentido *in vivo* de CFB murino

Se diseñaron varios oligonucleótidos antisentido que se dirigen al ARNm de CFB murino (n.° de acceso GENBANK NM_008198.2, incorporada en la presente como SEQ ID NO: 5). Los sitios de inicio objetivo y las secuencias de cada oligonucleótido se describen en la tabla a continuación. Los oligonucleótidos antisentido quiméricos en la tabla que figura más adelante se diseñaron como gapmers MOE 5-10-5. Los gapmers tienen una longitud de 20 nucleósidos, donde el segmento intermedio central comprende 10 2'-desoxinucleósidos y se encuentra flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden 5 nucleósidos cada una. Cada nucleósido en el segmento de ala 5' y cada nucleósido en el segmento de ala 3' tiene una modificación 2'-MOE. Los enlaces internucleósidos en cada gapmer son enlaces de fosforotioato

(P=S). Todos los residuos de citosina en cada gapmer son 5-metilcitosinas.

Tabla 199

Gapmers que se dirigen a CFB murino

N.º ISIS	Secuencia	Sitio de inicio objetivo en la SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO:
516269	GCATAAGAGGGTACCAGCTG	2593	804
516272	GTCCTTTAGCCAGGGCAGCA	2642	805
516323	TCCACCCATGTTGTGCAAGC	1568	806
516330	CCACACCATGCCACAGAGAC	1826	807
516341	TTCCGAGTCAGGCTCTTCCC	2308	808

Tratamiento

Cada uno de los grupos de cuatro ratones C57BL/6 recibió inyección subcutánea de 50 mg/kg de ISIS 516269, ISIS 516272, ISIS 516323, ISIS 516330, o ISIS 516341 administrada semanalmente durante 3 semanas. A un grupo de ratones de control se le inyectó solución salina tamponada con fosfato (PBS) administrada semanalmente durante 3 semanas.

Análisis de ARN de CFB

Al final del estudio, se extrajo ARN de tejido del hígado para el análisis de PCR en tiempo real de CFB usando el conjunto de sonda y cebador RTS3430 (secuencia directa GGGCAAACAGCAATTTGTGA, denominada en la presente SEQ ID NO: 816; secuencia inversa TGGCTACCCACCTTCCTTGT, denominada en la presente SEQ ID NO: 817; secuencia de sonda CTGGATACTGTCCCAATCCCGGTATTCCX, denominada en la presente SEQ ID NO: 818). Los niveles de ARNm se normalizaron usando RIBOGREEN®. Como se muestra en la Tabla a continuación, algunos de los oligonucleótidos antisentido lograron una reducción del de CFB murino en comparación con el control con PBS. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB con respecto al control.

Tabla 200

Porcentaje de inhibición de ARNm de CFB murino en ratones C57BL/6

N.° ISIS	%
516269	29
516272	72
516323	77
516330	62

516341	72

Análisis proteico

Se midieron los niveles de proteína de CFB en el riñón, hígado, plasma y en el ojo mediante transferencia western usando anticuerpo anti-CFB de cabra (Sigma Aldrich). Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB con respecto al control de PBS. 'n/a' indica que no se tomaron mediciones para esa muestra. Tal como se muestra en la Tabla a continuación, la inhibición antisentido de CFB por parte de oligonucleótidos ISIS dio como resultado la reducción de la proteína de CFB en varios tejidos. Tal como se muestra en la Tabla a continuación, la administración sistémica de oligonucleótido ISIS fue eficaz para reducir los niveles de CFB en el ojo.

Tabla 201

Porcentaje de inhibición de proteína de CFB murino en ratones C57BL/6

N.º ISIS	Riñón	Hígado	Plasma	Ojo
516269	20	58	n/a	70
516272	48	74	n/a	99

516323	73	85	90	93
516330	77	80	n/a	n/a
516341	80	88	68	n/a

Ejemplo 130: Inhibición antisentido dependiente de CFB murino

Cada uno de los grupos de cuatro ratones C57BL/6 recibió inyección subcutánea de 25 mg/kg, 50 mg/kg o 100 mg/kg de ISIS 516272, y ISIS 516323 administrada semanalmente durante 6 semanas. Otros dos grupos de ratones recibieron inyección subcutánea de 100 mg/kg de ISIS 516330 o ISIS 516341 administrada semanalmente durante 6 semanas. A dos grupos de ratones de control se les inyectó solución salina tamponada con fosfato (PBS) administrada semanalmente durante 6 semanas.

Análisis de ARN de CFB

Se extrajo el ARN de tejidos del hígado y riñón para análisis de CFB mediante PCR en tiempo real, usando el conjunto de cebador y sonda RTS3430. Los niveles de ARNm se normalizaron usando RIBOGREEN®. Como se muestra en la Tabla a continuación, los oligonucleótidos antisentido lograron una

reducción dependiente de la dosis del CFB murino en comparación con el control con PBS. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB con respecto al control.

Tabla 202

Porcentaje de inhibición de ARNm de CFB murino en ratones C57BL/6

N.° ISIS	Dosis (mg/kg/sem)	Hígado	Riñón
516272	25	39	32
	50	73	36
	100	87	42
516323	25	36	41
	50	65	47
	100	79	71
516330	100	85	45
516341	200	89	65

Análisis proteico

Se midieron los niveles de proteína de CFB en el plasma mediante transferencia western usando anticuerpo anti-CFB de cabra (Sigma Aldrich). Tal como se muestra en la Tabla a continuación, la inhibición antisentido de CFB por parte de

los oligonucleótidos ISIS dio como resultado la reducción de la proteína de CFB. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB con respecto al control. 'n/a' indica que no se tomaron mediciones para esa muestra.

También se midieron los niveles de proteína de CFB en el ojo mediante transferencia western. Todos los grupos de tratamiento demostraron una inhibición de CFB del 95 %, donde algunas mediciones de muestra se encontraban debajo de los niveles de detección del ensayo.

Tabla 203

Porcentaje de inhibición de proteína de CFB murino en ratones C57BL/6

N.° ISIS	Dosis (mg/kg/sem)	Hígado
516272	25	32
	50	70
	100	83
516323	25	43
	50	80
	100	90
516330	100	n/a
516341	200	n/a

Ejemplo 131: Efecto de la inhibición antisentido de CFB en el modelo de ratón NZB/W F1

El NZB/W F1 es el modelo clásico más antiguo de lupus, donde los ratones desarrollan fenotipos similares a lupus graves comparables a los de los pacientes con lupus (Theofilopoulos, A.N. y Dixon, F.J. Advances in Immunology, vol. 37, pp. 269-390, 1985). Estos fenotipos similares a lupus incluyen linfadenopatía, esplenomegalia, autoanticuerpos antinucleares (ANA) de suero elevados que incluyen IgG anti-ADNcd, de los cuales la mayoría son IgG2a y IgG3, y glomerulonefritis (GN) mediada por complejo inmunitario que se vuelve evidente a los 5-6 meses de edad, lo que provoca falla renal y muerte a los 10-12 meses de edad.

Estudio 1

Se realizó un estudio para demostrar que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido que se dirigen al CFB mejoraría la patología renal en el modelo de ratón. Se adquirieron ratones hembra NZB/W F1, de 17 semanas, de Jackson Laboratories. Cada uno de los grupos de 16 ratones recibió

dosis de 100 µg/kg/semana de ISIS 516272 o ISIS 516323 durante 20 semanas. Otro grupo de 16 ratones recibió una dosis de 100 µg/kg/semana del oligonucleótido de control ISIS 141923 durante 20 semanas. Otro grupo de 10 ratones recibió dosis de PBS durante 20 semanas y sirvió como el grupo de control con el cual se compararon todos los demás grupos. Se recolectaron los criterios de valoración de extremos 48 horas después de que se inyectó la última dosis.

Análisis de ARN de CFB

Se extrajo el ARN de tejidos del hígado y riñón para análisis de CFB mediante PCR en tiempo real, usando el conjunto de cebador y sonda RTS3430. Los niveles de ARNm se normalizaron usando RIBOGREEN®. Como se muestra en la Tabla a continuación, algunos de los oligonucleótidos antisentido lograron una reducción del de CFB murino en comparación con el control con PBS. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB con respecto al control.

Tabla 204

Porcentaje de inhibición de ARNm de CFB murino en ratones NZB/W F1

N.° ISIS	Hígado	Riñón
516272	55	25
516323	63	43

141923	0	0

Proteinuria

Se espera proteinuria en 60 % de los animales en este modelo de ratón. La incidencia acumulada de proteinuria grave se midió al calcular la relación de proteína total con respecto a creatinina usando un analizador clínico. Los resultados se presentan en la tabla que figura a continuación y demuestran que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido que se dirigen a CFB logró una reducción de proteinuria en los ratones en comparación con el control con PBS y los ratones tratadso con oligonucleótidos de control.

Tabla 205

Porcentaje de incidencia acumulada de proteinuria grave en ratones NZB/W F1

	%
PBS	40
ISIS 516272	6
ISIS 516323	0
ISIS 141923	25

Supervivencia

La supervivencia de los ratones se monitoreó al realizar un conteo de los ratones al inicio del tratamiento y luego nuevamente en la semana 20. Los resultados se presentan en la tabla que figura a continuación y demuestran que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido que se dirigen a CFB aumentó la supervivencia en los ratones en comparación con el control con PBS y los ratones tratados con oligonucleótidos de control.

Tabla 206

Cantidad de ratones sobrevivientes y % de supervivencia

	Semana 1	Semana 20	% de supervivencia a la semana 20
PBS	10	6	60
ISIS 516272	16	15	94
ISIS 516323	16	16	100
ISIS 141923	16	12	75

Deposición glomerular

La cantidad de deposición de C3, así como también la deposición de IgG, en los glomérulos de los riñones se midió mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-C3. Los resultados se presentan en la tabla que figura a continuación y demuestran que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido que se dirigen a CFB logró una reducción de deposiciones de C3 e IgG en los glomérulos del riñón en comparación con el control con PBS y los ratones tratados con oligonucleótidos de control.

Tabla 207

Porcentaje de inhibición de deposición glomerular en ratones NZB/W F1

N.° ISIS	C3	IgG
516272	45	20
516323	48	2
141923	0	0

Estudio 2

Se adquirieron ratones hembra NZB/W F1, de 16 semanas, de Jackson Laboratories. Un grupo de 10 ratones recibió una dosis de 100 µg/kg/semana de ISIS 516323 durante 12 semanas. Otro grupo de 10 ratones recibió una dosis de 100 µg/kg/semana del oligonucleótido de control ISIS 141923 durante 12 semanas. Otro grupo de 10 ratones recibió dosis de PBS durante 12 semanas y sirvió como el grupo de control con el cual se compararon todos los demás grupos. Se recolectaron los criterios de valoración de extremos 48 horas después de que se inyectó la última dosis.

Análisis de ARN de CFB

Se extrajo el ARN de tejidos del hígado y riñón para análisis de CFB mediante PCR en tiempo real, usando el conjunto de cebador y sonda RTS3430. Como se muestra en la Tabla a continuación, el tratamiento con ISIS 516323 logró una reducción del de CFB murino en comparación con el control con PBS. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB con respecto al control.

Tabla 208

Porcentaje de inhibición de ARNm de CFB murino en ratones NZB/W F1

N.º ISIS	Hígado	Riñón
516323	75	46
141923	0	6

Proteinuria

La incidencia acumulada de proteinuria grave se evaluó al calcular la relación de proteína total en orina con respecto a creatinina, así como también mediante la medición de los niveles totales de microalbúmina. Los resultados se presentan en las tablas que figuran a continuación y demuestran que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido que se dirigen a CFB redujo la proteinuria en los ratones en comparación con el control con PBS y los ratones tratados con oligonucleótidos de control.

Tabla 209

Proteinuria en ratones NZB/W F1 medida como niveles de microalbúmina en orina (mg/dl)

N.° ISIS	Semana 0	Semana 6	Semana 8	Semana 10
516323	0	0	5,4	0,4
141923	0	8,28	8,6	5,6

Tabla 210

Proteinuria en ratones NZB/W F1 medida como relación de proteína total con respecto a creatinina

N.° ISIS	Semana 0	Semana 6	Semana 8	Semana 10
516323	5,5	7,8	8,6	7,2
141923	6,9	10,0	13,5	7,2

Supervivencia

La supervivencia de los ratones se monitoreó al realizar un conteo de los ratones al inicio del tratamiento y luego nuevamente en la semana 12. Los resultados se presentan en la tabla que figura a continuación y demuestran que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido que se dirigen a CFB aumentó la supervivencia en los ratones en comparación con el control con PBS y los ratones tratados con oligonucleótidos de control.

Tabla 211

Cantidad de ratones sobrevivientes

	Semana 1	Semana 12
PBS	10	9
ISIS 516323	10	10
ISIS 141923	10	9

Ejemplo 132: Efecto de la inhibición antisentido de CFB en el modelo de ratón MRL

El modelo de ratón de nefritis lúpica MRL/lpr desarrolla un fenotipo similar a LES caracterizado por linfadenopatía debido a una acumulación de células T negativas dobles ($CD4^-$ $CD8^-$) y $B220^+$. Estos ratones presentan una tasa de mortalidad acelerada. Además, los ratones tienen concentraciones altas de inmunoglobulinas en circulación, que incluyen niveles elevados de autoanticuerpos tal como ANA, anti-ADNcs, anti-ADNcd, anti-Sm, y factores reumatoides, lo que da como resultado grandes cantidades de complejos inmunitarios (Andrews, B. et ál., J. Exp. Med. 148: 1198-1215, 1978).

Tratamiento

Se realizó un estudio para investigar si el tratamiento con oligonucleótidos antisentido que se dirigen al CFB revertiría la patología renal en el modelo de ratón. Se adquirieron ratones hembra MRL/lpr, de 14 semanas, de Jackson Laboratories. Un grupo de 10 ratones recibió una dosis de 50 µg/kg/semana de ISIS 516323 durante 7 semanas. Otro grupo de 10 ratones recibió una dosis de 50 µg/kg/semana del oligonucleótido de control ISIS 141923 durante 7 semanas. Otro grupo de 10 ratones recibió dosis de PBS durante 7 semanas y sirvió como el grupo de control con el cual se compararon todos los demás grupos. Se recolectaron los criterios de valoración de extremos 48 horas después de que se inyectó la última dosis.

Análisis de ARN de CFB

Se extrajo el ARN de tejidos del hígado para análisis de CFB mediante PCR en tiempo real, usando el conjunto de cebador y sonda RTS3430. Como se muestra en la Tabla a continuación, ISIS 516323 redujo el CFB en comparación con el control con PBS. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB con respecto al control.

Tabla 212

Porcentaje de inhibición de ARNm de CFB murino en ratones MRL/lpr

N.° ISIS	%
516323	68
141923	4

Patología renal

La patología renal se evaluó mediante dos métodos. Las secciones histológicas del riñón se tiñeron con hematoxilina-eosina. El control con PBS demostró la presencia de moldes tubulares de semilunas multiglomerulares, que es un síntoma de glomeruloesclerosis. Por el contrario, las secciones de ratones tratados con ISIS 516323 mostraron moldes tubulares de semilunas ausentes con mínimos cambios fibróticos en la cápsula de bowman, expansión segmentaria de células mesangiales de moderada a grave y engrosamiento de la membrana basal glomerular.

La acumulación de C3 en el riñón también se evaluó mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti-C3. El puntaje de intensidad de inmunohistoquímica de C3 en el riñón entero se calculó mediante un sistema de puntaje de intensidad, que se

calculó al capturar 10 glomérulos por riñón y al calcular la intensidad de la tinción positiva para C3. Los resultados se presentan en la tabla que figura a continuación y demuestran que el tratamiento con ISIS 516323 redujo la acumulación de C3 renal en comparación con grupos de control.

Tabla 213

Acumulación de C3 renal en ratones MRL/lpr

	Puntaje de intensidad de C3 en el riñón entero	% de cuantificación de C3 (área/área total) de PBS promedio
PBS	2,5	100
ISIS 516323	1,6	68
ISIS 141923	2,2	99

Niveles de C3 en plasma

La reducción de CFB inhibe la activación de la vía alternativa del complemento, lo que evita el consumo de C3 y lleva a una elevación aparente de los niveles de C3 en plasma. Los niveles de C3 en plasma de sangrado terminal se

midieron mediante el analizador clínico. Los resultados se presentan en la tabla que figura a continuación y demuestran que el tratamiento con ISIS 516323 aumentó los niveles de C3 ($p < 0,001$) en el plasma en comparación con grupos de control.

Tabla 214

Niveles de C3 en plasma (mg/dL) en ratones MRL/lpr

N.º ISIS	C3
516323	28
141923	16

Los resultados indican que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido que se dirigen a CFB revierte la patología renal en el modelo de ratón de lupus.

Ejemplo 133: Efecto de la inhibición antisentido de CFB en el modelo de ratón CFH Het

El modelo de ratón heterocigoto CFH (CFH Het, $CFH^{+/-}$) expresa una proteína mutante de Factor H en combinación con la proteína de ratón de longitud completa (Pickering, M.C. Et ál., J. Exp. Med. 2007. 204: 1249-56). La histología renal permanece normal en estos ratones de hasta seis meses de edad.

Estudio 1

Cada uno de los grupos de 8 ratones $CFH^{+/-}$, de 6 semanas, recibió dosis de 75 mg/kg/semana de ISIS 516323 o ISIS 516341 durante 6 semanas. Otro grupo de 8 ratones recibió una dosis de 75 mg/kg/semana del oligonucleótido de control ISIS 141923 durante 6 semanas. Otro grupo de 8 ratones recibió dosis de PBS durante 6 semanas y sirvió como el grupo de control con el cual se compararon todos los demás grupos. Se recolectaron los criterios de valoración de extremos 48 horas después de que se inyectó la última dosis.

Análisis de ARN de CFB

Se extrajo el ARN de tejidos del hígado y riñón para análisis de CFB mediante PCR en tiempo real, usando el conjunto de cebador y sonda RTS3430. Como se muestra en la Tabla a continuación, los oligonucleótidos antisentido redujeron el CFB en comparación con el control con PBS. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de CFB con respecto al control.

Tabla 215

Porcentaje de inhibición de ARNm de CFB murino en ratones $CFH^{+/-}$

N.º ISIS	Hígado	Riñón
516323	80	38
516341	90	44
141923	0	17

Niveles de C3 en plasma

La reducción de CFB inhibe la activación de la vía alternativa del complemento, lo que evita el consumo de C3 y lleva a una elevación aparente de los niveles de C3 en plasma. Los niveles de C3 en plasma de la recolección de plasma terminal se midieron mediante el analizador clínico. Los resultados se presentan en la tabla que figura a continuación y demuestran que el tratamiento con ISIS 516323 aumentó el C3 a niveles normales en el plasma.

Tabla 216

Niveles de C3 en plasma (mg/dL) en ratones $CFH^{+/-}$

N.º ISIS	C3
516323	15
516341	17

141923	8

Estudio 2

Cada uno de los grupos de 5 ratones $CFH^{+/-}$ recibió dosis de 12,5 mg/kg/semana, 25 mg/kg/semana, 50 mg/kg/semana, 75 mg/kg/semana o 100 mg/kg/semana de ISIS 516323 o ISIS 516341 durante 6 semanas. Otro grupo de 5 ratones recibió una dosis de 75 µg/kg/semana del oligonucleótido de control ISIS 141923 durante 6 semanas. Otro grupo de 5 ratones recibió dosis de PBS durante 6 semanas y sirvió como el grupo de control con el cual se compararon todos los demás grupos. Se recolectaron los criterios de valoración de extremos 48 horas después de que se inyectó la última dosis.

Análisis de ARN de CFB

Se extrajo el ARN de tejidos del hígado y riñón para análisis de CFB mediante PCR en tiempo real, usando el conjunto de cebador y sonda RTS3430. Como se muestra en la Tabla a continuación, los oligonucleótidos antisentido redujeron el CFB en comparación con el control con PBS de forma dependiente de la dosis. Los resultados se presentan como el

porcentaje de inhibición de CFB con respecto al control.

Tabla 217

Porcentaje de inhibición de ARNm de CFB murino en el hígado de ratones $CFH^{+/-}$

N.° ISIS	Dosis (mg/kg/semana)	%
516323	12,5	34
	25	51
	50	72
	75	79
	100	92
516341	12,5	38
	25	57
	50	89
	75	92
	100	90
141923	75	13

Niveles de C3 en plasma

La reducción de CFB inhibe la activación de la vía alternativa del complemento, lo que evita el consumo de C3 y lleva a una elevación aparente de los niveles de C3 en

plasma. Los niveles de C3 en plasma de la recolección de plasma terminal se midieron mediante el analizador clínico. Los resultados se presentan en la tabla que figura a continuación y demuestran que el tratamiento con oligonucleótidos ISIS que se dirigen a CFB aumentó los niveles de C3 en el plasma.

Tabla 218

Niveles de C3 en plasma (mg/dL) en ratones $CFH^{+/-}$

	Dosis (mg/kg/semana)	C3
PBS	-	10,1
516323	12,5	11,4
	25	15,5
	50	17,0
	75	18,3
	100	18,8
516341	12,5	12,1
	25	16,3
	50	18,6
	75	22,1
	100	19,1
141923	75	8,9

Ejemplo 134: Efecto de los oligonucleótidos antisentido ISIS que se dirigen a CFB humano en monos cynomolgus

Los monos cynomolgus se trataron con oligonucleótidos antisentido ISIS seleccionados de los estudios descritos en los Ejemplos anteriores. Se evaluó la eficacia y tolerabilidad del oligonucleótido antisentido, así como su perfil farmacocinético en el hígado y riñón.

Al momento de realizar este estudio, la secuencia genómica del mono cynomolgus no se encontraba disponible en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), por lo tanto, no se pudo confirmar la reactividad cruzada con la secuencia génica del mono cynomolgus. Por el contrario, se compararon las secuencias de los oligonucleótidos antisentido ISIS utilizadas en los monos cynomolgus con una secuencia de mono rhesus para determinar la homología. Se prevé que los oligonucleótidos ISIS con homología con respecto a la secuencia de mono rhesus también tengan una reactividad cruzada completa con la secuencia de mono cynomolgus. Los oligonucleótidos antisentido humanos evaluados presentan reactividad cruzada con la secuencia genómica de rhesus (n.°

de acceso GENBANK NW_001116486.1 truncada a partir de los nucleótidos 536000 a 545000, denominada en la presente SEQ ID NO: 3). Cuanto mayor sea la complementariedad entre el oligonucleótido humano y la secuencia de mono rhesus, será más probable que el oligonucleótido humano tenga reactividad cruzada con la secuencia de mono rhesus. Los sitios de inicio y detención de cada oligonucleótido dirigido a la SEQ ID NO: 3 se presentan en la Tabla que figura a continuación. "Sitio de inicio" indica el nucleótido más cercano a 5’ al cual el gapmer se dirige en la secuencia génica de mono rhesus. ‘Malapareamientos’ indica la cantidad de nucleobases del oligonucleótido humano que están malapareadas con la secuencia genómica de rhesus.

Tabla 219

Oligonucleótidos antisentido complementarios a la secuencia genómica de CFB de rhesus (SEQ ID NO: 3)

N.° ISIS	Sitio de inicio objetivo	Malapareamientos	Química	SEQ ID NO
532770	6788	0	5-10-5 MOE	198
532800	7500	0	5-10-5 MOE	228
532809	7614	0	5-10-5 MOE	237
588540	7627	1	5-10-5 MOE	440

588544	7631	1	5-10-5 MOE	444
588548	7635	1	5-10-5 MOE	448
588550	7637	1	5-10-5 MOE	450
588553	7640	1	5-10-5 MOE	453
588555	7643	0	5-10-5 MOE	455
588848	7639	1	Desoxi, MOE y cEt	598
594430	6790	0	3-10-3 cEt	549

Tratamiento

Antes del estudio, los monos se mantuvieron en cuarentena durante un período de al menos 30 días, durante el cual los animales se observaron a diario para determinar su salud general. Los monos tenían entre 2-4 años y pesaban entre 2 y 4 kg. Once grupos de 4-6 monos cynomolgus asignados de forma aleatoria se inyectaron por vía subcutánea con el oligonucleótido ISIS o PBS en cuatro sitios de la espalda en una rotación en sentido horario (es decir, izquierda, arriba, derecha y abajo), un sitio por dosis. A los monos se les proporcionó cuatro dosis de carga de PBS o 40 mg/kg ISIS 532800, ISIS 532809, ISIS 588540, ISIS 588544, ISIS 588548,

ISIS 588550, ISIS 588553, ISIS 588555, ISIS 588848 o ISIS 594430 durante la primera semana (días 1, 3, 5 y 7) y posteriormente se les administró una dosis una vez por semana durante 12 semanas (días 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 y 84) con PBS o 40 mg/kg del oligonucleótido ISIS. Se evaluó ISIS 532770 en un estudio separado con condiciones similares con dos monos cynomolgus macho y dos monos cynomolgus hembra en el grupo.

Reducción hepática objetivo

Análisis de ARN

El día 86, se recolectaron muestras de hígado y riñón en duplicado (aproximadamente 250 mg cada uno) para el análisis del ARNm de CFB. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido en necropsia dentro de aproximadamente 10 minutos después del sacrificio.

Se extrajo ARN del hígado y riñón para un análisis PCR en tiempo real de medición de la expresión ARNm de CFB. Los resultados se presentan como el cambio porcentual de ARNm, con relación al control con PBS, normalizado con RIBOGREEN®. Los niveles de ARN también se normalizaron con el gen

constitutivo, Ciclofilina A. Los niveles de ARN se midieron con los conjuntos de cebador y sonda RTS3459, descritos anteriormente, o RTS4445_MGB (secuencia directa CGAAGAAGCTCAGTGAAATCAA, denominada en la presente SEQ ID NO: 819; secuencia inversa TGCCTGGAGGGCCCTCTT, denominada en la presente SEQ ID NO: 820; secuencia de sonda AGACCACAAGTTGAAGTC, denominada en la presente SEQ ID NO: 815).

Como se muestra en las Tablas a continuación, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido ISIS provocó una reducción del ARNm de CFB en comparación con el control con PBS. Los análisis de los niveles del ARNm de CFB revelaron que varios de los oligonucleótidos ISIS redujeron los niveles de CFB en el hígado y/o riñón. En la presente '0' indica que los niveles de expresión no fueron inhibidos. '*' indica que el oligonucleótido se analizó en un estudio separado con condiciones similares.

Tabla 220

Porcentaje de inhibición de ARNm de CFB en el hígado de mono cynomolgus en relación con el control con PBS

N.º ISIS	RTS3459/ Ciclofilina A	RTS3459/ RIBOGREEN	RTS445_MGB/ Ciclofilina A	RTS445_MGB/ RIBOGREEN
532770*	12	37	24	45
532800	54	45	56	46
588540	31	27	28	24
588548	68	67	68	67
588550	53	39	51	37
588553	74	59	74	59
588555	73	71	71	69
588848	9	0	6	0
594430	24	26	23	25

Tabla 221

Porcentaje de inhibición de ARNm de CFB en el riñón de mono cynomolgus en relación con el control con PBS

N.º ISIS	RTS3459/ Ciclofilina A	RTS3459/ RIBOGREEN	RTS445_MGB/ Ciclofilina A	RTS445_MGB /RIBOGREEN
532770*	34	56	2	31
532800	36	30	43	37

588540	70	71	67	69
588548	83	84	82	83
588550	81	77	78	74
588553	86	84	86	85
588555	32	34	48	50
588848	89	91	87	90
594430	33	37	19	23

Análisis proteico

Se recolectó aproximadamente 1 mL de sangre de todos los animales disponibles en el día 85 y se colocó en tubos que contenían sal de potasio de EDTA. Las muestras de sangre se colocaron en hielo común o Kryorack inmediatamente y se centrifugaron (3000 rpm durante 10 min a 4 °C) para obtener plasma (aproximadamente 0,4 mL) dentro de 60 minutos después de la recolección. Los niveles en plasma de CFB se midieron en el plasma mediante inmunodifusión radial (RID, por sus siglas en inglés), usando un anticuerpo policlonal anti-Factor B. Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación. ISIS 532770 se analizó en un estudio separado y los niveles de proteína en plasma se midieron el día 91 o 92 en ese grupo.

El análisis de CFB en plasma reveló que varios oligonucleótidos ISIS redujeron los niveles de proteína de manera sostenida. ISIS 532770, que se analizó en un estudio separado, redujo los niveles de proteína de CFB el día 91/92 en 50 % en comparación con los valores de referencia. La reducción de los niveles de proteína de CFB en plasma se correlaciona con la reducción del nivel de ARNm de CFB en el hígado en los grupos de animales correspondientes.

Tabla 222

Niveles de proteínas en plasma (% de valores de referencia) en el mono cynomolgus

	Día 1	Día 30	Día 58	Día 72	Día 86
PBS	113	115	95	83	86
ISIS 532800	117	68	52	39	34
ISIS 532809	104	121	100	80	71
ISIS 588540	108	72	61	40	38
ISIS 588544	118	74	53	33	29
ISIS 588548	110	41	28	20	16
ISIS 588550	104	64	54	38	37
ISIS 588553	97	42	35	18	16
ISIS 588555	107	35	37	18	18
ISIS 588848	116	95	92	69	71
ISIS 594430	104	64	59	45	46

Estudios de tolerabilidad

Mediciones de peso corporal

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la salud general de los animales, se realizaron mediciones del peso de los órganos y el peso corporal que se presentan en la Tabla que figura a continuación. '*' indica que el oligonucleótido se analizó en un estudio separado con condiciones similares y es el promedio de las mediciones de monos macho y hembra. Los resultados indican que el efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en el peso corporal y de los órganos estaba dentro del rango esperado para los oligonucleótidos antisentido.

Tabla 223

Peso corporal final (g) en el mono cynomolgus

	Día 1	Día 14	Día 28	Día 42	Día 56	Día 70	Día 84
PBS	2887	2953	3028	3094	3125	3143	3193
ISIS 532770*	2963	2947	2966	3050	3097	3138	3160
ISIS 532800	2886	2976	3072	3149	3220	3269	3265
ISIS 532809	2755	2836	2927	2983	3019	3071	3098

ISIS 588540	2779	2834	2907	2934	2981	3034	3057
ISIS 588544	2837	2896	3009	3064	3132	3163	3199
ISIS 588548	2694	2816	2882	2990	3073	3149	3161
ISIS 588550	2855	2988	3062	3188	3219	3282	3323
ISIS 588553	3033	3156	3256	3335	3379	3372	3442
ISIS 588555	2757	2863	2965	3022	3075	3088	3158
ISIS 588848	2850	3018	3032	3187	3230	3212	3291
ISIS 594430	2884	2963	2953	3149	3187	3204	3256

Tabla 224

Peso de los órganos final (g) en el mono cynomolgus

	Bazo	Corazón	Riñón	Hígado
PBS	2,8	11,6	11,9	55,8
ISIS 532770*	5,0	11,3	20,6	77,9
ISIS 532800	6,2	11,9	18,6	94,4
ISIS 588540	4,0	11,4	13,5	67,1
ISIS 588548	4,1	11,7	17,3	72,0
ISIS 588550	5,8	10,9	18,5	81,8
ISIS 588553	5,0	12,7	17,2	85,9
ISIS 588555	4,7	11,8	15,9	88,3
ISIS 588848	5,0	12,7	14,4	75,7
ISIS 594430	3,9	11,9	14,8	69,9

Función hepática

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función hepática, se recogieron muestras de sangre de todos los grupos de estudio. Las muestras de sangre se recolectaron de las venas cefálicas, safenas o femorales, 48 horas después de la dosificación. Los monos ayunaron durante la noche antes de la extracción de sangre. Se recogió sangre (1,5 mL) en tubos sin anticoagulante para la separación del suero. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante un mínimo de 90 minutos y luego se centrifugaron (aproximadamente a 3.000 rpm durante 10 min) para obtener el suero. Los niveles de diversos marcadores de función hepática se midieron usando un analizador químico Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Japón).

Los niveles en plasma de ALT y AST se midieron y los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación, expresados en IU/L. La bilirrubina, un marcador de la función hepática, se midió de manera similar y se presenta en la Tabla que figura a continuación, expresada en mg/dL. '*' indica que el oligonucleótido se analizó en un estudio separado con condiciones similares y es el promedio de las mediciones de monos macho y hembra. El resultado indica que la mayoría de los oligonucleótidos antisentido no

tuvieron efecto en la función hepática fuera del rango esperado para los oligonucleótidos antisentido.

Tabla 225

Niveles de marcadores de química en el hígado en plasma de mono cynomolgus el día 86

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Bilirrubina (mg/dL)
PBS	71	57	0,3
ISIS 532770*	59	58	0,1
ISIS 532800	65	86	0,1
ISIS 532809	35	58	0,1
ISIS 588540	70	88	0,2
ISIS 588544	55	97	0,2
ISIS 588548	61	85	0,2
ISIS 588550	94	84	0,2
ISIS 588553	44	65	0,2
ISIS 588555	63	84	0,2
ISIS 588848	69	65	0,2
ISIS 594430	86	53	0,2

Función renal

Para evaluar el efecto de oligonucleótidos ISIS en la función renal, se recogieron muestras de sangre de todos los grupos de estudio. Las muestras de sangre se recolectaron de las venas cefálicas, safenas o femorales, 48 horas después de la dosificación. Los monos ayunaron durante la noche antes de la extracción de sangre. Se recogió sangre en tubos sin anticoagulante para la separación del suero. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante un mínimo de 90 minutos y luego se centrifugaron (aproximadamente a 3.000 rpm durante 10 min) para obtener el suero. Los niveles de BUN y creatinina se midieron usando un analizador químico Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Japón). Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación, expresados en mg/dL. '*' indica que el oligonucleótido se analizó en un estudio separado con condiciones similares y es el promedio de las mediciones de monos macho y hembra.

Para el análisis de orina, en la mañana se recogió orina fresca de todos los animales usando una bandeja de jaula limpia en hielo común. Se retiró el alimento durante la noche del día anterior a la recolección de la orina pero sí se suministró agua. Las muestras de orina (aproximadamente 1 mL)

se analizaron para determinar la relación de proteína con respecto a creatinina (P/C) usando un analizador químico automático Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Japón). 'n.d.' indica que el nivel de proteína en orina estaba por debajo del límite de detección del analizador.

Los datos de la química de plasma y orina indican que la mayoría de los oligonucleótidos ISIS no tuvo efecto en la función renal fuera del rango esperado para oligonucleótidos antisentido.

Tabla 226

Niveles de marcadores de química renal (mg/dL) en plasma de mono cynomolgus el día 86

	BUN	Creatinina	Proteína total
PBS	28	0,9	8,0
ISIS 532770*	20	0,9	6,9
ISIS 532800	25	0,9	7,5
ISIS 532809	23	0,8	7,4
ISIS 588540	30	0,8	7,5
ISIS 588544	26	0,9	7,4
ISIS 588548	25	0,9	7,6
ISIS 588550	24	0,9	7,2

ISIS 588553	25	0,8	7,2
ISIS 588555	25	0,8	7,6
ISIS 588848	24	0,9	7,5
ISIS 594430	25	0,8	7,2

Tabla 227

Niveles de marcadores de química renal en orina de mono cynomolgus el día 44 y día 86

	Día 44	Día 86
PBS	0,03	n.d.
ISIS 532800	0,01	n.d.
ISIS 532809	0,01	n.d.
ISIS 588540	0,03	n.d.
ISIS 588544	0,01	0,09
ISIS 588548	0,01	0,01
ISIS 588550	0,04	0,01
ISIS 588553	0,05	n.d.
ISIS 588555	0,03	0,03
ISIS 588848	0.09	n.d.
ISIS 594430	0,03	n.d.

Hematología

Para evaluar cualquier efecto de los oligonucleótidos ISIS en monos cynomolgus en parámetros hematológicos, se tomaron muestras de sangre de aproximadamente 0,5 mL de cada uno de los animales de estudio disponibles en tubos que contenían K_2-EDTA. Las muestras se analizaron para verificar el conteo de glóbulos rojos (RBC), conteo de glóbulos blancos (WBC), conteos de glóbulos blancos individuales, tal como monocitos, neutrófilos, linfocitos, así como conteo de plaquetas, contenido de hemoglobina y hematocritos, usando un analizador hematológico ADVIA120 (Bayer, EUA). Los datos se presentan en las Tablas que figuran a continuación. '*' indica que el oligonucleótido se analizó en un estudio separado con condiciones similares y es el promedio de las mediciones de monos macho y hembra.

Los datos indican que los oligonucleótidos no provocaron cambios en los parámetros hematológicos fuera del intervalo esperado para oligonucleótidos antisentido con esta dosis.

Tabla 228

Conteos de glóbulos en monos cynomolgus

	RBC (x 10^6/µL)	Plaquetas (x 10^3/µL)	WBC (x 10^3/µL)	Neotrófilos (% WBC)	Linfocitos (% total)	Monocitos (% total)
PBS	5,8	347	9,4	42,7	53,1	3,0
ISIS 532770 *	5,4	386	10,8	22,3	71,7	3,3
ISIS 532800	5,6	360	13,1	29,5	61,1	6,5
ISIS 532809	5,2	400	11,5	56,6	38,2	2,5
ISIS 588540	5,5	367	11,7	50,9	42,7	2,1
ISIS 588544	5,2	373	14,3	56,6	37,6	4,3
ISIS 588548	5,1	373	9,7	40,4	54,3	3,9
ISIS 588550	6,1	343	9,9	32,1	61,7	4,6
ISIS 588553	5,2	424	9,3	41,7	53,2	3,6

ISIS 588555	5,1	411	9,6	45,1	49,7	3,5
ISIS 588848	5,7	370	10,0	39,8	55,8	3,1
ISIS 594430	5,7	477	10,6	47,3	47,8	3,6

Tabla 229

Parámetros hematológicos en monos cynomolgus

	Hemoglobina(g/dL)	HCT (%)
PBS	14,1	46,6
ISIS 532770*	12,4	40,9
ISIS 532800	12,3	40,5
ISIS 532809	12,2	40,4
ISIS 588540	12,5	41,5
ISIS 588544	11,9	38,1
ISIS 588548	12,3	39,6
ISIS 588550	13,4	45,0
ISIS 588553	12,6	39,8
ISIS 588555	11,6	38,1
ISIS 588848	13,2	42,7
ISIS 594430	13,4	43,1

Medición de la concentración de oligonucleótidos

La concentración del oligonucleótido de longitud completa se midió en los tejidos del hígado y riñón. El método usado es una modificación de métodos publicados previamente (Leeds et ál., 1996; Geary et ál., 1999) que consiste en una extracción de fenol-cloroformo (líquido-líquido) seguida de una extracción de fase sólida. Las concentraciones de muestra de tejido se calcularon usando curvas de calibración, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de aproximadamente 1,14 µg/g. Los resultados se presentan en la Tabla que figura a continuación, expresados como µg/g de tejido hepático o renal.

Tabla 230

Distribución de oligonucleótido antisentido

	Riñón (µg/g)	Hígado (µg/g)	Relación riñón/hígado
ISIS 532800	3881	1633	2,4
ISIS 588540	3074	1410	2,2
ISIS 588548	3703	1233	3,0
ISIS 588550	4242	860	4,9
ISIS 588553	3096	736	4,2

ISIS 588555	4147	1860	2,2
ISIS 588848	2235	738	3,0
ISIS 594430	1548	752	2,1

Ejemplo 135: Estudio de eficacia de 6 semanas de oligonucleótidos antisentido no conjugados y conjugados con 5'-THA-GalNAc3 dirigidos al CFB humano en ratones transgénicos

Dos oligonucleótidos antisentido que tienen la misma secuencia de nucleobases: oligonucleótido antisentido no conjugado ISIS 588540 y oligonucleótido antisentido conjugado con 5'-THA-GalNAc3 ISIS 696844, fueron analizados en ratones transgénicos con CFB humano (ratones hCFB-Tg).

A los ratones se les administró de forma subcutánea ISIS 696844 con dosis de 0,1, 1,25, 0,5, 2,0, 6,0 o 12,0 mg/kg/semana o ISIS 588540 con dosis de 2, 6, 12, 25, o 50 mg/kg/semana durante 6 semanas. A un grupo de ratones de control se le administró PBS de forma subcutánea durante 6 semanas. Los ratones fueron sacrificados 48 horas después de la dosis final. Los niveles de ARNm hepático fueron analizados mediante qRT-PCR.

Estudio 1

Los resultados se presentan en la Tabla a continuación y demuestran que el oligonucleótido antisentido conjugado con 5’-THA-GalNAc3 que se dirige a CFB es más potente que el oligonucleótido antisentido no conjugado con la misma secuencia.

Tabla 231

Eficacia de oligonucleótidos antisentido que se dirigen a CFB

	ED_{50} (mg/kg)	ED_{75} (mg/kg)
ISIS 588540	4,52	9,26
ISIS 696844	0,52	1,12

Estudio 2

Se midieron los niveles de ARNm en el hígado con dos conjuntos de cebador y sonda diferentes que se dirigen a diferentes regiones del ARNm y normalizados a RIBOGREEN® (RGB) o Ciclofilina. Los conjuntos de cebador y sonda eran RTS3459, descrito anteriormente, y RTS3460 (secuencia directa CGAAGCAGCTCAATGAAATCAA, denominada en la presente SEQ ID NO: 813; secuencia inversa TGCCTGGAGGGCCTTCTT, denominada en la

presente SEQ ID NO: 814; secuencia de sonda AGACCACAAGTTGAAGTC, denominada en la presente SEQ ID NO: 815). Los resultados se presentan en la Tabla a continuación y demuestran que el oligonucleótido antisentido conjugado con 5'-THA-GalNAc3 que se dirige a CFB es más potente que el oligonucleótido antisentido no conjugado con la misma secuencia, independientemente del primer conjugad de cebador y sonda utilizado.

Tabla 231

Eficacia de oligonucleótidos antisentido que se dirigen a CFB

	ED_{50} RTS3459 (RGB)	ED_{50} RTS3460 (RGB)	ED_{50} RTS3459 (Ciclo-filina)	ED_{50} RTS3460 (Ciclo-filina)	ED_{75} RTS3459 (RGB)	ED_{75} RTS3460 (RGB)	ED_{75} RTS3459 (Ciclo-filina)	ED_{75} RTS3460 (Ciclo-filina)
ISIS 588540	4,5	4,1	5,2	5,4	9,3	10,0	10,0	9,3
ISIS 696844	0,5	0,5	0,6	0,5	1,1	1,3	1,2	0,9

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 8 a 80 nucleósidos enlazados complementarios dentro de nucleobases 30-49, 48-63, 150-169, 151-170, 152-171, 154-169, 154-173, 156-171, 156-175, 157-176, 158-173, 158-177, 480-499, 600-619, 638-657, 644-663, 738-757, 1089-1108, 1135-1154, 1141-1160, 1147-1166, 1150-1169, 1153-1172, 1159-1178, 1162-1181, 1165-1184, 1171-1186, 1171-1190, 1173-1188, 1173-1192, 1175-1190, 1175-1194, 1177-1196, 1183-1202, 1208-1227, 1235-1254, 1298-1317, 1304-1323, 1310-1329, 1316-1335, 1319-1338, 1322-1341, 1328-1347, 1349-1368, 1355-1374, 1393-1412, 1396-1415, 1399-1418, 1405-1424, 1421-1440, 1621-1640, 1646-1665, 1646-1665, 1647-1666, 1689-1708, 1749-1768, 1763-1782, 1912-1931, 2073-2092, 2085-2104, 2166-2185, 2172-2191, 2189-2208, 2191-2210, 2193-2212, 2195-2210, 2195-2214, 2196-2215, 2197-2212, 2197-2216, 2202-2221, 2223-2238, 2223-2242, 2225-2240, 2226-2245, 2227-2242, 2227-2246, 2238-2257, 2241-2260, 2267-2286, 2361-2380, 2388-2407, 2397-2416, 2448-2467, 2453-2472, 2455-2474, 2457-2472, 2457-2476, 2459-2474, 2459-2478, 2461-2476, 2461-2480, 2532-2551, 2550-2569, 2551-2566, 2551-2570, 2552-2568, 2552-2570, 2552-2571, 2553-2568, 2553-2570, 2553-2571, 2553-2572, 2554-2571, 2554-2572, 2554-

2573, 2555-2570, 2555-2572, 2555-2574, 2556-2573, 2556-2574, 2556-2575, 2557-2573, 2557-2574, 2557-2575, 2557-2576, 2558-2575, 2558-2576, 2558-2577, 2559-2576, 2559-2577, 2559-2578, 2560-2577, 2560-2578, 2560-2579, 2561-2576, 2561-2578, 2561-2579, 2561-2580, 2562-2577, 2562-2579, 2562-2581, 2563-2578, 2563-2580, 2563-2582, 2564-2581, 2564-2583, 2565-2584, 2566-2583, 2566-2585, 2567-2582, 2567-2584, 2567-2586, 2568-2583, 2568-2585, 2568-2587, 2569-2586, 2569-2588, 2570-2585, 2570-2587, 2570-2589, 2571-2586, 2571-2588, 2571-2590, 2572-2589, 2572-2590, 2572-2591, 2573-2590, 2573-2592, 2574-2590, 2574-2591, 2574-2593, 2575-2590, 2575-2591, 2575-2592, 2575-2594, 2576-2593, 2576-2595, 2577-2594, 2577-2595, 2577-2596, 2578-2594, 2578-2596, 2578-2597, 2579-2598, 2580-2596, 2580-2597, 2580-2598, 2580-2599, 2581-2597, 2581-2598, 2581-2599, 2581-2600, 2582-2598, 2582-2599, 2582-2600, 2582-2601, 2583-2599, 2583-2600, 2583-2601, 2583-2602, 2584-2600, 2584-2601, 2584-2602, 2584-2603, 2585-2601, 2585-2603, 2585-2604, 2586-2601, 2586-2602, 2586-2604, 2586-2605, 2587-2602, 2587-2603, 2587-2605, 2587-2606, 2588-2603, 2588-2604, 2588-2605, 2588-2606, 2588-2607, 2589-2604, 2589-2605, 2589-2606, 2589-2607, 2589-2608, 2590-2605, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2608, 2590-2609, 2590-2609, 2591-2607, 2591-2608, 2591-2609, 2591-2610, 2592-2607, 2592-2608, 2592-2609, 2592-2610, 2592-2611, 2593-2608, 2593-2609, 2593-2610, 2593-2612, 2594-2609, 2594-2610, 2594-

2611, 2594-2612, 2594-2613, 2595-2610, 2595-2611, 2595-2612, 2595-2613, 2595-2614, 2596-2611, 2596-2612, 2596-2613, 2596-2614, 2596-2615, 2597-2612, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-2616, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2599-2614, 2599-2615, 2599-2616, 2599-2617, 2599-2618, 2600-2615, 2600-2616, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2601-2616, 2601-2617, 2601-2618, 2601-2619, 2601-2620, 2602-2617, 2602-2618, 2602-2619, 2602-2620, 2602-2621, 2603-2618, 2603-2619, 2603-2620, 2603-2621, 2603-2622, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2608-2623, 2608-2624, 2608-2625, 2608-2626, 2608-2627, 2609-2624, 2609-2625, 2609-2626, 2609-2627, 2609-2628, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2627, 2610-2628, 2610-2629, 2611-2626, 2611-2627, 2611-2628, 2611-2629, 2611-2630, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2629, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2630, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630, 2615-2631, o 2616-2631 de la SEQ ID NO: 1, y donde dicho oligonucleótido modificado es al menos 85 %, 90 %, 95 % o 100 % complementario a la SEQ ID NO: 1.

2. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado

y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 8 a 80 nucleósidos enlazados que tienen una secuencia de nucleobases que comprende una parte de al menos 8 nucleobases contiguas 100 % complementarias a una parte de igual longitud de las nucleobases 30-49, 48-63, 150-169, 151-170, 152-171, 154-169, 154-173, 156-171, 156-175, 157-176, 158-173, 158-177, 480-499, 600-619, 638-657, 644-663, 738-757, 1089-1108, 1135-1154, 1141-1160, 1147-1166, 1150-1169, 1153-1172, 1159-1178, 1162-1181, 1165-1184, 1171-1186, 1171-1190, 1173-1188, 1173-1192, 1175-1190, 1175-1194, 1177-1196, 1183-1202, 1208-1227, 1235-1254, 1298-1317, 1304-1323, 1310-1329, 1316-1335, 1319-1338, 1322-1341, 1328-1347, 1349-1368, 1355-1374, 1393-1412, 1396-1415, 1399-1418, 1405-1424, 1421-1440, 1621-1640, 1646-1665, 1646-1665, 1647-1666, 1689-1708, 1749-1768, 1763-1782, 1912-1931, 2073-2092, 2085-2104, 2166-2185, 2172-2191, 2189-2208, 2191-2210, 2193-2212, 2195-2210, 2195-2214, 2196-2215, 2197-2212, 2197-2216, 2202-2221, 2223-2238, 2223-2242, 2225-2240, 2226-2245, 2227-2242, 2227-2246, 2238-2257, 2241-2260, 2267-2286, 2361-2380, 2388-2407, 2397-2416, 2448-2467, 2453-2472, 2455-2474, 2457-2472, 2457-2476, 2459-2474, 2459-2478, 2461-2476, 2461-2480, 2532-2551, 2550-2569, 2551-2566, 2551-2570, 2552-2568, 2552-2570, 2552-2571, 2553-2568, 2553-2570, 2553-2571, 2553-2572, 2554-2571, 2554-2572, 2554-2573, 2555-2570, 2555-2572, 2555-2574, 2556-2573,

2556-2574, 2556-2575, 2557-2573, 2557-2574, 2557-2575, 2557-2576, 2558-2575, 2558-2576, 2558-2577, 2559-2576, 2559-2577, 2559-2578, 2560-2577, 2560-2578, 2560-2579, 2561-2576, 2561-2578, 2561-2579, 2561-2580, 2562-2577, 2562-2579, 2562-2581, 2563-2578, 2563-2580, 2563-2582, 2564-2581, 2564-2583, 2565-2584, 2566-2583, 2566-2585, 2567-2582, 2567-2584, 2567-2586, 2568-2583, 2568-2585, 2568-2587, 2569-2586, 2569-2588, 2570-2585, 2570-2587, 2570-2589, 2571-2586, 2571-2588, 2571-2590, 2572-2589, 2572-2590, 2572-2591, 2573-2590, 2573-2592, 2574-2590, 2574-2591, 2574-2593, 2575-2590, 2575-2591, 2575-2592, 2575-2594, 2576-2593, 2576-2595, 2577-2594, 2577-2595, 2577-2596, 2578-2594, 2578-2596, 2578-2597, 2579-2598, 2580-2596, 2580-2597, 2580-2598, 2580-2599, 2581-2597, 2581-2598, 2581-2599, 2581-2600, 2582-2598, 2582-2599, 2582-2600, 2582-2601, 2583-2599, 2583-2600, 2583-2601, 2583-2602, 2584-2600, 2584-2601, 2584-2602, 2584-2603, 2585-2601, 2585-2603, 2585-2604, 2586-2601, 2586-2602, 2586-2604, 2586-2605, 2587-2602, 2587-2603, 2587-2605, 2587-2606, 2588-2603, 2588-2604, 2588-2605, 2588-2606, 2588-2607, 2589-2604, 2589-2605, 2589-2606, 2589-2607, 2589-2608, 2590-2605, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2608, 2590-2609, 2590-2609, 2591-2607, 2591-2608, 2591-2609, 2591-2610, 2592-2607, 2592-2608, 2592-2609, 2592-2610, 2592-2611, 2593-2608, 2593-2609, 2593-2610, 2593-2612, 2594-2609, 2594-2610, 2594-2611, 2594-2612, 2594-2613, 2595-2610, 2595-2611,

2595-2612, 2595-2613, 2595-2614, 2596-2611, 2596-2612, 2596-2613, 2596-2614, 2596-2615, 2597-2612, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-2616, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2599-2614, 2599-2615, 2599-2616, 2599-2617, 2599-2618, 2600-2615, 2600-2616, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2601-2616, 2601-2617, 2601-2618, 2601-2619, 2601-2620, 2602-2617, 2602-2618, 2602-2619, 2602-2620, 2602-2621, 2603-2618, 2603-2619, 2603-2620, 2603-2621, 2603-2622, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2608-2623, 2608-2624, 2608-2625, 2608-2626, 2608-2627, 2609-2624, 2609-2625, 2609-2626, 2609-2627, 2609-2628, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2627, 2610-2628, 2610-2629, 2611-2626, 2611-2627, 2611-2628, 2611-2629, 2611-2630, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2629, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2630, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630, 2615-2631, o 2616-2631 de la SEQ ID NO:1 y, donde la secuencia de nucleobases del oligonucleótido modificado es al menos 85 %, 90 %, 95 % o 100 % complementario a la SEQ ID NO: 1.

3. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado

consiste en 8 a 80 nucleósidos enlazados complementarios dentro de nucleobases 1608-1627, 1685-1704, 1686-1705, 1751-1770, 1769-1784, 1871-1890, 1872-1891, 1873-1892, 1875-1890, 1875-1894, 1877-1892, 1877-1896, 1878-1897, 1879-1894, 1879-1898, 2288-2307, 2808-2827, 2846-2865, 2852-2871, 2946-2965, 3773-3792, 3819-3838, 3825-3844, 3831-3850, 3834-3853, 3837-3856, 3843-3862, 4151-4166, 4151-4170, 4153-4172, 4159-4178, 4184-4203, 4211-4230, 4609-4628, 4612-4631, 4615-4634, 4621-4640, 4642-4661, 4648-4667, 4686-4705, 4689-4708, 4692-4711, 4698-4717, 4714-4733, 5270-5289, 5295-5314, 5296-5315, 5830-5849, 5890-5909, 5904-5923, 6406-6425, 6662-6681, 6674-6693, 6954-6973, 6960-6979, 6977-6996, 6979-6998, 6981-7000, 6983-6998, 6983-7002, 6984-7003, 6985-7000, 6985-7004, 6990-7009, 7122-7141, 7125-7144, 7151-7170, 7353-7372, 7362-7381, 7683-7702, 7688-7707, 7690-7709, 7692-7707, 7692-7711, 7694-7709, 7694-7713, 7696-7711, 7696-7715, 7767-7786, 7785-7804, 7786-7801, 7787-7803, 7787-7805, 7787-7806, 7788-7803, 7788-7805, 7788-7806, 7788-7807, 7789-7806, 7789-7807, 7789-7808, 7790-7805, 7790-7807, 7790-7809, 7791-7808, 7791-7809, 7791-7810, 7792-7808, 7792-7809, 7792-7810, 7792-7811, 7793-7810, 7793-7811, 7793-7812, 7794-7811, 7794-7812, 7794-7813, 7795-7812, 7795-7813, 7795-7814, 7796-7811, 7796-7813, 7796-7814, 7796-7815, 7797-7812, 7797-7814, 7797-7816, 7798-7813, 7798-7815, 7798-7817, 7799-7816, 7799-7818, 7800-7819, 7801-7818, 7801-

7820, 7802-7817, 7802-7819, 7802-7821, 7803-7818, 7803-7820, 7803-7822, 7804-7821, 7804-7823, 7805-7820, 7805-7822, 7805-7824, 7806-7821, 7806-7823, 7806-7825, 7807-7824, 7807-7825, 7807-7826, 7808-7825, 7808-7827, 7809-7825, 7809-7826, 7809-7828, 7810-7825, 7810-7826, 7810-7827, 7810-7829, 7811-7828, 7811-7830, 7812-7829, 7812-7830, 7812-7831, 7813-7829, 7813-7831, 7813-7832, 7814-7833, 7815-7831, 7815-7832, 7815-7833, 7815-7834, 7816-7832, 7816-7833, 7816-7834, 7816-7835, 7817-7833, 7817-7834, 7817-7835, 7817-7836, 7818-7834, 7818-7835, 7818-7836, 7818-7837, 7819-7835, 7819-7836, 7819-7837, 7819-7838, 7820-7836, 7820-7838, 7820-7839, 7821-7836, 7821-7837, 7821-7839, 7821-7840, 7822-7837, 7822-7838, 7822-7840, 7822-7841, 7823-7838, 7823-7839, 7823-7839, 7823-7840, 7823-7841, 7823-7842, 7824-7839, 7824-7840, 7824-7840, 7824-7841, 7824-7842, 7824-7843, 7825-7840, 7825-7841, 7825-7842, 7825-7843, 7825-7844, 7826-7842, 7826-7843, 7826-7844, 7826-7845, 7827-7842, 7827-7843, 7827-7844, 7827-7845, 7827-7846, 7828-7843, 7828-7844, 7828-7845, 7828-7847, 7829-7844, 7829-7845, 7829-7846, 7829-7847, 7829-7848, 7830-7845, 7830-7846, 7830-7847, 7830-7848, 7830-7849, 7831-7846, 7831-7847, 7831-7848, 7831-7849, 7831-7850, 7832-7847, 7832-7848, 7832-7849, 7832-7850, 7832-7851, 7833-7848, 7833-7849, 7833-7850, 7833-7851, 7833-7852, 7834-7849, 7834-7850, 7834-7851, 7834-7852, 7834-7853, 7835-7850, 7835-7851, 7835-7852, 7835-7853, 7835-7854, 7836-

7851, 7836-7852, 7836-7853, 7836-7854, 7836-7855, 7837-7852, 7837-7853, 7837-7854, 7837-7855, 7837-7856, 7838-7853, 7838-7854, 7838-7855, 7838-7856, 7838-7857, 7839-7854, 7839-7855, 7839-7856, 7839-7857, 7839-7858, 7840-7855, 7840-7856, 7840-7857, 7840-7858, 7840-7859, 7841-7856, 7841-7857, 7841-7858, 7841-7859, 7841-7860, 7842-7857, 7842-7858, 7842-7859, 7842-7860, 7842-7861, 7843-7858, 7843-7859, 7843-7860, 7843-7861, 7843-7862, 7844-7859, 7844-7860, 7844-7861, 7844-7862, 7845-7860, 7845-7861, 7845-7862, 7846-7861, o 7846-7862 de la SEQ ID NO: 2, y donde dicho oligonucleótido modificado es al menos 85 %, 90 %, 95 % o 100 % complementario a la SEQ ID NO: 2.

4. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 8 a 80 nucleósidos enlazados que tienen una secuencia de nucleobases que comprende una parte de al menos 8 nucleobases contiguas 100 % complementarias a una parte de igual longitud de las nucleobases 1608-1627, 1685-1704, 1686-1705, 1751-1770, 1769-1784, 1871-1890, 1872-1891, 1873-1892, 1875-1890, 1875-1894, 1877-1892, 1877-1896, 1878-1897, 1879-1894, 1879-1898, 2288-2307, 2808-2827, 2846-2865, 2852-2871, 2946-2965, 3773-3792, 3819-3838, 3825-3844, 3831-3850, 3834-3853, 3837-3856, 3843-3862, 4151-4166, 4151-4170, 4153-4172,

4159-4178, 4184-4203, 4211-4230, 4609-4628, 4612-4631, 4615-4634, 4621-4640, 4642-4661, 4648-4667, 4686-4705, 4689-4708, 4692-4711, 4698-4717, 4714-4733, 5270-5289, 5295-5314, 5296-5315, 5830-5849, 5890-5909, 5904-5923, 6406-6425, 6662-6681, 6674-6693, 6954-6973, 6960-6979, 6977-6996, 6979-6998, 6981-7000, 6983-6998, 6983-7002, 6984-7003, 6985-7000, 6985-7004, 6990-7009, 7122-7141, 7125-7144, 7151-7170, 7353-7372, 7362-7381, 7683-7702, 7688-7707, 7690-7709, 7692-7707, 7692-7711, 7694-7709, 7694-7713, 7696-7711, 7696-7715, 7767-7786, 7785-7804, 7786-7801, 7787-7803, 7787-7805, 7787-7806, 7788-7803, 7788-7805, 7788-7806, 7788-7807, 7789-7806, 7789-7807, 7789-7808, 7790-7805, 7790-7807, 7790-7809, 7791-7808, 7791-7809, 7791-7810, 7792-7808, 7792-7809, 7792-7810, 7792-7811, 7793-7810, 7793-7811, 7793-7812, 7794-7811, 7794-7812, 7794-7813, 7795-7812, 7795-7813, 7795-7814, 7796-7811, 7796-7813, 7796-7814, 7796-7815, 7797-7812, 7797-7814, 7797-7816, 7798-7813, 7798-7815, 7798-7817, 7799-7816, 7799-7818, 7800-7819, 7801-7818, 7801-7820, 7802-7817, 7802-7819, 7802-7821, 7803-7818, 7803-7820, 7803-7822, 7804-7821, 7804-7823, 7805-7820, 7805-7822, 7805-7824, 7806-7821, 7806-7823, 7806-7825, 7807-7824, 7807-7825, 7807-7826, 7808-7825, 7808-7827, 7809-7825, 7809-7826, 7809-7828, 7810-7825, 7810-7826, 7810-7827, 7810-7829, 7811-7828, 7811-7830, 7812-7829, 7812-7830, 7812-7831, 7813-7829, 7813-7831, 7813-7832, 7814-7833, 7815-7831, 7815-7832,

7815-7833, 7815-7834, 7816-7832, 7816-7833, 7816-7834, 7816-7835, 7817-7833, 7817-7834, 7817-7835, 7817-7836, 7818-7834, 7818-7835, 7818-7836, 7818-7837, 7819-7835, 7819-7836, 7819-7837, 7819-7838, 7820-7836, 7820-7838, 7820-7839, 7821-7836, 7821-7837, 7821-7839, 7821-7840, 7822-7837, 7822-7838, 7822-7840, 7822-7841, 7823-7838, 7823-7839, 7823-7839, 7823-7840, 7823-7841, 7823-7842, 7824-7839, 7824-7840, 7824-7840, 7824-7841, 7824-7842, 7824-7843, 7825-7840, 7825-7841, 7825-7842, 7825-7843, 7825-7844, 7826-7842, 7826-7843, 7826-7844, 7826-7845, 7827-7842, 7827-7843, 7827-7844, 7827-7845, 7827-7846, 7828-7843, 7828-7844, 7828-7845, 7828-7847, 7829-7844, 7829-7845, 7829-7846, 7829-7847, 7829-7848, 7830-7845, 7830-7846, 7830-7847, 7830-7848, 7830-7849, 7831-7846, 7831-7847, 7831-7848, 7831-7849, 7831-7850, 7832-7847, 7832-7848, 7832-7849, 7832-7850, 7832-7851, 7833-7848, 7833-7849, 7833-7850, 7833-7851, 7833-7852, 7834-7849, 7834-7850, 7834-7851, 7834-7852, 7834-7853, 7835-7850, 7835-7851, 7835-7852, 7835-7853, 7835-7854, 7836-7851, 7836-7852, 7836-7853, 7836-7854, 7836-7855, 7837-7852, 7837-7853, 7837-7854, 7837-7855, 7837-7856, 7838-7853, 7838-7854, 7838-7855, 7838-7856, 7838-7857, 7839-7854, 7839-7855, 7839-7856, 7839-7857, 7839-7858, 7840-7855, 7840-7856, 7840-7857, 7840-7858, 7840-7859, 7841-7856, 7841-7857, 7841-7858, 7841-7859, 7841-7860, 7842-7857, 7842-7858, 7842-7859, 7842-7860, 7842-7861, 7843-7858, 7843-7859, 7843-7860,

7843-7861, 7843-7862, 7844-7859, 7844-7860, 7844-7861, 7844-7862, 7845-7860, 7845-7861, 7845-7862, 7846-7861y 7846-7862 de la SEQ ID NO: 2 y donde la secuencia de nucleobases del oligonucleótido modificado es al menos 85 %, 90 %, 95 % o 100 % complementario a la SEQ ID NO: 2.

5. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado está dirigido a la 3'UTR de un ácido nucleico de CFB.

6. El compuesto de la reivindicación 5, donde los oligonucleótidos modificados se dirige dentro de los nucleótidos 2574-2626 de un ácido nucleico de CFB que tiene la secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 1.

7. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 8 a 80 nucleósidos enlazados que tienen una secuencia de nucleobases que comprende una parte de al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una parte de igual longitud de 2457-2631, 2457-2472, 2457-2474, 2457-2476, 2457-2566, 2457-2570, 2457-2571, 2457-2572, 2457-2573, 2457-2574, 2457-2575, 2457-2576, 2457-2577, 2457-2578, 2457-2579, 2457-2580, 2457-2581, 2457-2582, 2457-2583, 2457-2584, 2457-2585,

2457-2586, 2457-2587, 2457-2588, 2457-2589, 2457-2590, 2457-2591, 2457-2592, 2457-2593, 2457-2594, 2457-2595, 2457-2596, 2457-2597, 2457-2598, 2457-2599, 2457-2600, 2457-2601, 2457-2602, 2457-2603, 2457-2604, 2457-2605, 2457-2606, 2457-2607, 2457-2608, 2457-2609, 2457-2610, 2457-2611, 2457-2612, 2457-2613, 2457-2614, 2457-2615, 2457-2616, 2457-2617, 2457-2618, 2457-2619, 2457-2620, 2457-2621, 2457-2622, 2457-2623, 2457-2624, 2457-2625, 2457-2626, 2457-2627, 2457-2628, 2457-2629, 2457-2630, 2457-2631, 2459-2474, 2459-2476, 2459-2566, 2459-2570, 2459-2571, 2459-2572, 2459-2573, 2459-2574, 2459-2575, 2459-2576, 2459-2577, 2459-2578, 2459-2579, 2459-2580, 2459-2581, 2459-2582, 2459-2583, 2459-2584, 2459-2585, 2459-2586, 2459-2587, 2459-2588, 2459-2589, 2459-2590, 2459-2591, 2459-2592, 2459-2593, 2459-2594, 2459-2595, 2459-2596, 2459-2597, 2459-2598, 2459-2599, 2459-2600, 2459-2601, 2459-2602, 2459-2603, 2459-2604, 2459-2605, 2459-2606, 2459-2607, 2459-2608, 2459-2609, 2459-2610, 2459-2611, 2459-2612, 2459-2613, 2459-2614, 2459-2615, 2459-2616, 2459-2617, 2459-2618, 2459-2619, 2459-2620, 2459-2621, 2459-2622, 2459-2623, 2459-2624, 2459-2625, 2459-2626, 2459-2627, 2459-2628, 2459-2629, 2459-2630, 2459-2631, 2461-2476, 2461-2566, 2461-2570, 2461-2571, 2461-2572, 2461-2573, 2461-2574, 2461-2575, 2461-2576, 2461-2577, 2461-2578, 2461-2579, 2461-2580, 2461-2581, 2461-2582, 2461-2583, 2461-2584, 2461-2585, 2461-2586, 2461-2587, 2461-2588,

2461-2589, 2461-2590, 2461-2591, 2461-2592, 2461-2593, 2461-2594, 2461-2595, 2461-2596, 2461-2597, 2461-2598, 2461-2599, 2461-2600, 2461-2601, 2461-2602, 2461-2603, 2461-2604, 2461-2605, 2461-2606, 2461-2607, 2461-2608, 2461-2609, 2461-2610, 2461-2611, 2461-2612, 2461-2613, 2461-2614, 2461-2615, 2461-2616, 2461-2617, 2461-2618, 2461-2619, 2461-2620, 2461-2621, 2461-2622, 2461-2623, 2461-2624, 2461-2625, 2461-2626, 2461-2627, 2461-2628, 2461-2629, 2461-2630, 2461-2631, 2551-2566, 2551-2570, 2551-2571, 2551-2572, 2551-2573, 2551-2574, 2551-2575, 2551-2576, 2551-2577, 2551-2578, 2551-2579, 2551-2580, 2551-2581, 2551-2582, 2551-2583, 2551-2584, 2551-2585, 2551-2586, 2551-2587, 2551-2588, 2551-2589, 2551-2590, 2551-2591, 2551-2592, 2551-2593, 2551-2594, 2551-2595, 2551-2596, 2551-2597, 2551-2598, 2551-2599, 2551-2600, 2551-2601, 2551-2602, 2551-2603, 2551-2604, 2551-2605, 2551-2606, 2551-2607, 2551-2608, 2551-2609, 2551-2610, 2551-2611, 2551-2612, 2551-2613, 2551-2614, 2551-2615, 2551-2616, 2551-2617, 2551-2618, 2551-2619, 2551-2620, 2551-2621, 2551-2622, 2551-2623, 2551-2624, 2551-2625, 2551-2626, 2551-2627, 2551-2628, 2551-2629, 2551-2630, 2551-2631, 2553-2570, 2553-2571, 2553-2572, 2553-2573, 2553-2574, 2553-2575, 2553-2576, 2553-2577, 2553-2578, 2553-2579, 2553-2580, 2553-2581, 2553-2582, 2553-2583, 2553-2584, 2553-2585, 2553-2586, 2553-2587, 2553-2588, 2553-2589, 2553-2590, 2553-2591, 2553-2592, 2553-2593, 2553-2594, 2553-2595,

2553-2596, 2553-2597, 2553-2598, 2553-2599, 2553-2600, 2553-2601, 2553-2602, 2553-2603, 2553-2604, 2553-2605, 2553-2606, 2553-2607, 2553-2608, 2553-2609, 2553-2610, 2553-2611, 2553-2612, 2553-2613, 2553-2614, 2553-2615, 2553-2616, 2553-2617, 2553-2618, 2553-2619, 2553-2620, 2553-2621, 2553-2622, 2553-2623, 2553-2624, 2553-2625, 2553-2626, 2553-2627, 2553-2628, 2553-2629, 2553-2630, 2553-2631, 2554-2573, 2554-2574, 2554-2575, 2554-2576, 2554-2577, 2554-2578, 2554-2579, 2554-2580, 2554-2581, 2554-2582, 2554-2583, 2554-2584, 2554-2585, 2554-2586, 2554-2587, 2554-2588, 2554-2589, 2554-2590, 2554-2591, 2554-2592, 2554-2593, 2554-2594, 2554-2595, 2554-2596, 2554-2597, 2554-2598, 2554-2599, 2554-2600, 2554-2601, 2554-2602, 2554-2603, 2554-2604, 2554-2605, 2554-2606, 2554-2607, 2554-2608, 2554-2609, 2554-2610, 2554-2611, 2554-2612, 2554-2613, 2554-2614, 2554-2615, 2554-2616, 2554-2617, 2554-2618, 2554-2619, 2554-2620, 2554-2621, 2554-2622, 2554-2623, 2554-2624, 2554-2625, 2554-2626, 2554-2627, 2554-2628, 2554-2629, 2554-2630, 2554-2631, 2555-2572, 2555-2573, 2555-2574, 2555-2575, 2555-2576, 2555-2577, 2555-2578, 2555-2579, 2555-2580, 2555-2581, 2555-2582, 2555-2583, 2555-2584, 2555-2585, 2555-2586, 2555-2587, 2555-2588, 2555-2589, 2555-2590, 2555-2591, 2555-2592, 2555-2593, 2555-2594, 2555-2595, 2555-2596, 2555-2597, 2555-2598, 2555-2599, 2555-2600, 2555-2601, 2555-2602, 2555-2603, 2555-2604, 2555-2605, 2555-2606, 2555-2607, 2555-2608,

2555-2609, 2555-2610, 2555-2611, 2555-2612, 2555-2613, 2555-2614, 2555-2615, 2555-2616, 2555-2617, 2555-2618, 2555-2619, 2555-2620, 2555-2621, 2555-2622, 2555-2623, 2555-2624, 2555-2625, 2555-2626, 2555-2627, 2555-2628, 2555-2629, 2555-2630, 2555-2631, 2556-2573, 2556-2574, 2556-2575, 2556-2576, 2556-2577, 2556-2578, 2556-2579, 2556-2580, 2556-2581, 2556-2582, 2556-2583, 2556-2584, 2556-2585, 2556-2586, 2556-2587, 2556-2588, 2556-2589, 2556-2590, 2556-2591, 2556-2592, 2556-2593, 2556-2594, 2556-2595, 2556-2596, 2556-2597, 2556-2598, 2556-2599, 2556-2600, 2556-2601, 2556-2602, 2556-2603, 2556-2604, 2556-2605, 2556-2606, 2556-2607, 2556-2608, 2556-2609, 2556-2610, 2556-2611, 2556-2612, 2556-2613, 2556-2614, 2556-2615, 2556-2616, 2556-2617, 2556-2618, 2556-2619, 2556-2620, 2556-2621, 2556-2622, 2556-2623, 2556-2624, 2556-2625, 2556-2626, 2556-2627, 2556-2628, 2556-2629, 2556-2630, 2556-2631, 2557-2574, 2557-2575, 2557-2576, 2557-2577, 2557-2578, 2557-2579, 2557-2580, 2557-2581, 2557-2582, 2557-2583, 2557-2584, 2557-2585, 2557-2586, 2557-2587, 2557-2588, 2557-2589, 2557-2590, 2557-2591, 2557-2592, 2557-2593, 2557-2594, 2557-2595, 2557-2596, 2557-2597, 2557-2598, 2557-2599, 2557-2600, 2557-2601, 2557-2602, 2557-2603, 2557-2604, 2557-2605, 2557-2606, 2557-2607, 2557-2608, 2557-2609, 2557-2610, 2557-2611, 2557-2612, 2557-2613, 2557-2614, 2557-2615, 2557-2616, 2557-2617, 2557-2618, 2557-2619, 2557-2620, 2557-2621, 2557-2622, 2557-2623,

2557-2624, 2557-2625, 2557-2626, 2557-2627, 2557-2628, 2557-2629, 2557-2630, 2557-2631, 2558-2575, 2558-2576, 2558-2577, 2558-2578, 2558-2579, 2558-2580, 2558-2581, 2558-2582, 2558-2583, 2558-2584, 2558-2585, 2558-2586, 2558-2587, 2558-2588, 2558-2589, 2558-2590, 2558-2591, 2558-2592, 2558-2593, 2558-2594, 2558-2595, 2558-2596, 2558-2597, 2558-2598, 2558-2599, 2558-2600, 2558-2601, 2558-2602, 2558-2603, 2558-2604, 2558-2605, 2558-2606, 2558-2607, 2558-2608, 2558-2609, 2558-2610, 2558-2611, 2558-2612, 2558-2613, 2558-2614, 2558-2615, 2558-2616, 2558-2617, 2558-2618, 2558-2619, 2558-2620, 2558-2621, 2558-2622, 2558-2623, 2558-2624, 2558-2625, 2558-2626, 2558-2627, 2558-2628, 2558-2629, 2558-2630, 2558-2631, 2559-2576, 2559-2577, 2559-2578, 2559-2579, 2559-2580, 2559-2581, 2559-2582, 2559-2583, 2559-2584, 2559-2585, 2559-2586, 2559-2587, 2559-2588, 2559-2589, 2559-2590, 2559-2591, 2559-2592, 2559-2593, 2559-2594, 2559-2595, 2559-2596, 2559-2597, 2559-2598, 2559-2599, 2559-2600, 2559-2601, 2559-2602, 2559-2603, 2559-2604, 2559-2605, 2559-2606, 2559-2607, 2559-2608, 2559-2609, 2559-2610, 2559-2611, 2559-2612, 2559-2613, 2559-2614, 2559-2615, 2559-2616, 2559-2617, 2559-2618, 2559-2619, 2559-2620, 2559-2621, 2559-2622, 2559-2623, 2559-2624, 2559-2625, 2559-2626, 2559-2627, 2559-2628, 2559-2629, 2559-2630, 2559-2631, 2560-2577, 2560-2578, 2560-2579, 2560-2580, 2560-2581, 2560-2582, 2560-2583, 2560-2584, 2560-2585, 2560-2586, 2560-2587,

2560-2588, 2560-2589, 2560-2590, 2560-2591, 2560-2592, 2560-2593, 2560-2594, 2560-2595, 2560-2596, 2560-2597, 2560-2598, 2560-2599, 2560-2600, 2560-2601, 2560-2602, 2560-2603, 2560-2604, 2560-2605, 2560-2606, 2560-2607, 2560-2608, 2560-2609, 2560-2610, 2560-2611, 2560-2612, 2560-2613, 2560-2614, 2560-2615, 2560-2616, 2560-2617, 2560-2618, 2560-2619, 2560-2620, 2560-2621, 2560-2622, 2560-2623, 2560-2624, 2560-2625, 2560-2626, 2560-2627, 2560-2628, 2560-2629, 2560-2630, 2560-2631, 2561-2578, 2561-2579, 2561-2580, 2561-2581, 2561-2582, 2561-2583, 2561-2584, 2561-2585, 2561-2586, 2561-2587, 2561-2588, 2561-2589, 2561-2590, 2561-2591, 2561-2592, 2561-2593, 2561-2594, 2561-2595, 2561-2596, 2561-2597, 2561-2598, 2561-2599, 2561-2600, 2561-2601, 2561-2602, 2561-2603, 2561-2604, 2561-2605, 2561-2606, 2561-2607, 2561-2608, 2561-2609, 2561-2610, 2561-2611, 2561-2612, 2561-2613, 2561-2614, 2561-2615, 2561-2616, 2561-2617, 2561-2618, 2561-2619, 2561-2620, 2561-2621, 2561-2622, 2561-2623, 2561-2624, 2561-2625, 2561-2626, 2561-2627, 2561-2628, 2561-2629, 2561-2630, 2561-2631, 2562-2577, 2562-2578, 2562-2579, 2562-2580, 2562-2581, 2562-2582, 2562-2583, 2562-2584, 2562-2585, 2562-2586, 2562-2587, 2562-2588, 2562-2589, 2562-2590, 2562-2591, 2562-2592, 2562-2593, 2562-2594, 2562-2595, 2562-2596, 2562-2597, 2562-2598, 2562-2599, 2562-2600, 2562-2601, 2562-2602, 2562-2603, 2562-2604, 2562-2605, 2562-2606, 2562-2607, 2562-2608, 2562-2609, 2562-2610,

2562-2611, 2562-2612, 2562-2613, 2562-2614, 2562-2615, 2562-2616, 2562-2617, 2562-2618, 2562-2619, 2562-2620, 2562-2621, 2562-2622, 2562-2623, 2562-2624, 2562-2625, 2562-2626, 2562-2627, 2562-2628, 2562-2629, 2562-2630, 2562-2631, 2563-2580, 2563-2581, 2563-2582, 2563-2583, 2563-2584, 2563-2585, 2563-2586, 2563-2587, 2563-2588, 2563-2589, 2563-2590, 2563-2591, 2563-2592, 2563-2593, 2563-2594, 2563-2595, 2563-2596, 2563-2597, 2563-2598, 2563-2599, 2563-2600, 2563-2601, 2563-2602, 2563-2603, 2563-2604, 2563-2605, 2563-2606, 2563-2607, 2563-2608, 2563-2609, 2563-2610, 2563-2611, 2563-2612, 2563-2613, 2563-2614, 2563-2615, 2563-2616, 2563-2617, 2563-2618, 2563-2619, 2563-2620, 2563-2621, 2563-2622, 2563-2623, 2563-2624, 2563-2625, 2563-2626, 2563-2627, 2563-2628, 2563-2629, 2563-2630, 2563-2631, 2564-2581, 2564-2582, 2564-2583, 2564-2584, 2564-2585, 2564-2586, 2564-2587, 2564-2588, 2564-2589, 2564-2590, 2564-2591, 2564-2592, 2564-2593, 2564-2594, 2564-2595, 2564-2596, 2564-2597, 2564-2598, 2564-2599, 2564-2600, 2564-2601, 2564-2602, 2564-2603, 2564-2604, 2564-2605, 2564-2606, 2564-2607, 2564-2608, 2564-2609, 2564-2610, 2564-2611, 2564-2612, 2564-2613, 2564-2614, 2564-2615, 2564-2616, 2564-2617, 2564-2618, 2564-2619, 2564-2620, 2564-2621, 2564-2622, 2564-2623, 2564-2624, 2564-2625, 2564-2626, 2564-2627, 2564-2628, 2564-2629, 2564-2630, 2564-2631, 2565-2584, 2565-2585, 2565-2586, 2565-2587, 2565-2588, 2565-2589, 2565-2590, 2565-2591,

2565-2592, 2565-2593, 2565-2594, 2565-2595, 2565-2596, 2565-2597, 2565-2598, 2565-2599, 2565-2600, 2565-2601, 2565-2602, 2565-2603, 2565-2604, 2565-2605, 2565-2606, 2565-2607, 2565-2608, 2565-2609, 2565-2610, 2565-2611, 2565-2612, 2565-2613, 2565-2614, 2565-2615, 2565-2616, 2565-2617, 2565-2618, 2565-2619, 2565-2620, 2565-2621, 2565-2622, 2565-2623, 2565-2624, 2565-2625, 2565-2626, 2565-2627, 2565-2628, 2565-2629, 2565-2630, 2565-2631, 2566-2583, 2566-2584, 2566-2585, 2566-2586, 2566-2587, 2566-2588, 2566-2589, 2566-2590, 2566-2591, 2566-2592, 2566-2593, 2566-2594, 2566-2595, 2566-2596, 2566-2597, 2566-2598, 2566-2599, 2566-2600, 2566-2601, 2566-2602, 2566-2603, 2566-2604, 2566-2605, 2566-2606, 2566-2607, 2566-2608, 2566-2609, 2566-2610, 2566-2611, 2566-2612, 2566-2613, 2566-2614, 2566-2615, 2566-2616, 2566-2617, 2566-2618, 2566-2619, 2566-2620, 2566-2621, 2566-2622, 2566-2623, 2566-2624, 2566-2625, 2566-2626, 2566-2627, 2566-2628, 2566-2629, 2566-2630, 2566-2631, 2567-2584, 2567-2585, 2567-2586, 2567-2587, 2567-2588, 2567-2589, 2567-2590, 2567-2591, 2567-2592, 2567-2593, 2567-2594, 2567-2595, 2567-2596, 2567-2597, 2567-2598, 2567-2599, 2567-2600, 2567-2601, 2567-2602, 2567-2603, 2567-2604, 2567-2605, 2567-2606, 2567-2607, 2567-2608, 2567-2609, 2567-2610, 2567-2611, 2567-2612, 2567-2613, 2567-2614, 2567-2615, 2567-2616, 2567-2617, 2567-2618, 2567-2619, 2567-2620, 2567-2621, 2567-2622, 2567-2623, 2567-2624, 2567-2625, 2567-2626,

2567-2627, 2567-2628, 2567-2629, 2567-2630, 2567-2631, 2568-2585, 2568-2586, 2568-2587, 2568-2588, 2568-2589, 2568-2590, 2568-2591, 2568-2592, 2568-2593, 2568-2594, 2568-2595, 2568-2596, 2568-2597, 2568-2598, 2568-2599, 2568-2600, 2568-2601, 2568-2602, 2568-2603, 2568-2604, 2568-2605, 2568-2606, 2568-2607, 2568-2608, 2568-2609, 2568-2610, 2568-2611, 2568-2612, 2568-2613, 2568-2614, 2568-2615, 2568-2616, 2568-2617, 2568-2618, 2568-2619, 2568-2620, 2568-2621, 2568-2622, 2568-2623, 2568-2624, 2568-2625, 2568-2626, 2568-2627, 2568-2628, 2568-2629, 2568-2630, 2568-2631, 2569-2586, 2569-2587, 2569-2588, 2569-2589, 2569-2590, 2569-2591, 2569-2592, 2569-2593, 2569-2594, 2569-2595, 2569-2596, 2569-2597, 2569-2598, 2569-2599, 2569-2600, 2569-2601, 2569-2602, 2569-2603, 2569-2604, 2569-2605, 2569-2606, 2569-2607, 2569-2608, 2569-2609, 2569-2610, 2569-2611, 2569-2612, 2569-2613, 2569-2614, 2569-2615, 2569-2616, 2569-2617, 2569-2618, 2569-2619, 2569-2620, 2569-2621, 2569-2622, 2569-2623, 2569-2624, 2569-2625, 2569-2626, 2569-2627, 2569-2628, 2569-2629, 2569-2630, 2569-2631, 2569-2586, 2569-2587, 2569-2588, 2569-2589, 2569-2590, 2569-2591, 2569-2592, 2569-2593, 2569-2594, 2569-2595, 2569-2596, 2569-2597, 2569-2598, 2569-2599, 2569-2600, 2569-2601, 2569-2602, 2569-2603, 2569-2604, 2569-2605, 2569-2606, 2569-2607, 2569-2608, 2569-2609, 2569-2610, 2569-2611, 2569-2612, 2569-2613, 2569-2614, 2569-2615, 2569-2616, 2569-2617, 2569-2618, 2569-2619,

2569-2620, 2569-2621, 2569-2622, 2569-2623, 2569-2624, 2569-2625, 2569-2626, 2569-2627, 2569-2628, 2569-2629, 2569-2630, 2569-2631, 2571-2588, 2571-2589, 2571-2590, 2571-2591, 2571-2592, 2571-2593, 2571-2594, 2571-2595, 2571-2596, 2571-2597, 2571-2598, 2571-2599, 2571-2600, 2571-2601, 2571-2602, 2571-2603, 2571-2604, 2571-2605, 2571-2606, 2571-2607, 2571-2608, 2571-2609, 2571-2610, 2571-2611, 2571-2612, 2571-2613, 2571-2614, 2571-2615, 2571-2616, 2571-2617, 2571-2618, 2571-2619, 2571-2620, 2571-2621, 2571-2622, 2571-2623, 2571-2624, 2571-2625, 2571-2626, 2571-2627, 2571-2628, 2571-2629, 2571-2630, 2571-2631, 2572-2589, 2572-2590, 2572-2591, 2572-2592, 2572-2593, 2572-2594, 2572-2595, 2572-2596, 2572-2597, 2572-2598, 2572-2599, 2572-2600, 2572-2601, 2572-2602, 2572-2603, 2572-2604, 2572-2605, 2572-2606, 2572-2607, 2572-2608, 2572-2609, 2572-2610, 2572-2611, 2572-2612, 2572-2613, 2572-2614, 2572-2615, 2572-2616, 2572-2617, 2572-2618, 2572-2619, 2572-2620, 2572-2621, 2572-2622, 2572-2623, 2572-2624, 2572-2625, 2572-2626, 2572-2627, 2572-2628, 2572-2629, 2572-2630, 2572-2631, 2573-2590, 2573-2591, 2573-2592, 2573-2593, 2573-2594, 2573-2595, 2573-2596, 2573-2597, 2573-2598, 2573-2599, 2573-2600, 2573-2601, 2573-2602, 2573-2603, 2573-2604, 2573-2605, 2573-2606, 2573-2607, 2573-2608, 2573-2609, 2573-2610, 2573-2611, 2573-2612, 2573-2613, 2573-2614, 2573-2615, 2573-2616, 2573-2617, 2573-2618, 2573-2619, 2573-2620, 2573-2621, 2573-2622,

2573-2623, 2573-2624, 2573-2625, 2573-2626, 2573-2627, 2573-2628, 2573-2629, 2573-2630, 2573-2631, 2574-2591, 2574-2592, 2574-2593, 2574-2594, 2574-2595, 2574-2596, 2574-2597, 2574-2598, 2574-2599, 2574-2600, 2574-2601, 2574-2602, 2574-2603, 2574-2604, 2574-2605, 2574-2606, 2574-2607, 2574-2608, 2574-2609, 2574-2610, 2574-2611, 2574-2612, 2574-2613, 2574-2614, 2574-2615, 2574-2616, 2574-2617, 2574-2618, 2574-2619, 2574-2620, 2574-2621, 2574-2622, 2574-2623, 2574-2624, 2574-2625, 2574-2626, 2574-2627, 2574-2628, 2574-2629, 2574-2630, 2574-2631, 2575-2592, 2575-2593, 2575-2594, 2575-2595, 2575-2596, 2575-2597, 2575-2598, 2575-2599, 2575-2600, 2575-2601, 2575-2602, 2575-2603, 2575-2604, 2575-2605, 2575-2606, 2575-2607, 2575-2608, 2575-2609, 2575-2610, 2575-2611, 2575-2612, 2575-2613, 2575-2614, 2575-2615, 2575-2616, 2575-2617, 2575-2618, 2575-2619, 2575-2620, 2575-2621, 2575-2622, 2575-2623, 2575-2624, 2575-2625, 2575-2626, 2575-2627, 2575-2628, 2575-2629, 2575-2630, 2575-2631, 2576-2593, 2576-2594, 2576-2595, 2576-2596, 2576-2597, 2576-2598, 2576-2599, 2576-2600, 2576-2601, 2576-2602, 2576-2603, 2576-2604, 2576-2605, 2576-2606, 2576-2607, 2576-2608, 2576-2609, 2576-2610, 2576-2611, 2576-2612, 2576-2613, 2576-2614, 2576-2615, 2576-2616, 2576-2617, 2576-2618, 2576-2619, 2576-2620, 2576-2621, 2576-2622, 2576-2623, 2576-2624, 2576-2625, 2576-2626, 2576-2627, 2576-2628, 2576-2629, 2576-2630, 2576-2631, 2577-2594, 2577-2595, 2577-2596,

2577-2597, 2577-2598, 2577-2599, 2577-2600, 2577-2601, 2577-2602, 2577-2603, 2577-2604, 2577-2605, 2577-2606, 2577-2607, 2577-2608, 2577-2609, 2577-2610, 2577-2611, 2577-2612, 2577-2613, 2577-2614, 2577-2615, 2577-2616, 2577-2617, 2577-2618, 2577-2619, 2577-2620, 2577-2621, 2577-2622, 2577-2623, 2577-2624, 2577-2625, 2577-2626, 2577-2627, 2577-2628, 2577-2629, 2577-2630, 2577-2631, 2578-2597, 2578-2598, 2578-2599, 2578-2600, 2578-2601, 2578-2602, 2578-2603, 2578-2604, 2578-2605, 2578-2606, 2578-2607, 2578-2608, 2578-2609, 2578-2610, 2578-2611, 2578-2612, 2578-2613, 2578-2614, 2578-2615, 2578-2616, 2578-2617, 2578-2618, 2578-2619, 2578-2620, 2578-2621, 2578-2622, 2578-2623, 2578-2624, 2578-2625, 2578-2626, 2578-2627, 2578-2628, 2578-2629, 2578-2630, 2578-2631, 2579-2598, 2579-2599, 2579-2600, 2579-2601, 2579-2602, 2579-2603, 2579-2604, 2579-2605, 2579-2606, 2579-2607, 2579-2608, 2579-2609, 2579-2610, 2579-2611, 2579-2612, 2579-2613, 2579-2614, 2579-2615, 2579-2616, 2579-2617, 2579-2618, 2579-2619, 2579-2620, 2579-2621, 2579-2622, 2579-2623, 2579-2624, 2579-2625, 2579-2626, 2579-2627, 2579-2628, 2579-2629, 2579-2630, 2579-2631, 2580-2598, 2580-2599, 2580-2600, 2580-2601, 2580-2602, 2580-2603, 2580-2604, 2580-2605, 2580-2606, 2580-2607, 2580-2608, 2580-2609, 2580-2610, 2580-2611, 2580-2612, 2580-2613, 2580-2614, 2580-2615, 2580-2616, 2580-2617, 2580-2618, 2580-2619, 2580-2620, 2580-2621, 2580-2622, 2580-2623, 2580-2624, 2580-2625,

2580-2626, 2580-2627, 2580-2628, 2580-2629, 2580-2630, 2580-2631, 2581-2597, 2581-2598, 2581-2599, 2581-2600, 2581-2601, 2581-2602, 2581-2603, 2581-2604, 2581-2605, 2581-2606, 2581-2607, 2581-2608, 2581-2609, 2581-2610, 2581-2611, 2581-2612, 2581-2613, 2581-2614, 2581-2615, 2581-2616, 2581-2617, 2581-2618, 2581-2619, 2581-2620, 2581-2621, 2581-2622, 2581-2623, 2581-2624, 2581-2625, 2581-2626, 2581-2627, 2581-2628, 2581-2629, 2581-2630, 2581-2631, 2582-2600, 2582-2601, 2582-2602, 2582-2603, 2582-2604, 2582-2605, 2582-2606, 2582-2607, 2582-2608, 2582-2609, 2582-2610, 2582-2611, 2582-2612, 2582-2613, 2582-2614, 2582-2615, 2582-2616, 2582-2617, 2582-2618, 2582-2619, 2582-2620, 2582-2621, 2582-2622, 2582-2623, 2582-2624, 2582-2625, 2582-2626, 2582-2627, 2582-2628, 2582-2629, 2582-2630, 2582-2631, 2583-2601, 2583-2602, 2583-2603, 2583-2604, 2583-2605, 2583-2606, 2583-2607, 2583-2608, 2583-2609, 2583-2610, 2583-2611, 2583-2612, 2583-2613, 2583-2614, 2583-2615, 2583-2616, 2583-2617, 2583-2618, 2583-2619, 2583-2620, 2583-2621, 2583-2622, 2583-2623, 2583-2624, 2583-2625, 2583-2626, 2583-2627, 2583-2628, 2583-2629, 2583-2630, 2583-2631, 2585-2603, 2585-2604, 2585-2605, 2585-2606, 2585-2607, 2585-2608, 2585-2609, 2585-2610, 2585-2611, 2585-2612, 2585-2613, 2585-2614, 2585-2615, 2585-2616, 2585-2617, 2585-2618, 2585-2619, 2585-2620, 2585-2621, 2585-2622, 2585-2623, 2585-2624, 2585-2625, 2585-2626, 2585-2627, 2585-2628, 2585-2629, 2585-2630,

2585-2631, 2586-2604, 2586-2605, 2586-2606, 2586-2607, 2586-2608, 2586-2609, 2586-2610, 2586-2611, 2586-2612, 2586-2613, 2586-2614, 2586-2615, 2586-2616, 2586-2617, 2586-2618, 2586-2619, 2586-2620, 2586-2621, 2586-2622, 2586-2623, 2586-2624, 2586-2625, 2586-2626, 2586-2627, 2586-2628, 2586-2629, 2586-2630, 2586-2631, 2587-2605, 2587-2606, 2587-2607, 2587-2608, 2587-2609, 2587-2610, 2587-2611, 2587-2612, 2587-2613, 2587-2614, 2587-2615, 2587-2616, 2587-2617, 2587-2618, 2587-2619, 2587-2620, 2587-2621, 2587-2622, 2587-2623, 2587-2624, 2587-2625, 2587-2626, 2587-2627, 2587-2628, 2587-2629, 2587-2630, 2587-2631, 2588-2606, 2588-2607, 2588-2608, 2588-2609, 2588-2610, 2588-2611, 2588-2612, 2588-2613, 2588-2614, 2588-2615, 2588-2616, 2588-2617, 2588-2618, 2588-2619, 2588-2620, 2588-2621, 2588-2622, 2588-2623, 2588-2624, 2588-2625, 2588-2626, 2588-2627, 2588-2628, 2588-2629, 2588-2630, 2588-2631, 2589-2607, 2589-2608, 2589-2609, 2589-2610, 2589-2611, 2589-2612, 2589-2613, 2589-2614, 2589-2615, 2589-2616, 2589-2617, 2589-2618, 2589-2619, 2589-2620, 2589-2621, 2589-2622, 2589-2623, 2589-2624, 2589-2625, 2589-2626, 2589-2627, 2589-2628, 2589-2629, 2589-2630, 2589-2631, 2590-2606, 2590-2607, 2590-2608, 2590-2609, 2590-2610, 2590-2611, 2590-2612, 2590-2613, 2590-2614, 2590-2615, 2590-2616, 2590-2617, 2590-2618, 2590-2619, 2590-2620, 2590-2621, 2590-2622, 2590-2623, 2590-2624, 2590-2625, 2590-2626, 2590-2627, 2590-2628, 2590-2629, 2590-2630,

2590-2631, 2591-2610, 2591-2611, 2591-2612, 2591-2613, 2591-2614, 2591-2615, 2591-2616, 2591-2617, 2591-2618, 2591-2619, 2591-2620, 2591-2621, 2591-2622, 2591-2623, 2591-2624, 2591-2625, 2591-2626, 2591-2627, 2591-2628, 2591-2629, 2591-2630, 2591-2631, 2592-2611, 2592-2612, 2592-2613, 2592-2614, 2592-2615, 2592-2616, 2592-2617, 2592-2618, 2592-2619, 2592-2620, 2592-2621, 2592-2622, 2592-2623, 2592-2624, 2592-2625, 2592-2626, 2592-2627, 2592-2628, 2592-2629, 2592-2630, 2592-2631, 2593-2608, 2593-2612, 2593-2613, 2593-2614, 2593-2615, 2593-2616, 2593-2617, 2593-2618, 2593-2619, 2593-2620, 2593-2621, 2593-2622, 2593-2623, 2593-2624, 2593-2625, 2593-2626, 2593-2627, 2593-2628, 2593-2629, 2593-2630, 2593-2631, 2594-2612, 2594-2613, 2594-2614, 2594-2615, 2594-2616, 2594-2617, 2594-2618, 2594-2619, 2594-2620, 2594-2621, 2594-2622, 2594-2623, 2594-2624, 2594-2625, 2594-2626, 2594-2627, 2594-2628, 2594-2629, 2594-2630, 2594-2631, 2595-2611, 2595-2612, 2595-2613, 2595-2614, 2595-2615, 2595-2616, 2595-2617, 2595-2618, 2595-2619, 2595-2620, 2595-2621, 2595-2622, 2595-2623, 2595-2624, 2595-2625, 2595-2626, 2595-2627, 2595-2628, 2595-2629, 2595-2630, 2595-2631, 2596-2614, 2596-2615, 2596-2616, 2596-2617, 2596-2618, 2596-2619, 2596-2620, 2596-2621, 2596-2622, 2596-2623, 2596-2624, 2596-2625, 2596-2626, 2596-2627, 2596-2628, 2596-2629, 2596-2630, 2596-2631, 2597-2612, 2597-2613, 2597-2614, 2597-2615, 2597-2616, 2597-2617, 2597-2618, 2597-2619,

2597-2620, 2597-2621, 2597-2622, 2597-2623, 2597-2624, 2597-2625, 2597-2626, 2597-2627, 2597-2628, 2597-2629, 2597-2630, 2597-2631, 2598-2613, 2598-2614, 2598-2615, 2598-2616, 2598-2617, 2598-2618, 2598-2619, 2598-2620, 2598-2621, 2598-2622, 2598-2623, 2598-2624, 2598-2625, 2598-2626, 2598-2627, 2598-2628, 2598-2629, 2598-2630, 2598-2631, 2599-2614, 2599-2615, 2599-2616, 2599-2617, 2599-2618, 2599-2619, 2599-2620, 2599-2621, 2599-2622, 2599-2623, 2599-2624, 2599-2625, 2599-2626, 2599-2627, 2599-2628, 2599-2629, 2599-2630, 2599-2631, 2600-2615, 2600-2616, 2600-2617, 2600-2618, 2600-2619, 2600-2620, 2600-2621, 2600-2622, 2600-2623, 2600-2624, 2600-2625, 2600-2626, 2600-2627, 2600-2628, 2600-2629, 2600-2630, 2600-2631, 2601-2616, 2601-2617, 2601-2618, 2601-2619, 2601-2620, 2601-2621, 2601-2622, 2601-2623, 2601-2624, 2601-2625, 2601-2626, 2601-2627, 2601-2628, 2601-2629, 2601-2630, 2601-2631, 2602-2618, 2602-2619, 2602-2620, 2602-2621, 2602-2622, 2602-2623, 2602-2624, 2602-2625, 2602-2626, 2602-2627, 2602-2628, 2602-2629, 2602-2630, 2602-2631, 2603-2620, 2603-2621, 2603-2622, 2603-2623, 2603-2624, 2603-2625, 2603-2626, 2603-2627, 2603-2628, 2603-2629, 2603-2630, 2603-2631, 2604-2619, 2604-2620, 2604-2621, 2604-2622, 2604-2623, 2604-2624, 2604-2625, 2604-2626, 2604-2627, 2604-2628, 2604-2629, 2604-2630, 2604-2631, 2605-2620, 2605-2621, 2605-2622, 2605-2623, 2605-2624, 2605-2625, 2605-2626, 2605-2627, 2605-2628, 2605-2629, 2605-2630,

2605-2631, 2606-2621, 2606-2622, 2606-2623, 2606-2624, 2606-2625, 2606-2626, 2606-2627, 2606-2628, 2606-2629, 2606-2630, 2606-2631, 2607-2622, 2607-2623, 2607-2624, 2607-2625, 2607-2626, 2607-2627, 2607-2628, 2607-2629, 2607-2630, 2607-2631, 2608-2623, 2608-2624, 2608-2625, 2608-2626, 2608-2627, 2608-2628, 2608-2629, 2608-2630, 2608-2631, 2609-2624, 2609-2625, 2609-2626, 2609-2627, 2609-2628, 2609-2629, 2609-2630, 2609-2631, 2610-2625, 2610-2626, 2610-2627, 2610-2628, 2610-2629, 2610-2630, 2610-2631, 2611-2626, 2611-2627, 2611-2628, 2611-2629, 2611-2630, 2611-2631, 2612-2627, 2612-2628, 2612-2629, 2612-2630, 2612-2631, 2613-2628, 2613-2629, 2613-2630, 2613-2631, 2614-2629, 2614-2630, 2614-2631, 2615-2630, 2615-2631, o 2616-2631 de un ácido nucleico de CFB que tiene la secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 1, y donde la secuencia de nucleobases del oligonucleótido modificado es complementaria a la SEQ ID NO:1.

8. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 8 a 80 nucleósidos enlazados complementarios dentro de los nucleótidos 2193-2212, 2195-2210, 2457-2476, 2571-2590, 2584-2603, 2588-2607, 2592-2611, 2594-2613, 2597-2616, 2600-2619 o 2596-2611 de la SEQ ID NO: 1.

9. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 8 a 80 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobases que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 y 598.

10. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que consiste en cualquiera de las SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 y 598.

11. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobase que comprende al menos 8 nucleobases contiguas de cualquiera de las secuencias de nucleobase de las SEQ ID NO: 6-808.

12. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 9 nucleobases

contiguas de cualquiera de las secuencias de nucleobases de las SEQ ID NO: 6-808.

13. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 10 nucleobases contiguas de cualquiera de las secuencias de nucleobases de las SEQ ID NO: 6-808.

14. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 11 nucleobases contiguas de cualquiera de las secuencias de nucleobases de las SEQ ID NO: 6-808.

15. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 12 nucleobases contiguas de cualquiera de las secuencias de nucleobases de las SEQ ID NO: 6-808.

16. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobases que comprende la secuencia de nucleobases de cualquiera de las SEQ ID NO: 6-808.

17. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en la secuencia de nucleobases de cualquiera de las SEQ ID NO: 6-808.

18. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos una parte de 8 nucleobases de cualquiera de las SEQ ID NO: 84, 238, 239, 317, 412, 413, 420, 421, 426, 434, 436, 437, 438, 439, 440, 442, 443, 444, 445, 446, 448, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 464, 465, 472, 473, 514, 515, 542, 543, 544, 545, 546, 551, 553, 555, 556, 599, 600, 601, 602, 610, 616, 617, 618, 662, 666, 670, 676, 677, 678, 688, 689, 713, 723, 729, 730, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 755, 756, 768, 783, 793, 833 y 867.

19. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado

y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobases que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453, 455, 549 y 598, donde el oligonucleótido modificado comprende:

un segmento de intermedio que consiste en desoxinucleósidos enlazados;

un segmento de ala 5’ que consiste en nucleósidos enlazados; y

un segmento de ala 3’ que consiste en nucleósidos enlazados;

donde el segmento de intermedio se coloca entre el segmento de ala 5’ y el segmento de ala 3’ y donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado.

20. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 20 nucleósidos enlazados que tienen una secuencia de nucleobases que consiste en la secuencia mencionada en las SEQ ID NO: 198, 228, 237, 440, 444, 448, 450, 453 o 455, donde el oligonucleótido modificado comprende

un segmento de intermedio que consiste en diez desoxinucleósidos enlazados;

un segmento de ala 5' que consiste en cinco

nucleósidos enlazados; y

un segmento de ala 3' que consiste en cinco nucleósidos enlazados,

donde el segmento de intermedio se encuentra ubicado entre el segmento del ala 5’ y el segmento del ala 3’, donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar de 2’-O-metoxietilo, donde cada enlace internucleósido es un enlace de fosforotioato y donde cada citosina es una 5-metilcitosina.

21. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 16 nucleósidos enlazados que tienen una secuencia de nucleobases que consiste en la secuencia mencionada en las SEQ ID NO: 598, donde el oligonucleótido modificado comprende:

un segmento intermedio que consiste en diez desoxinucleósidos unidos,

un segmento de ala 5’ que consiste en tres nucleósidos unidos; y

un segmento de ala 3’ que consiste en tres nucleósidos unidos;

donde el segmento intermedio se encuentra ubicado entre el segmento de ala 5’ y el segmento de ala 3’; donde el

segmento de ala 5’ comprende un azúcar 2’-O-metoxietilo, azúcar 2’-O-metoxietilo y un azúcar de cEt en la dirección 5’ a 3’; donde el segmento de ala 3’ comprende u azúcar de cEt, azúcar de cEt sugar y azúcar 2’-O-metoxietilo en la dirección 5’ a 3’; donde cada unión internucleósido es una unión de fosforotioato; y donde cada citosina es una 5-metulcitosina.

22. Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado y un grupo conjugado, donde el oligonucleótido modificado consiste en 16 nucleósidos enlazados que tienen una secuencia de nucleobases que consiste en la secuencia mencionada en las SEQ ID NO: 549, donde el oligonucleótido modificado comprende

un segmento intermedio que consiste en diez desoxinucleósidos unidos,

un segmento de ala 5’ que consiste en tres nucleósidos unidos; y

un segmento de ala 3’ que consiste en tres nucleósidos unidos;

donde el segmento intermedio se encuentra ubicado entre el segmento del ala 5’ y el segmento del ala 3’, donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar de cEt; donde cada enlace internucleósido es un enlace de fosforotioato y donde cada citosina es una 5-metilcitosina.

23. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, donde el oligonucleótido es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % complementario a la SEQ ID NO: 1 o 2.

24. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, donde el oligonucleótido modificado comprende al menos una unión internucleósido modificado, al menos un azúcar modificado o al menos una nucleobase modificada.

25. El compuesto de la reivindicación 24, donde la unión internucleósido modificado es una unión internucleósido fosforotioato.

26. El compuesto de la reivindicación 25, donde el oligonucleótido modificado comprende al menos 1 unión internucleósido fosfodiéster.

27. El compuesto de la reivindicación 25, donde el oligonucleótido modificado comprende al menos 2 uniones internucleósido fosfodiéster.

28. El compuesto de la reivindicación 25, donde el oligonucleótido modificado comprende al menos 3 uniones internucleósido fosfodiéster.

29. El compuesto de la reivindicación 25, donde el oligonucleótido modificado comprende al menos 4 uniones internucleósido fosfodiéster.

30. El compuesto de la reivindicación 25, donde el oligonucleótido modificado comprende al menos 5 uniones internucleósido fosfodiéster.

31. El compuesto de la reivindicación 25, donde el oligonucleótido modificado comprende al menos 6 uniones internucleósido fosfodiéster.

32. El compuesto de la reivindicación 25, donde el oligonucleótido modificado comprende al menos 7 uniones internucleósido fosfodiéster.

33. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 26-32, donde cada unión internucleósido del oligonucleótido modificado se selecciona de una unión internucleósido de fosfodiéster y una unión internucleósido fosforotioato.

34. El compuesto de la reivindicación 25, donde cada unión internucleósido del oligonucleótido modificado comprende una

unión internucleósido fosforotioato.

35. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 24-34, donde el azúcar modificado es un azúcar bicíclico.

36. El compuesto de la reivindicación 35, donde el azúcar bicíclico se selecciona del grupo que consiste en: 4'-(CH_2)-O-2' (LNA); 4'-$(CH_2)_2$-O-2' (ENA); y 4'-$CH(CH_3)$-O-2' (cEt).

37. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 24-34, donde el azúcar modificado es 2'-O-metoxietilo.

38. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 24-37, donde la nucleobase modificada es una 5-metilcitosina.

39. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-38, donde el oligonucleótido modificado comprende:

(a) un segmento intermedio que consiste en desoxinucleósidos enlazados;

(b) un segmento de ala 5’ que consiste en nucleósidos enlazados; y

(c) un segmento de ala 3’ que consiste en nucleósidos enlazados;

donde el segmento de intermedio está ubicado entre el

segmento de ala 5’ y el segmento de ala 3’ e inmediatamente adyacente a estos y donde cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado.

40. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-39, donde el compuesto es de cadena simple.

41. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-39, donde el compuesto es de cadena doble.

42. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-41, donde el compuesto comprende ribonucleótidos.

43. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-41, donde el compuesto comprende desoxirribonucleótidos.

44. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-43, donde el oligonucleótido modificado consiste en 10 a 30 nucleósidos enlazados.

45. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-43, donde el oligonucleótido modificado consiste en 12 a 30 nucleósidos enlazados.

46. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-43, donde el oligonucleótido modificado consiste en 15 a 30 nucleósidos enlazados.

47. Un compuesto que consiste en ISIS 532770, ISIS 532800, ISIS 532809, ISIS 588540, ISIS 588544, ISIS 588548, ISIS 588550, ISIS 588553, ISIS 588555, ISIS 588848 o ISIS 594430, y un grupo conjugado.

48. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 47, donde el grupo conjugado está unido al oligonucleótido modificado en el extremo 5' del oligonucleótido modificado.

49. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 47, donde el grupo conjugado está unido al oligonucleótido modificado en el extremo 3' del oligonucleótido modificado.

50. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-49, donde el grupo conjugado comprende exactamente un ligando.

51. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-49, donde el grupo conjugado comprende exactamente dos ligandos.

52. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-49, donde el grupo conjugado comprende tres o más ligandos.

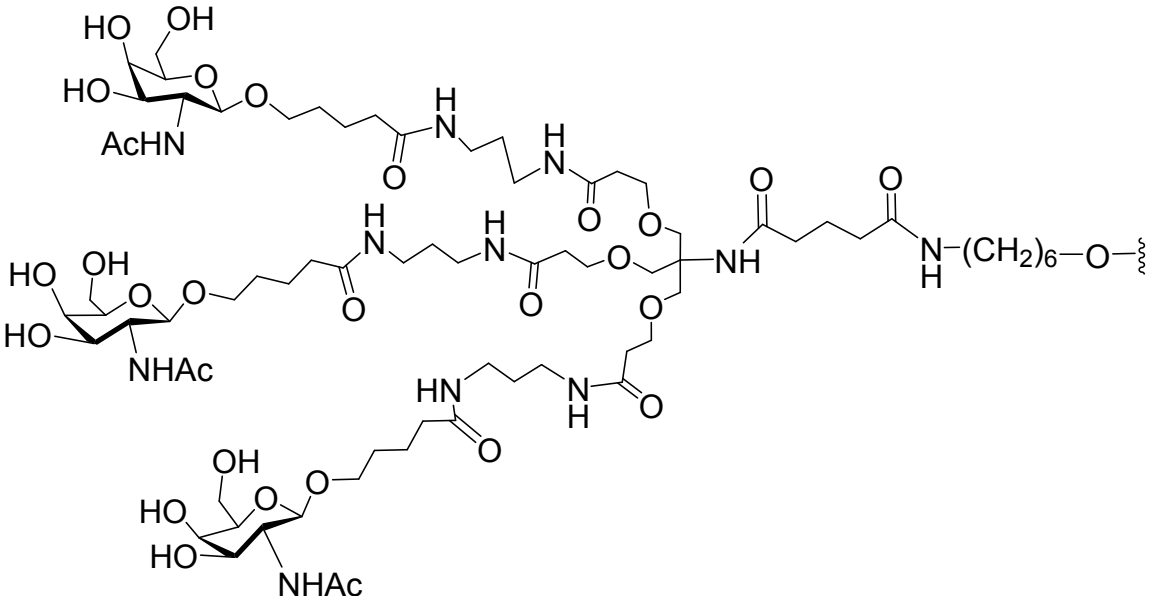
53. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-49, donde el grupo conjugado comprende exactamente tres ligandos.

54. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 50-53, donde cada ligando se selecciona de entre: un polisacárido, polisacárido modificado, manosa, galactosa, un derivado de manosa, un derivado de galactosa, D-manopiranosa, L-Manopiranosa, D-Arabinosa, L-Galactosa, D-xilofuranosa, L-xilofuranosa, D-glucosa, L-glucosa, D-Galactosa, L-Galactosa, α-D-Manofuranosa, β-D-Manofuranosa, α-D-Manopiranosa, β-D-Manopiranosa, α-D-Glucopiranosa, β-D-Glucopiranosa, α-D-Glucofuranosa, β-D-Glucofuranosa, α-D-fructofuranosa, α-D-fructopiranosa, α-D-Galactopiranosa, β-D-Galactopiranosa, α-D-Galactofuranosa, β-D-Galactofuranosa, glucosamina, ácido siálico, α-D-galactosamina, N-Acetilgalactosamina, 2-Amino-3-O-[(R)-1-carboxietil]-2-desoxi-β-D-glucopiranosa, 2-Desoxi-2-metilamino-L-glucopiranosa, 4,6-Didesoxi-4-formamido-2,3-di-O-metil-D-manopiranosa, 2-Desoxi-2-sulfoamino-D-glucopiranosa, ácido N-Glicoloil-α-neuramínico, 5-tio-β-D-glucopiranosa, 2,3,4-tri-O-acetil-1-tio-6-O-tritil-α-D-glucopiranósido de metilo, 4-Tio-β-D-galactopiranosa, 3,4,6,7-tetra-O-acetil-2-desoxi-1,5-ditio-α-D-gluco-heptopiranósido de etilo, 2,5-Anhidro-D-alononitrilo, ribosa,

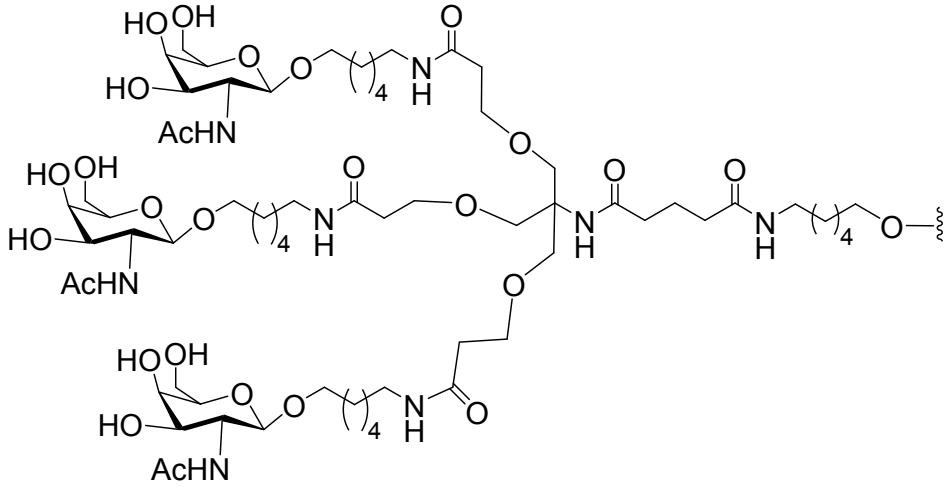
D-ribosa, D-4-tioribosa, L-ribosa, L-4-tioribosa.

55. El compuesto de la reivindicación 54, donde cada ligando es N-acetilgalactosamina.

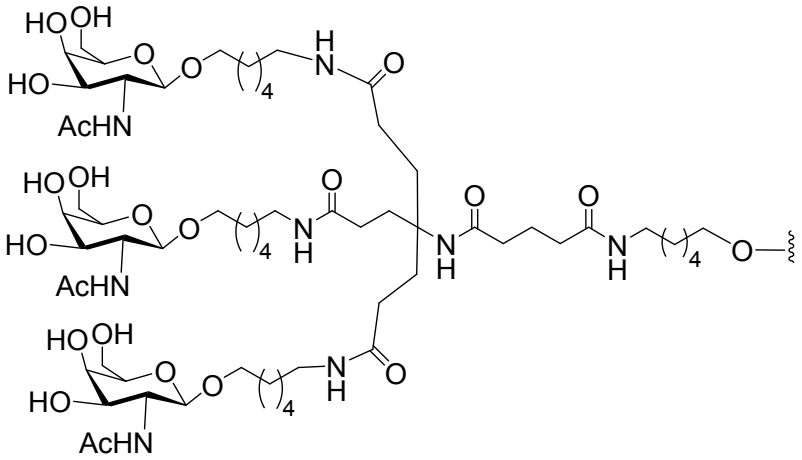
56. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 55, donde el grupo conjugado comprende:



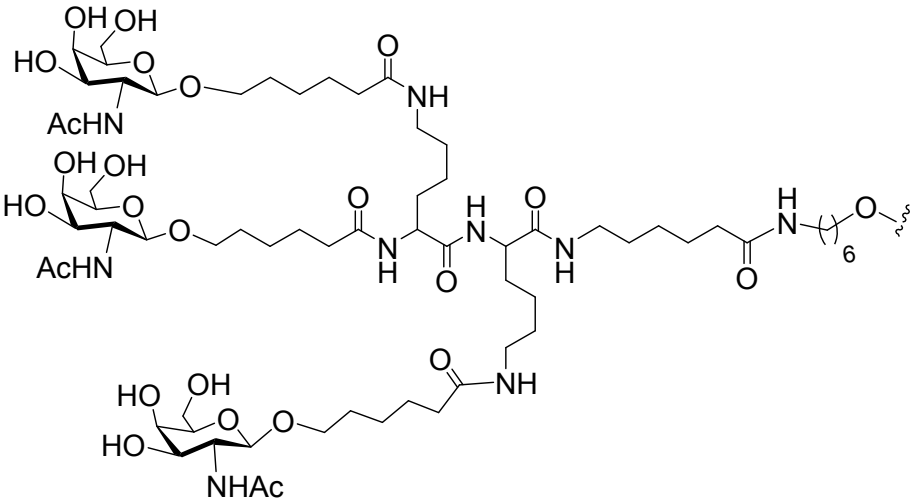
57. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 55, donde el grupo conjugado comprende:



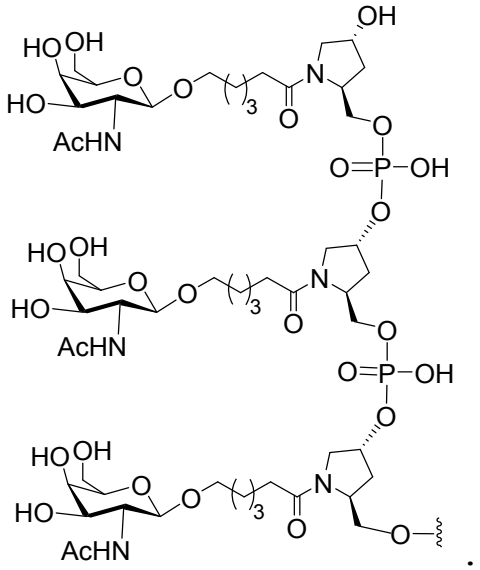
58. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 55, donde el grupo conjugado comprende:



59. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 55, donde el grupo conjugado comprende:

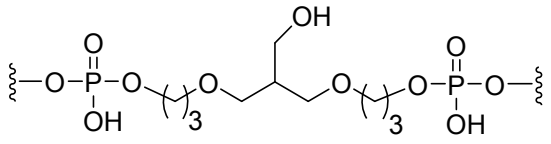
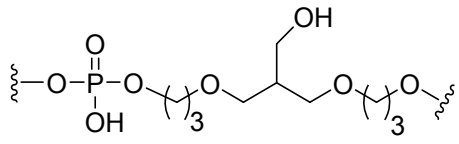


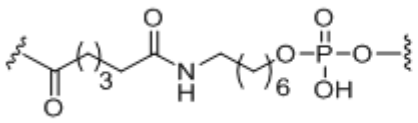
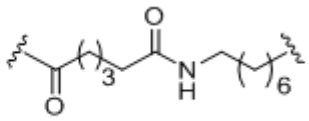
60. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 55, donde el grupo conjugado comprende:

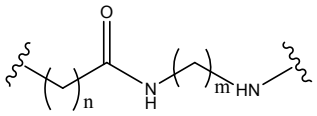
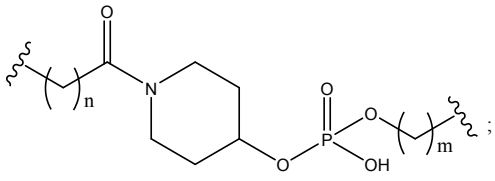


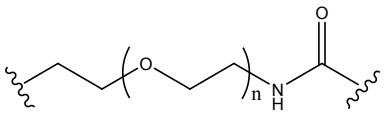
61. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 49 a 60, donde el grupo conjugado comprende al menos un grupo de unión a fósforo o un grupo de unión neutro.

62. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 61, donde el grupo conjugado comprende una estructura que se selecciona de entre:


,



y

.

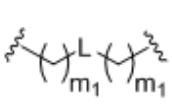
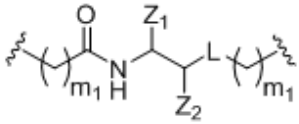

;

;


;

donde n es de 1 a 12; y

donde m es de 1 a 12.

63. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 62, donde el grupo conjugado tiene una ligadura que tiene una estructura que se selecciona de entre:


y


donde L es ya sea un grupo de unión a fósforo o un grupo de

unión neutro;

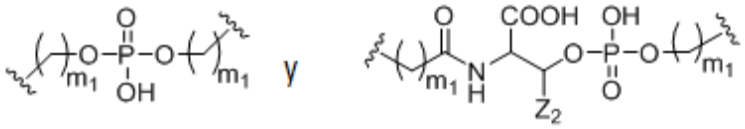
Z_1 es C(=O)O-R_2;

Z_2 es H, alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido;

R_2 es H, alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido; y

cada m_1 es independientemente entre 0 y 20 donde al menos un m_1 es mayor que 0 para cada ligadura.

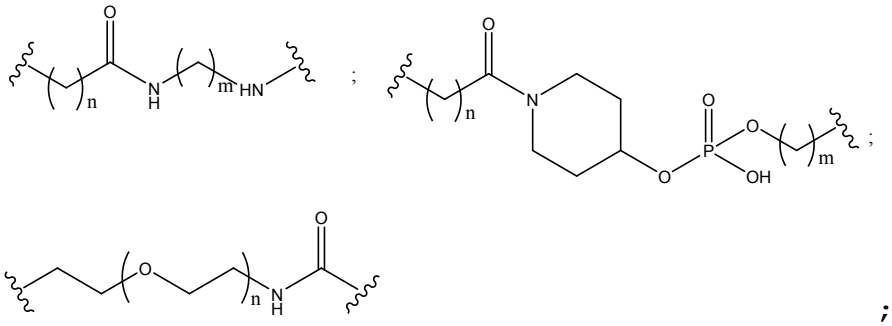
64. El compuesto de la reivindicación 63, donde el grupo conjugado tiene una ligadura que tiene una estructura que se selecciona de entre:



donde Z_2 es H o CH_3; y

Cada m_1 es independientemente entre 0 y 20 donde al menos un m_1 es mayor que 0 para cada ligadura.

65. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 64, donde el grupo conjugado tiene una ligadura que tiene una estructura que se selecciona de entre:



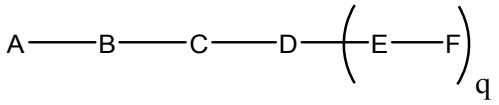
;

donde n es de 1 a 12; y

donde m es de 1 a 12.

66. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65, donde el grupo conjugado está acoplado de manera covalente al oligonucleótido modificado.

67. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 66, donde el compuesto tiene una estructura representada por la fórmula:



donde

A es el oligonucleótido modificado;

B es el resto escindible

C es el enlazador conjugado

D es el grupo ramificado

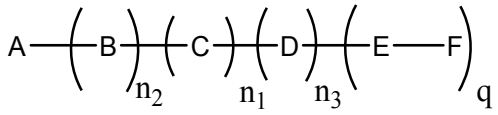
cada E es una ligadura;

cada F es un ligando; y

q es un entero entre 1 y 5.

68. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a

66, donde el compuesto tiene una estructura representada por la fórmula:



donde:

A es el oligonucleótido modificado;

B es el resto escindible

C es el enlazador conjugado

D es el grupo ramificado

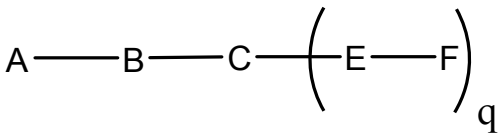
cada E es una ligadura;

cada F es un ligando;

cada n es independientemente 0 o 1; y

q es un entero entre 1 y 5.

69. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 66, donde el compuesto tiene una estructura representada por la fórmula:



donde

A es el oligonucleótido modificado;

B es el resto escindible;

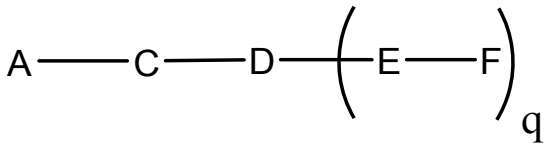
C es el enlazador conjugado;

cada E es una ligadura;

cada F es un ligando; y

q es un entero entre 1 y 5.

70. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 66, donde el compuesto tiene una estructura representada por la fórmula:



donde

A es el oligonucleótido modificado;

C es el enlazador conjugado;

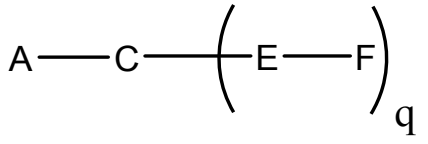
D es el grupo ramificado;

cada E es una ligadura;

cada F es un ligando; y

q es un entero entre 1 y 5.

71. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 66, donde el compuesto tiene una estructura representada por la fórmula:



donde

A es el oligonucleótido modificado;

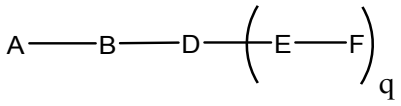
C es el enlazador conjugado;

cada E es una ligadura;

cada F es un ligando; y

q es un entero entre 1 y 5.

72. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 66, donde el compuesto tiene una estructura representada por la fórmula:



donde

A es el oligonucleótido modificado;

B es el resto escindible;

D es el grupo ramificado;

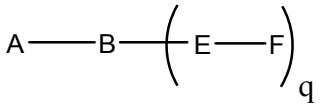
cada E es una ligadura;

cada F es un ligando; y

q es un entero entre 1 y 5.

73. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 66, donde el compuesto tiene una estructura representada por

la fórmula:



donde

A es el oligonucleótido modificado;

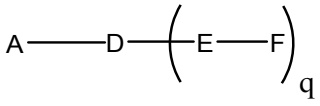
B es el resto escindible;

cada E es una ligadura;

cada F es un ligando; y

q es un entero entre 1 y 5.

74. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 66, donde el compuesto tiene una estructura representada por la fórmula:



donde

A es el oligonucleótido modificado;

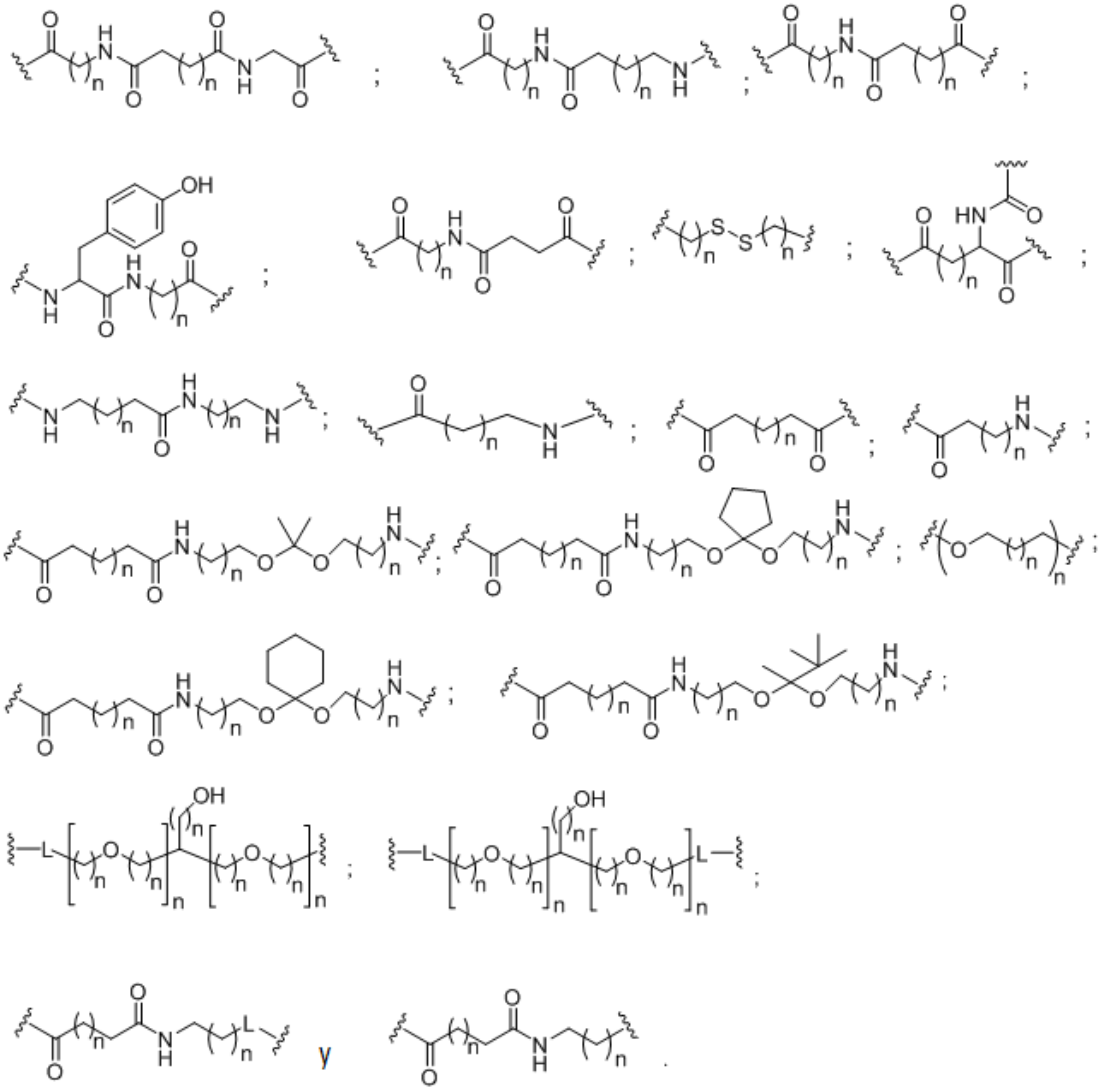
D es el grupo ramificado;

cada E es una ligadura;

cada F es un ligando; y

q es un entero entre 1 y 5.

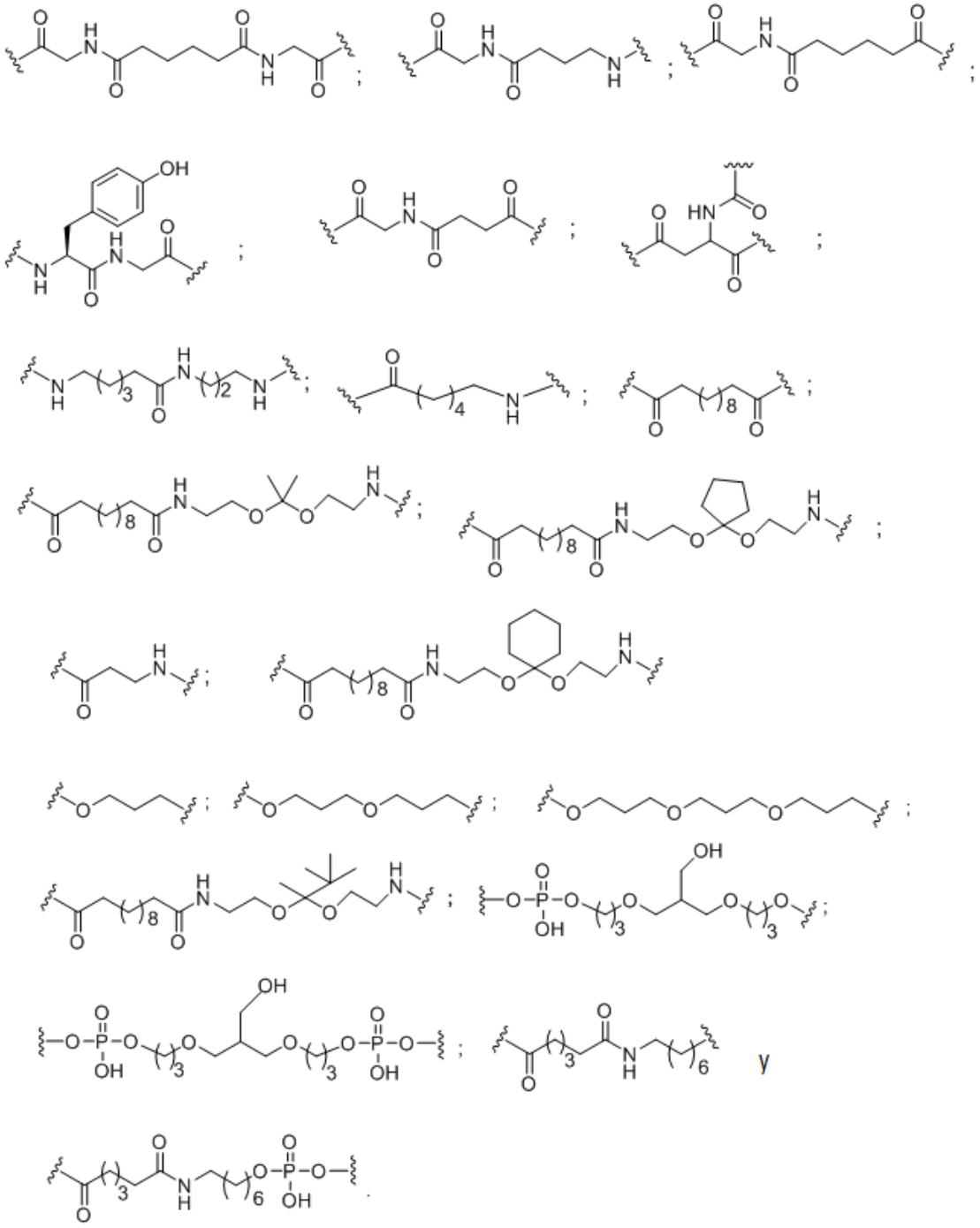
75. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 74, donde el enlazador conjugado tiene una estructura que se selecciona de entre:



donde cada L es, independientemente, un grupo de unión a fósforo o un grupo de unión neutro; y

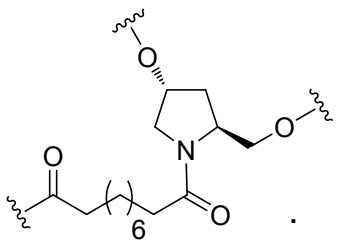
cada n es, independientemente, de 1 a 20.

76. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 74, donde el enlazador conjugado tiene una estructura que se selecciona de entre:

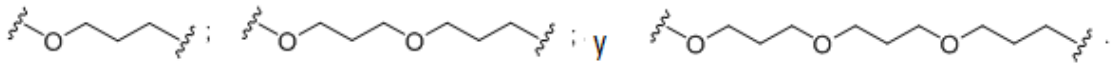


y

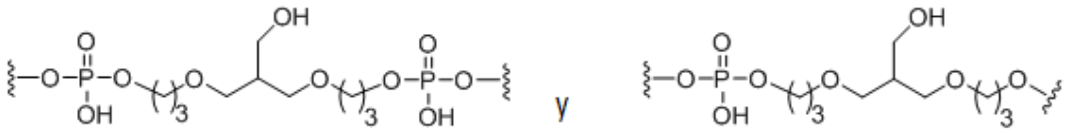
77. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 74, donde el enlazador conjugado tiene la siguiente estructura:



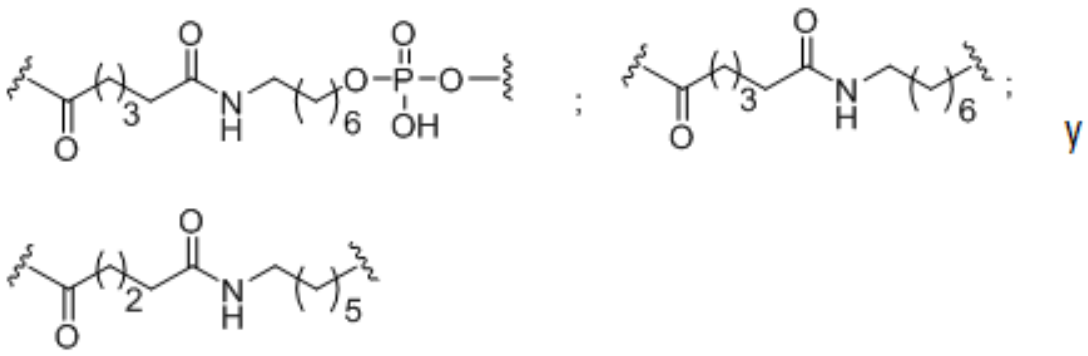
78. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 74, donde el enlazador conjugado tiene una estructura que se selecciona de entre:



79. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 74, donde el enlazador conjugado tiene una estructura que se selecciona de entre:



80. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 74, donde el enlazador conjugado tiene una estructura que se selecciona de entre:



81. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 80, donde el enlazador conjugado comprende una pirrolidina.

82. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 80, donde el enlazador conjugado no comprende una pirrolidina.

83. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 82, donde el enlazador conjugado comprende PEG.

84. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 83, donde el enlazador conjugado comprende una amida.

85. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 84, donde el enlazador conjugado comprende al menos dos

amidas.

86. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 83, donde el enlazador conjugado no comprende una amida.

87. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 86, donde el enlazador conjugado comprende una poliamida.

88. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 87, donde el enlazador conjugado comprende una amina.

89. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 88, donde el enlazador conjugado comprende uno o más enlaces disulfuro.

90. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 89, donde el enlazador conjugado comprende un resto de unión a proteínas.

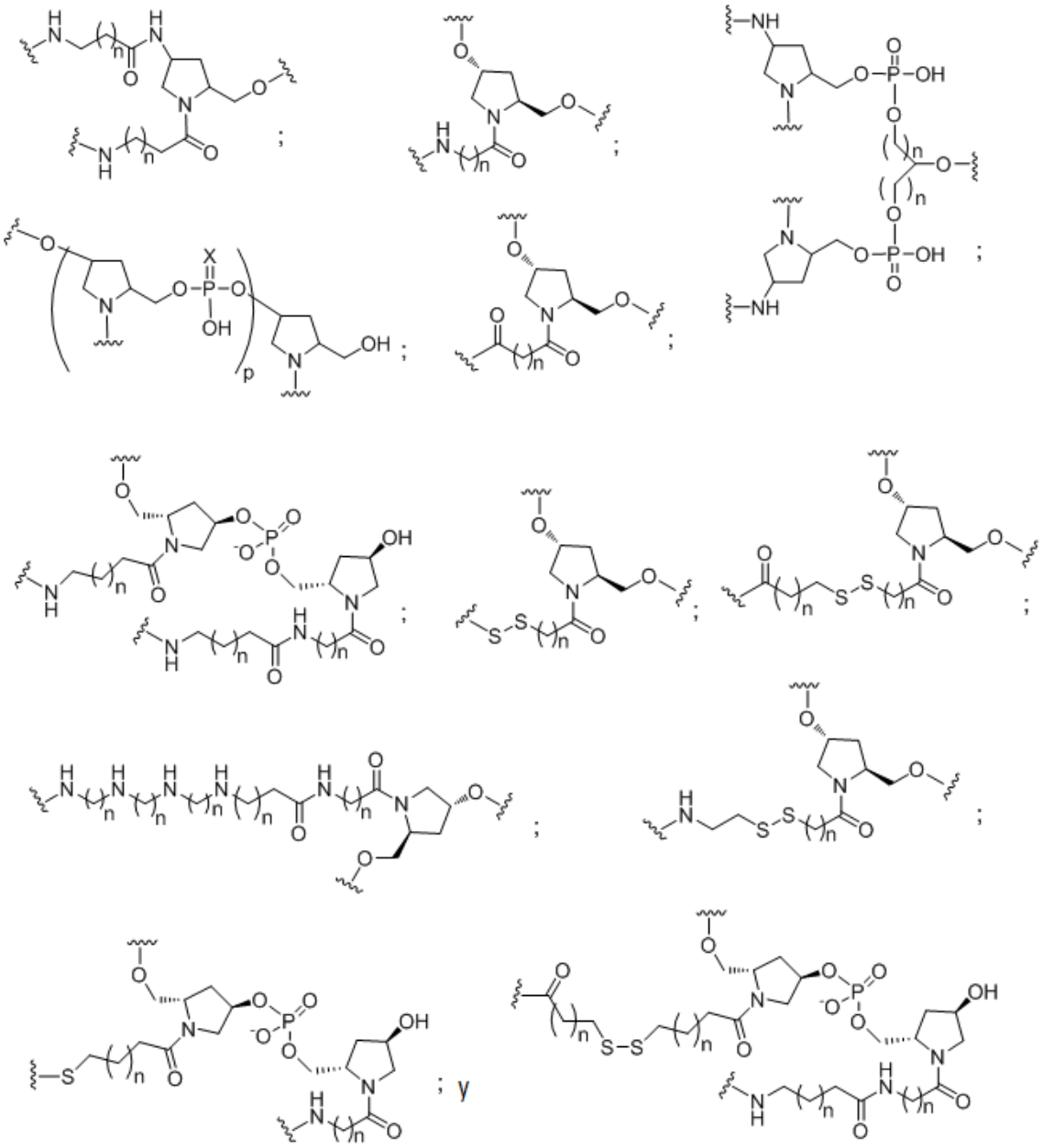
91. El compuesto de la reivindicación 90, donde el resto de unión a proteínas comprende un lípido.

92. El compuesto de la reivindicación 90, donde el resto de unión a proteínas se selecciona de entre: colesterol, ácido

cólico, ácido adamantano acético, ácido 1-pireno butírico, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritil o fenoxazina), una vitamina (por ejemplo, folato, vitamina A, vitamina E, biotina, piridoxal), un péptido, un carbohidrato (por ejemplo, monosacárido, disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido, polisacárido), un componente endosomolítico, un esteroide (por ejemplo, uvaol, hecigenina, diosgenina), un terpeno (por ejemplo, triterpeno, por ejemplo, sarsasapogenina, friedelina, ácido litocólico derivatizado epifriedelanol) o un lípido catiónico.

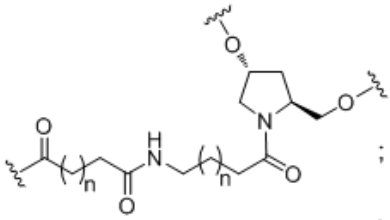
93. El compuesto de la reivindicación 90, donde el resto de unión a proteínas se selecciona de entre: un colesterol, ácido cólico, vitamina E, adamantano, 1-pentafluoropropilo o ácido graso saturado o insaturado de cadena larga C16 a C22.

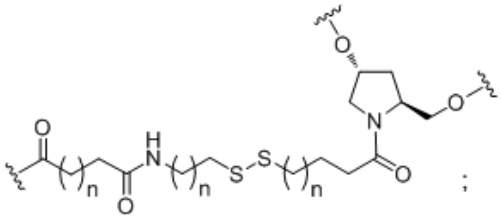
94. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 93, donde el enlazador conjugado tiene una estructura que se selecciona de entre:

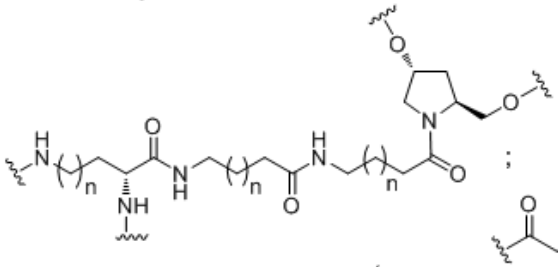


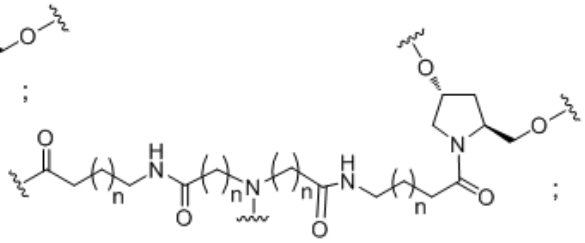
donde cada n es independientemente de 1 a 20; y p es de 1 a 6.

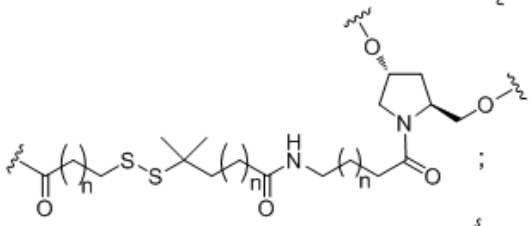
95. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 94, donde el enlazador conjugado tiene una estructura que se selecciona de entre:

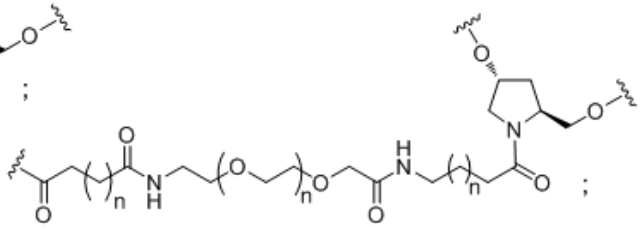

;

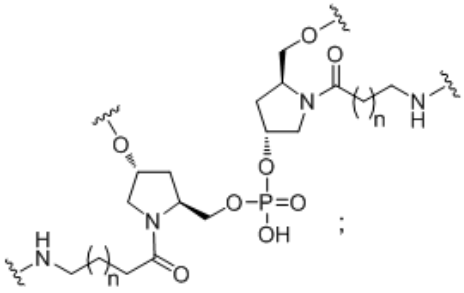

;

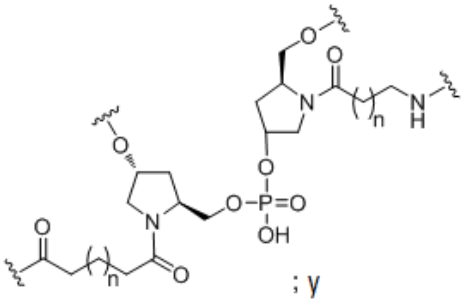

;

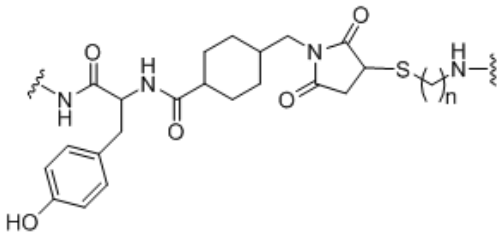

;


;


;

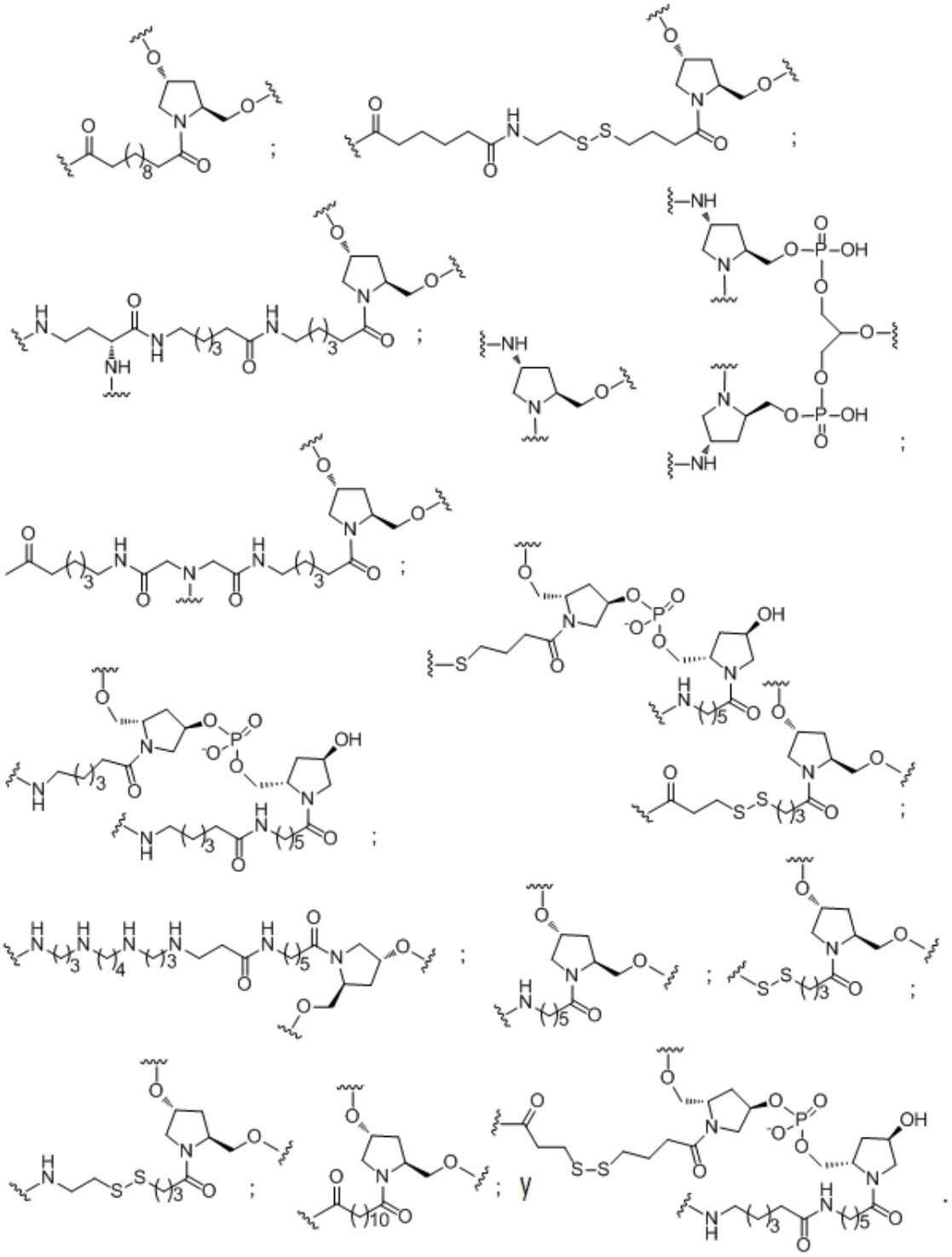

;


; y

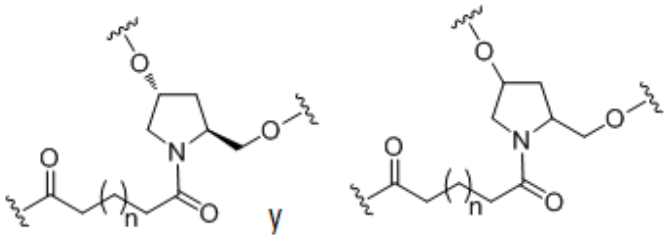


donde cada n es, independientemente, de 1 a 20.

96. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 94, donde el enlazador conjugado tiene una estructura que se

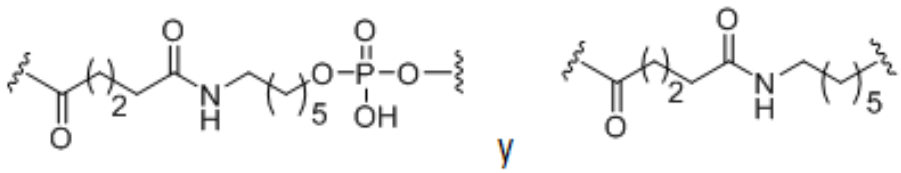


97. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 94, donde el enlazador conjugado tiene una estructura que se selecciona de entre:

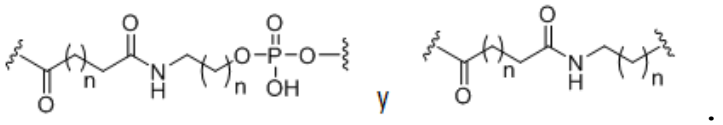


donde n es de 1 a 20.

98. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 94, donde el enlazador conjugado tiene una estructura que se selecciona de entre:



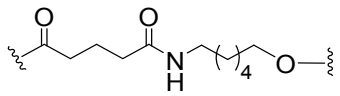
99. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 94, donde el enlazador conjugado tiene una estructura que se selecciona de entre:



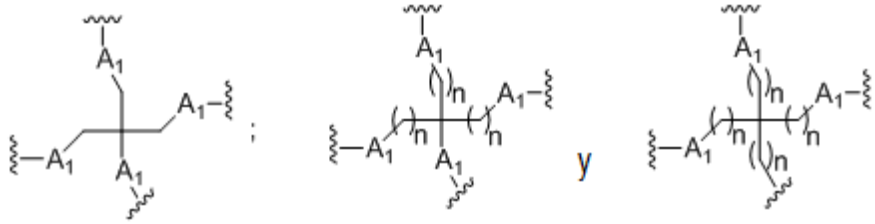
;

donde cada n es, independientemente, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

100. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 94, donde el enlazador conjugado tiene la siguiente estructura:

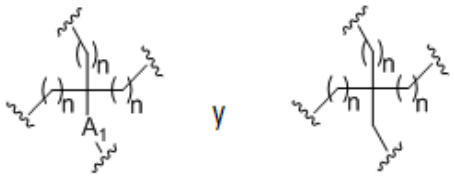


101. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 100, donde el grupo ramificado tiene una de las siguientes estructuras:



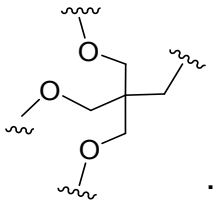
donde cada A_1 es, independientemente, O, S, C=O o NH; y cada n es, independientemente, de 1 a 20.

102. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 100, donde el grupo ramificado tiene una de las siguientes estructuras:



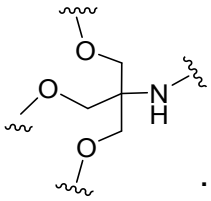
donde cada A_1 es, independientemente, O, S, C=O o NH; y cada n es, independientemente, de 1 a 20.

103. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 100, donde el grupo ramificado tiene la siguiente estructura:



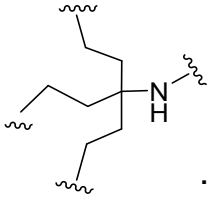
.

104. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 100, donde el grupo ramificado tiene la siguiente estructura:



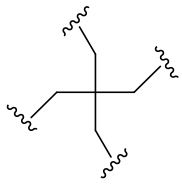
.

105. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 100, donde el grupo ramificado tiene la siguiente estructura:



.

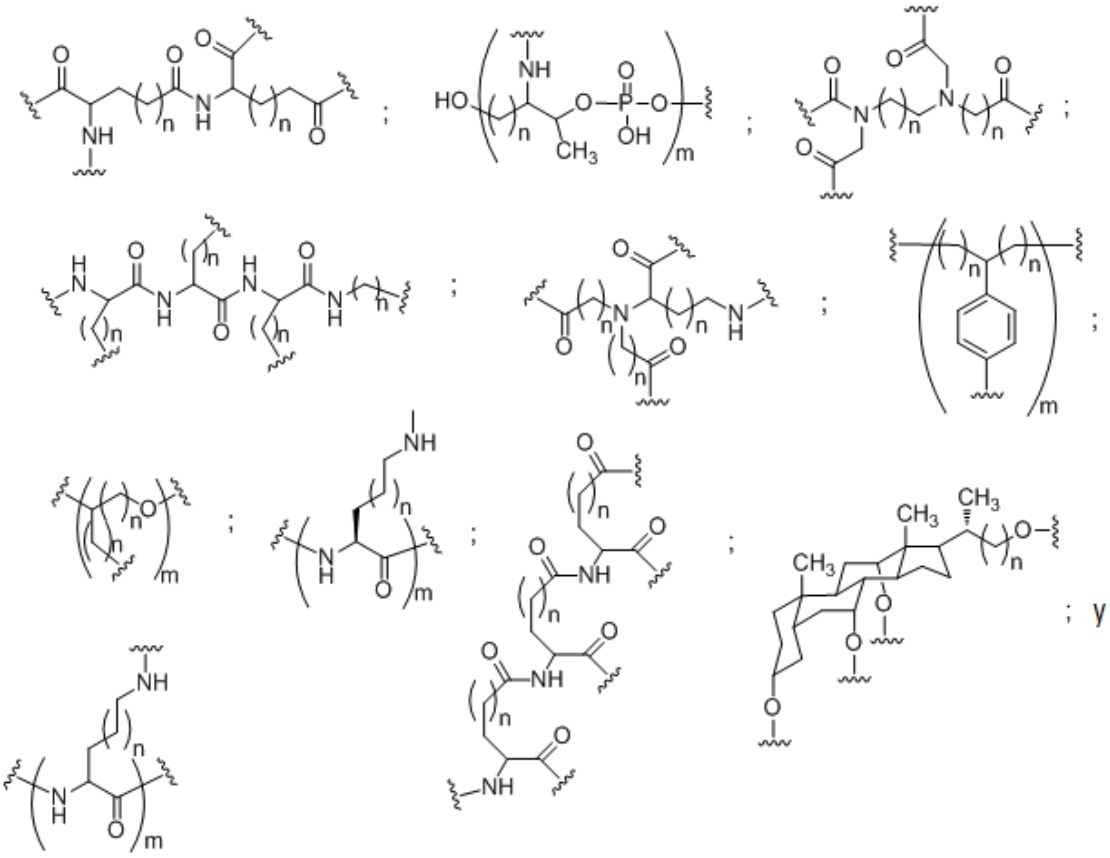
106. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 100, donde el grupo ramificado tiene la siguiente estructura:



.

107. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 100, donde el grupo ramificado comprende un éter.

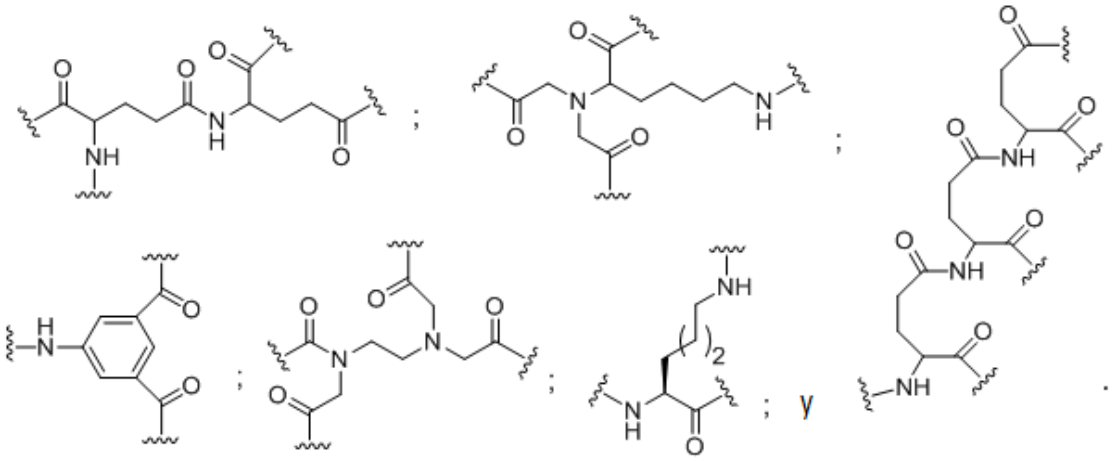
108. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 100, donde el grupo ramificado tiene la siguiente estructura:



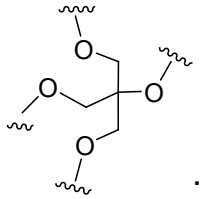
cada n es, independientemente, de 1 a 20; y

m es de 2 a 6.

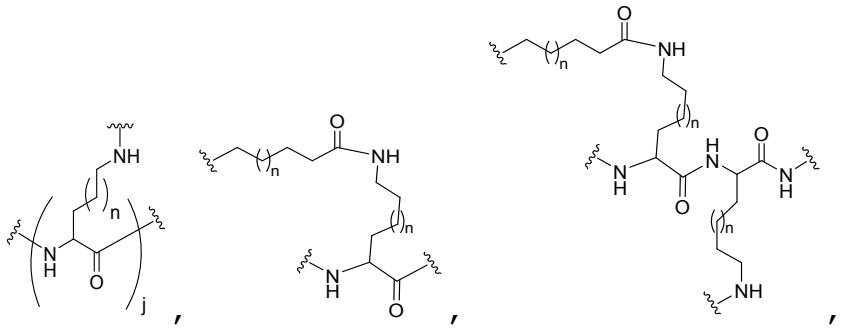
109. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 100, donde el grupo ramificado tiene la siguiente estructura:

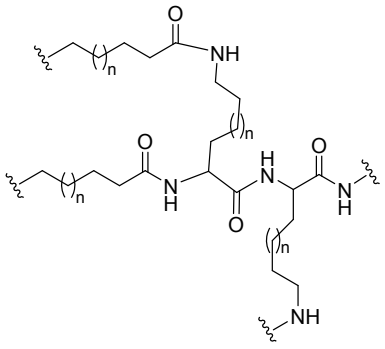
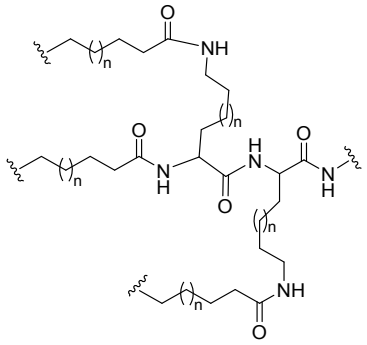


110. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 100, donde el grupo ramificado tiene la siguiente estructura:



111. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 100, donde el grupo ramificado comprende:

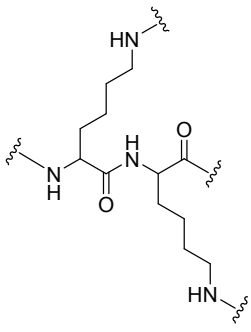
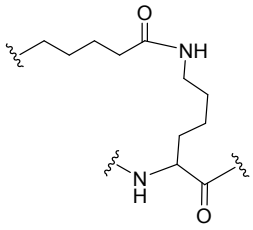
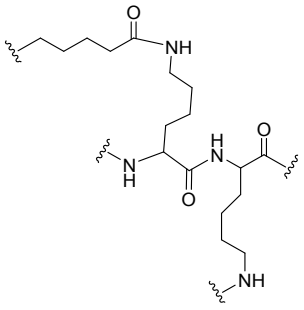


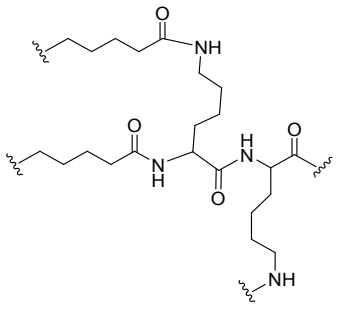
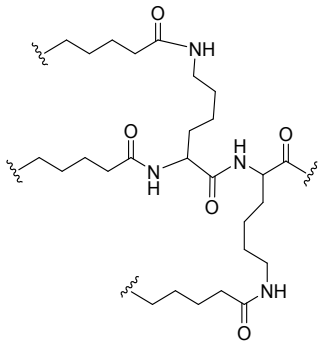

, o

;

donde cada j es un entero de 1 a 3; y

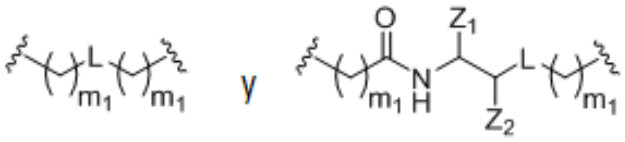
donde cada n es un entero de 1 a 20.

112. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 100, donde el grupo ramificado comprende:


,

,

,


, o

.

113. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a



donde L se selecciona de un grupo de unión a fósforo y un grupo de unión neutro;

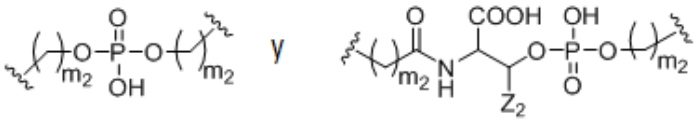
Z_1 es C(=O)O-R_2;

Z_2 es H, alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido;

R_2 es H, alquilo C_1-C_6 o alquilo C_1-C_6 sustituido; y

Cada m_1 es independientemente entre 0 y 20 donde al menos un m_1 es mayor que 0 para cada ligadura.

114. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 112, donde cada ligadura se selecciona de entre:

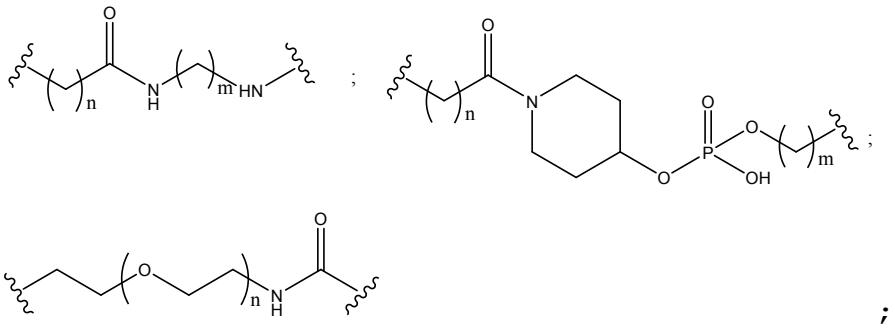


donde Z_2 es H o CH_3; y

cada m_2 es independientemente entre 0 y 20 donde al menos un m_2 es mayor que 0 para cada ligadura.

115. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a

112, donde cada ligadura se selecciona de entre:



donde n es de 1 a 12; y

donde m es de 1 a 12.

116. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 112, donde al menos una ligadura comprende etilenglicol.

117. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 116, donde al menos una ligadura comprende una amida.

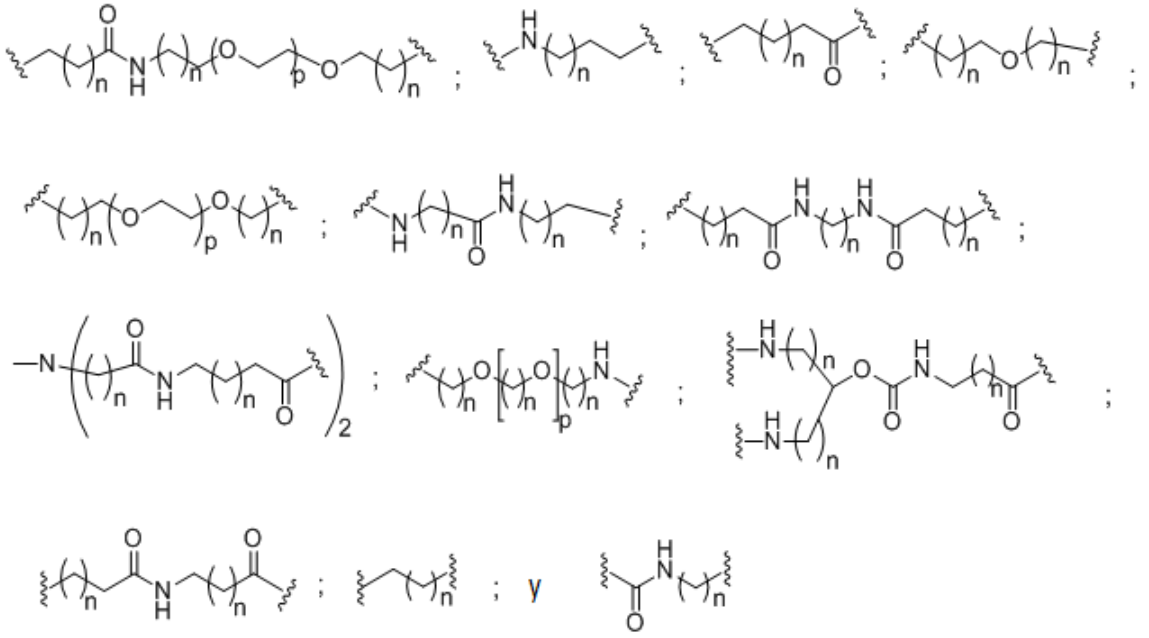
118. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 117, donde al menos una ligadura comprende una poliamida.

119. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 118, donde al menos una ligadura comprende una amina.

120. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 119, donde al menos dos ligaduras son diferentes entre sí.

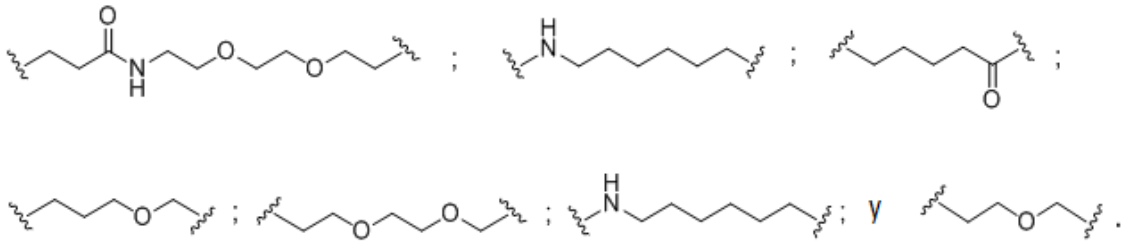
121. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a120, donde todas las ligaduras son iguales entre sí.

122. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 121, donde cada ligadura se selecciona de entre:

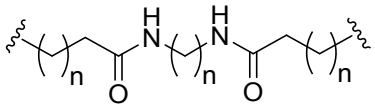


donde cada n es, independientemente, de 1 a 20; y cada p es de 1 a alrededor de 6.

123. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 122, donde cada ligadura se selecciona de entre:

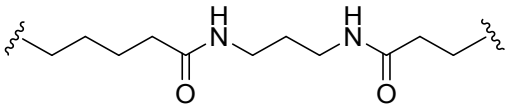


124. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 123, donde cada ligadura tiene la siguiente estructura:

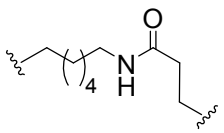
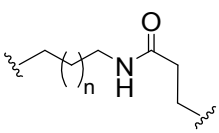


donde cada n es, independientemente, de 1 a 20.

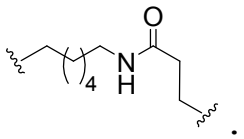
125. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 124, donde cada ligadura tiene la siguiente estructura:



126. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 125, donde la ligadura tiene una estructura que se selecciona de entre:

 , o  ; donde cada n es, independientemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

127. El compuesto de la reivindicación 126, donde la ligadura tiene la estructura:



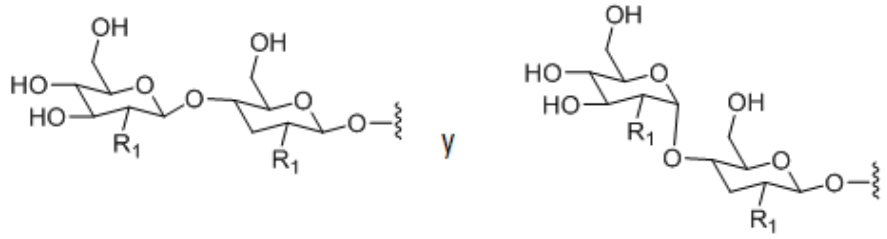
.

128. El compuesto de la reivindicación 126, donde n es 3.

129. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 128, donde el ligando es galactosa.

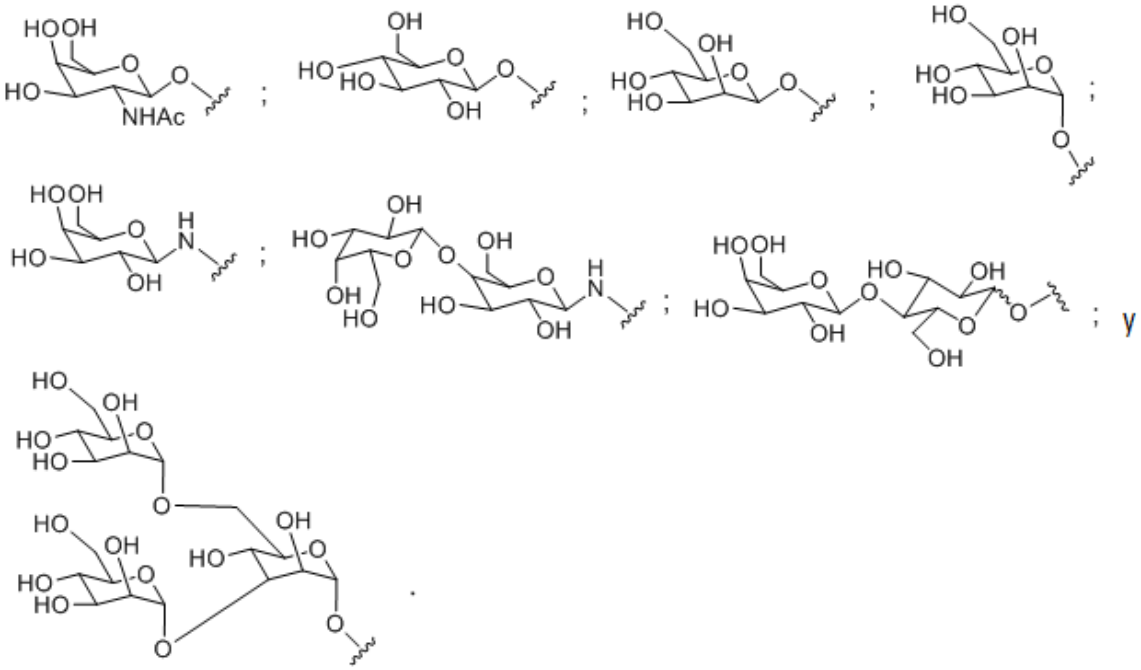
130. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 128, donde el ligando es manosa-6-fosfato.

131. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 128, donde cada ligando se selecciona de entre:

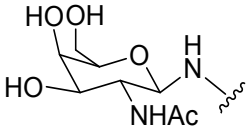


donde cada R_1 se selecciona de OH y NHCOOH.

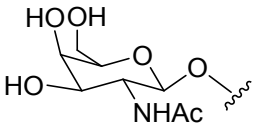
132. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 128, donde cada ligando se selecciona de entre:



133. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 128, donde cada ligando tiene la siguiente estructura:

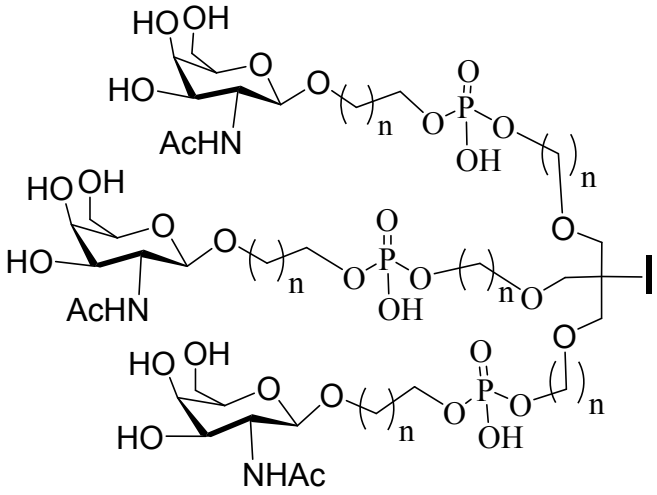


134. El compuesto conjugado antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 124 a 127, donde cada ligando tiene la siguiente estructura:



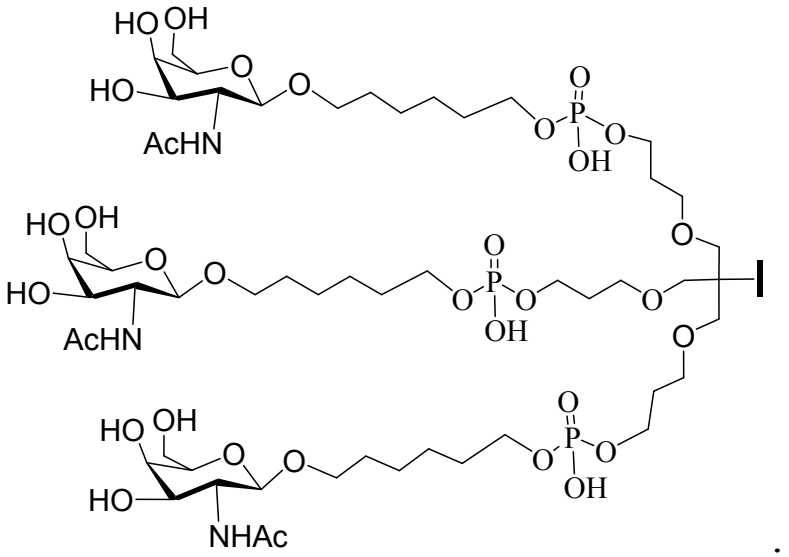
135. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 134, donde el grupo conjugado comprende un resto dirigido a células.

136. El compuesto de la reivindicación 135, donde el grupo conjugado comprende un resto dirigido a células que tiene la siguiente estructura:

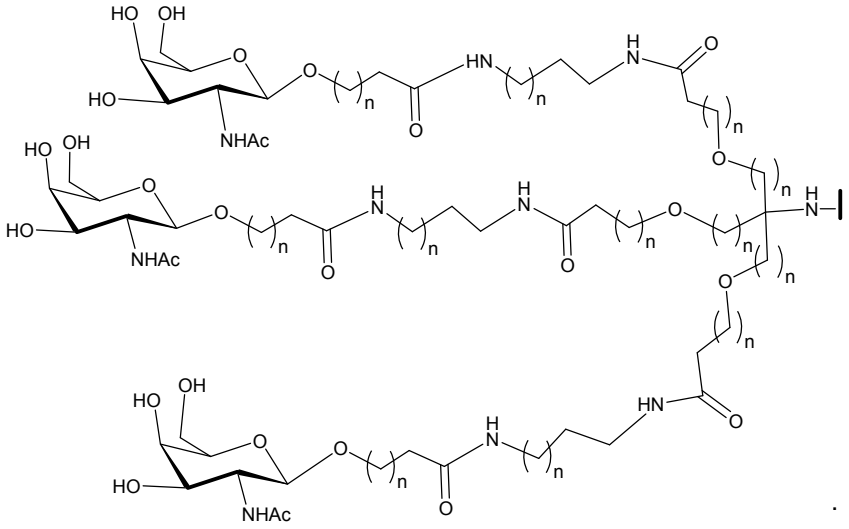


donde cada n es, independientemente, de 1 a 20.

137. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células tiene la siguiente estructura:



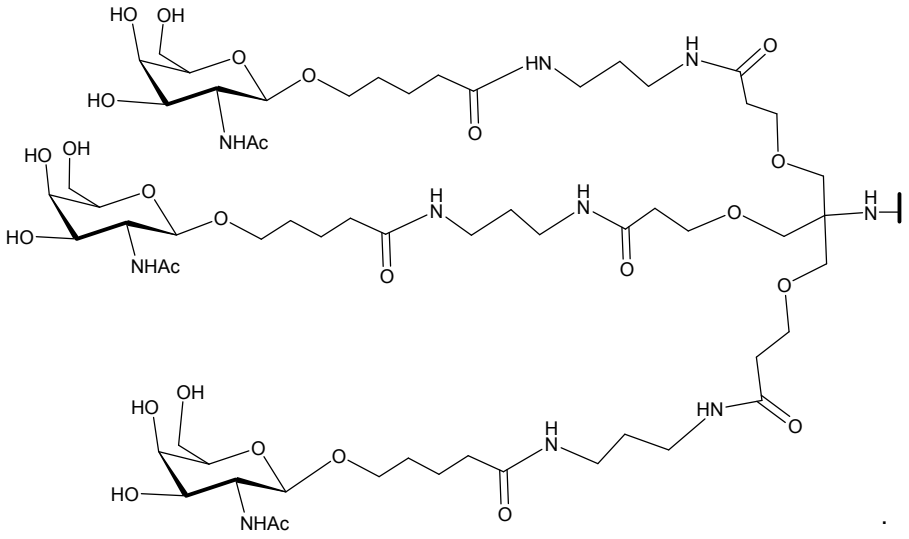
138. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células tiene la siguiente estructura:



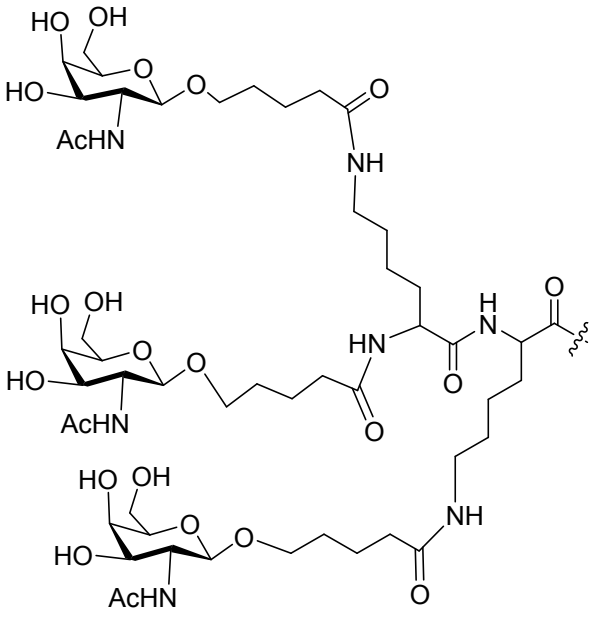
donde cada n es, independientemente, de 1 a 20.

139. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto

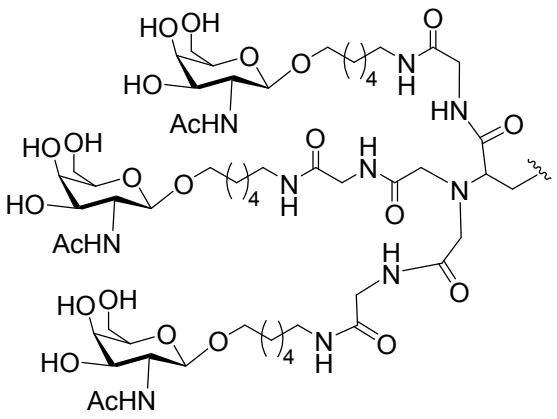
dirigido a células tiene la siguiente estructura:



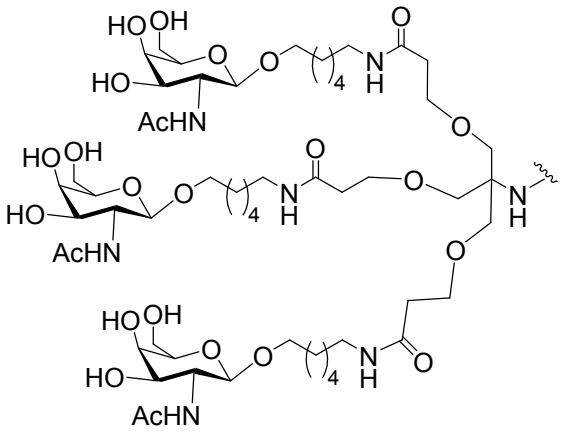
140. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células comprende:



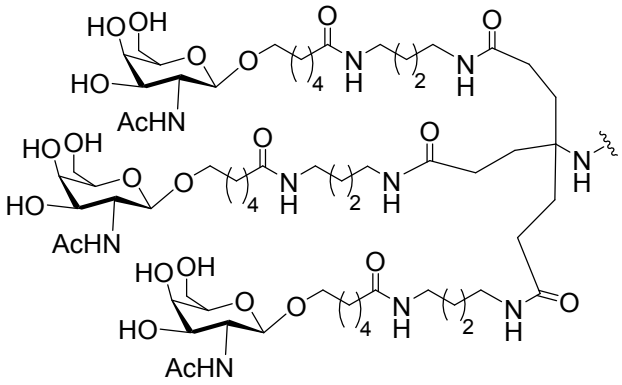
141. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células comprende:



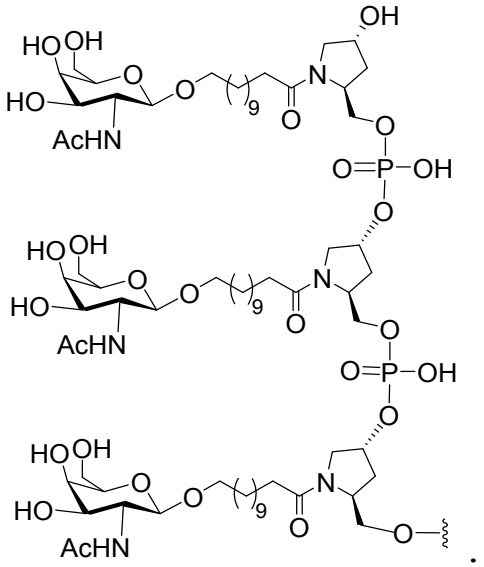
142. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células tiene la siguiente estructura:



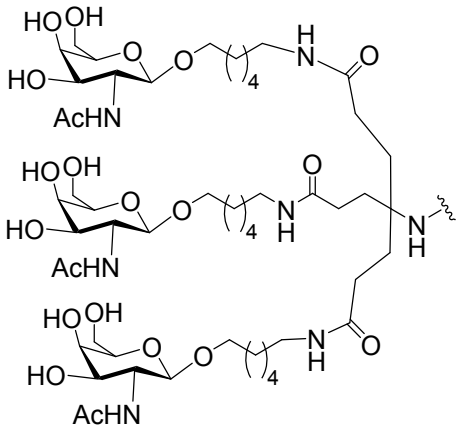
143. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células tiene la siguiente estructura:



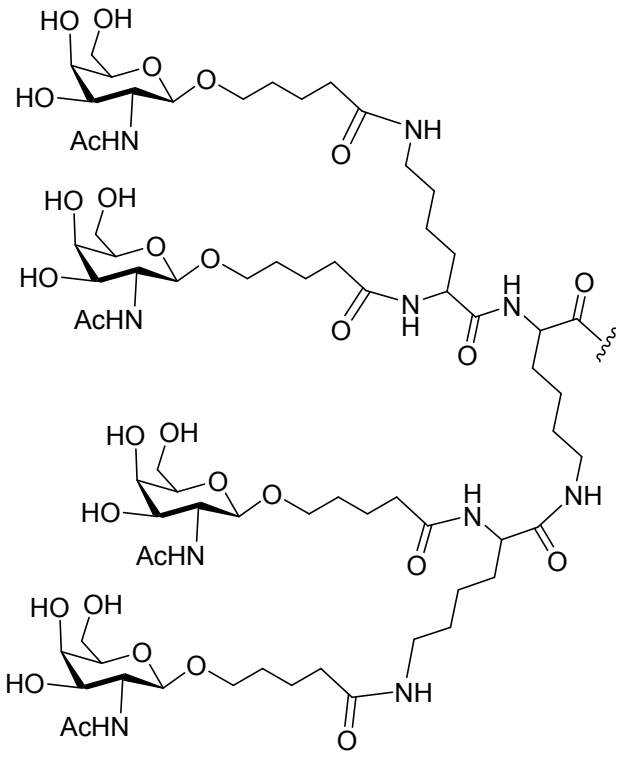
144. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células comprende:



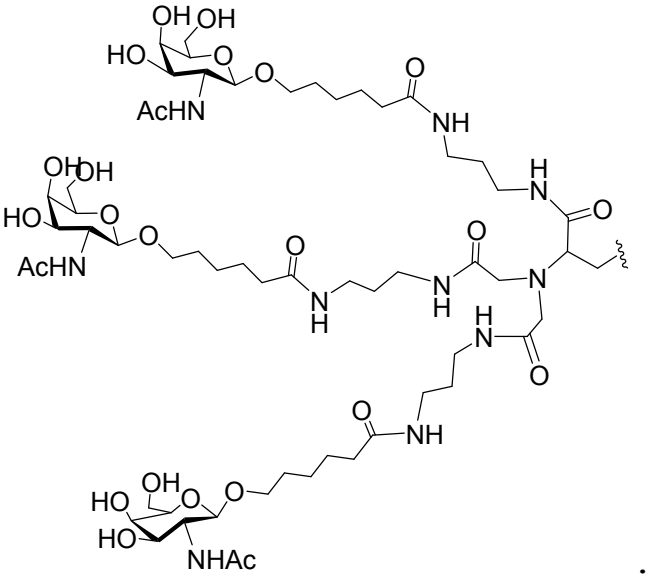
145. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células tiene la siguiente estructura:



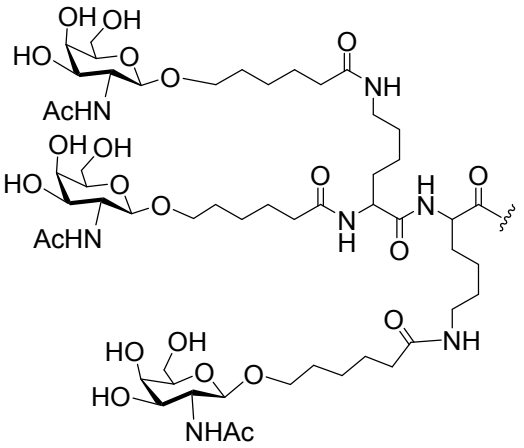
146. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células comprende:



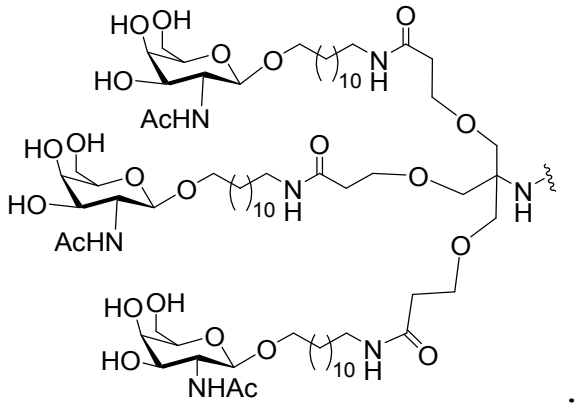
147. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células comprende:



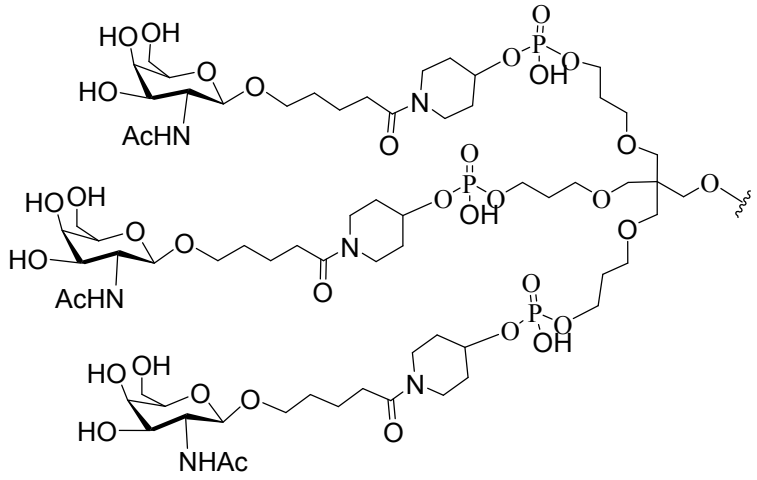
148. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células comprende:



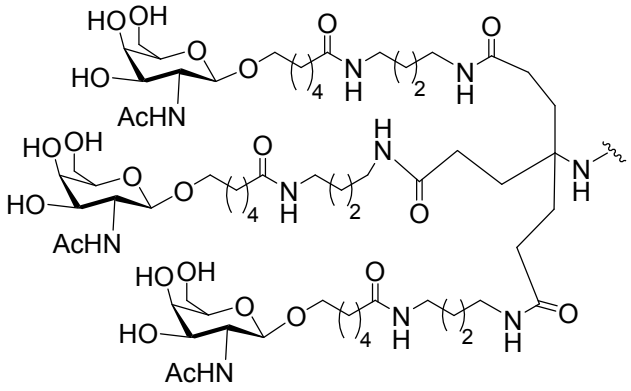
149. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células tiene la siguiente estructura:



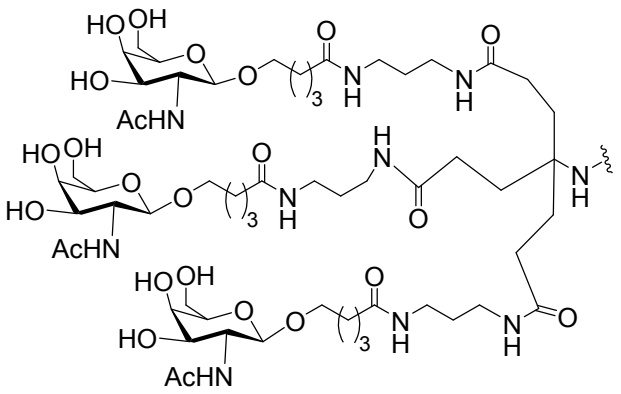
150. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células tiene la siguiente estructura:



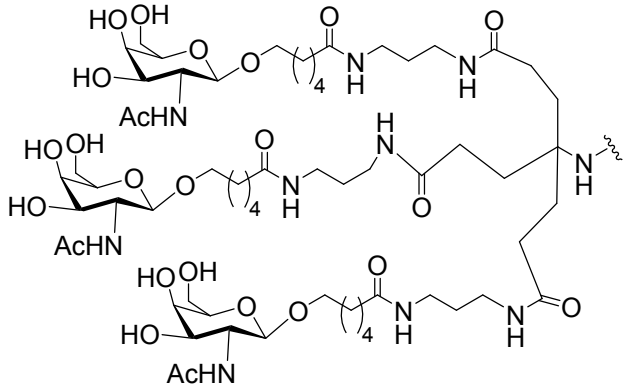
151. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células tiene la siguiente estructura:



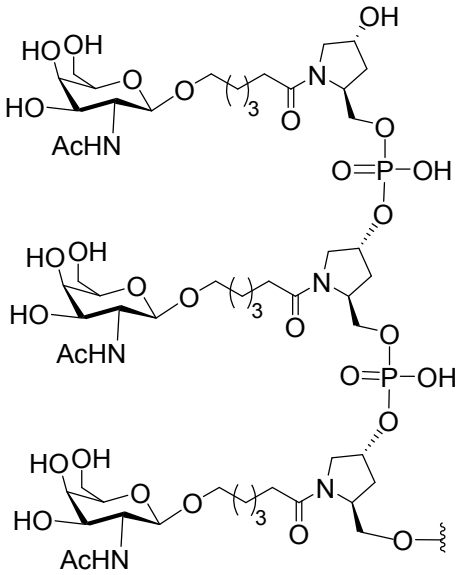
152. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células tiene la siguiente estructura:



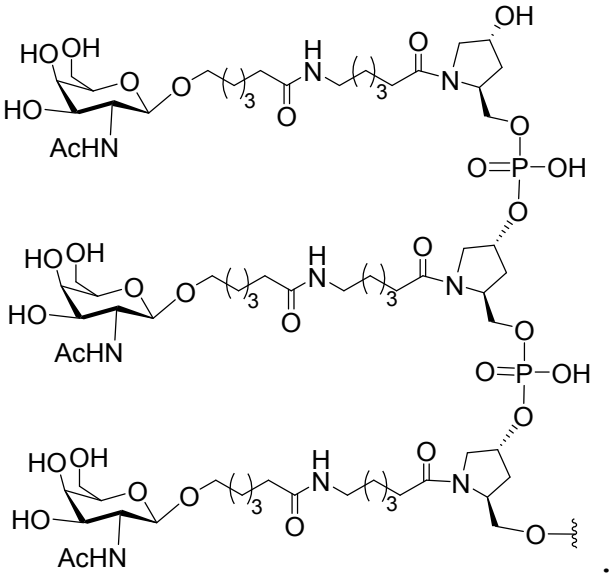
153. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células tiene la siguiente estructura:



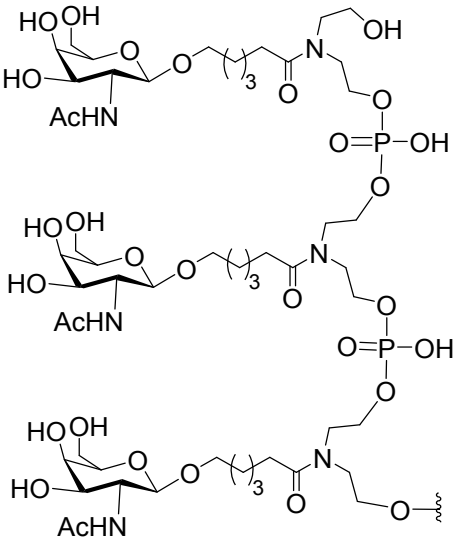
154. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células comprende:



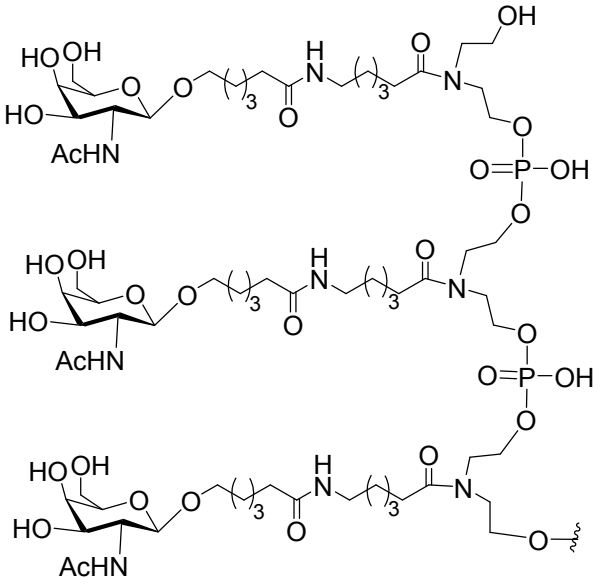
155. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células comprende:



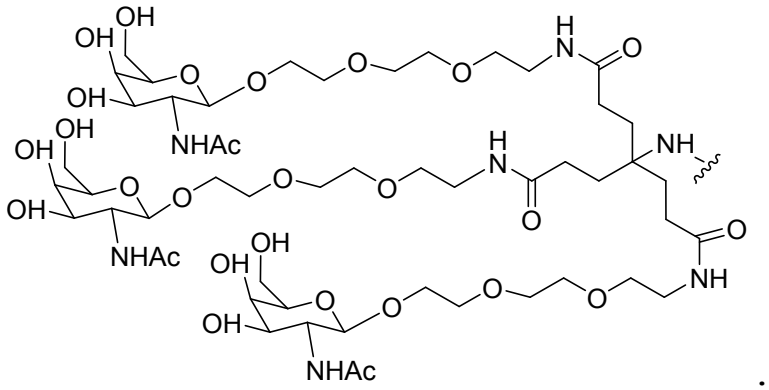
156. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células comprende :



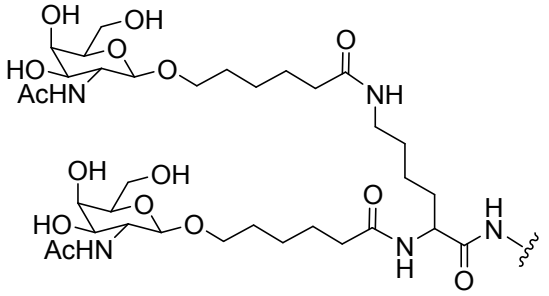
157. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células comprende :



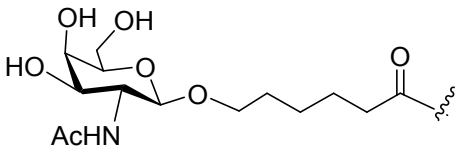
158. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células tiene la siguiente estructura:



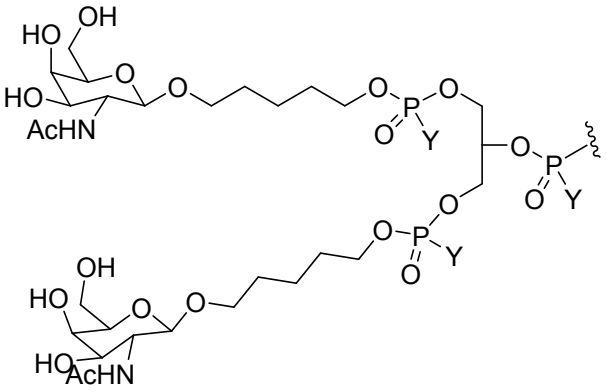
159. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células comprende:



160. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células tiene la siguiente estructura:

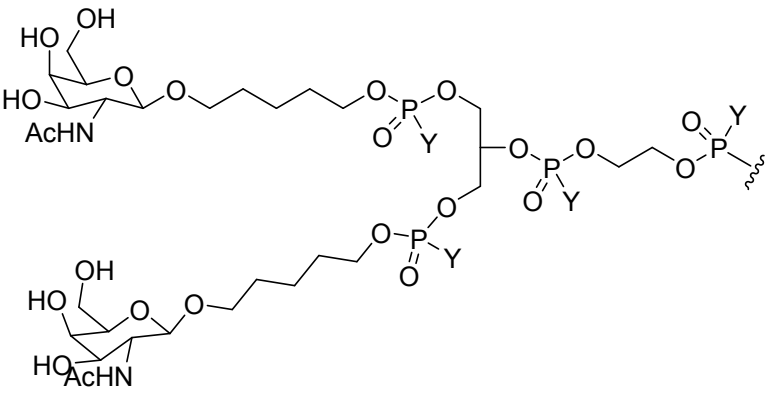


161. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células comprende:



donde cada Y se selecciona de O, S, un alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido, amino, amino sustituido, azido, alquenilo o alquinilo.

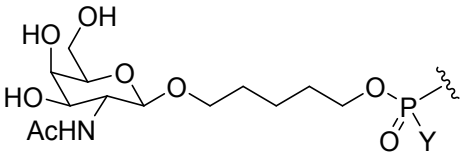
162. El compuesto de la reivindicación 135, donde el grupo conjugado comprende:



;

donde cada Y se selecciona de O, S, un alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido, amino, amino sustituido, azido, alquenilo o alquinilo.

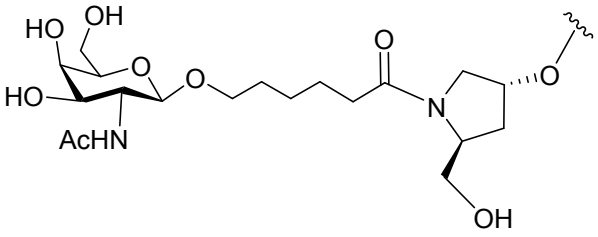
163. El compuesto de la reivindicación 135, donde el resto dirigido a células tiene la siguiente estructura:



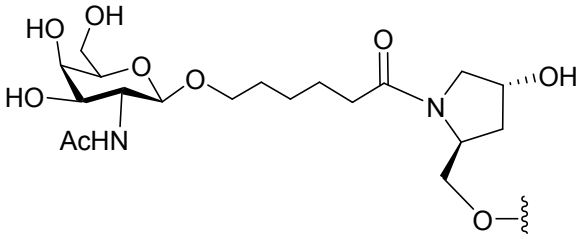
;

donde cada Y se selecciona de O, S, un alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido, amino, amino sustituido, azido, alquenilo o alquinilo.

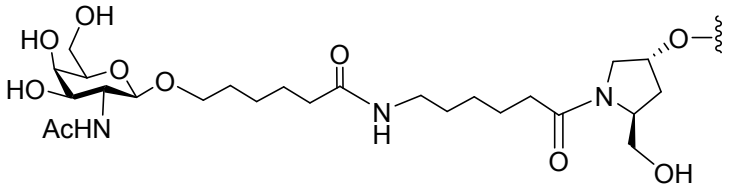
164. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 163, donde el grupo conjugado comprende:



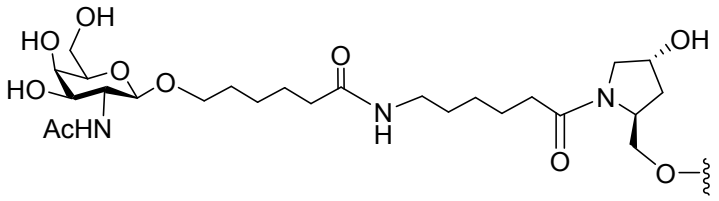
165. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 164, donde el grupo conjugado comprende:



166. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 164, donde el grupo conjugado comprende:



167. El compuesto de la reivindicación 166, donde el grupo conjugado comprende:



168. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 167, donde el grupo conjugado comprende un resto escindible seleccionado de entre: un fosfodiéster, una amida o un éster.

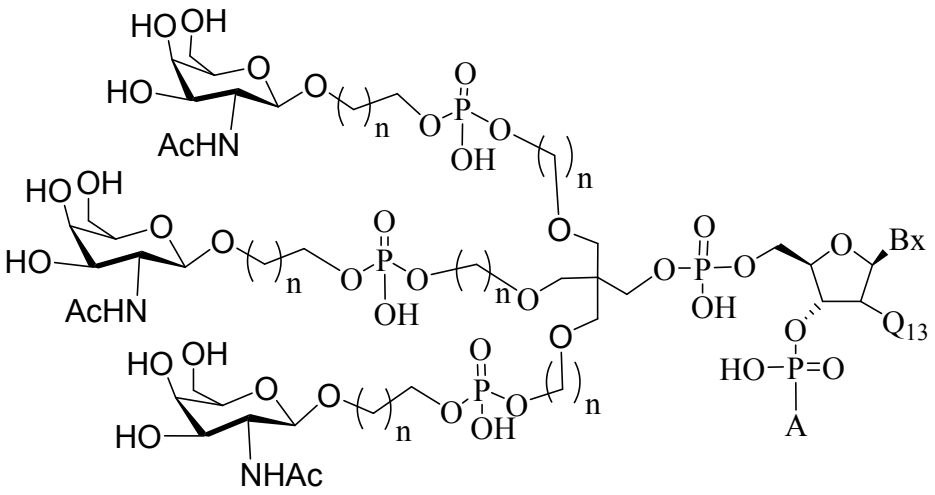
169. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 168, donde el grupo conjugado comprende un resto escindible de fosfodiéster.

170. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 169, donde el grupo conjugado no comprende un resto escindible, y donde el grupo conjugado comprende una unión fosforotioato entre el grupo conjugado y el oligonucleótido.

171. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 170, donde el grupo conjugado comprende un resto escindible de amida.

172. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 171, donde el grupo conjugado comprende un resto escindible de éster.

173. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 172, donde el compuesto tiene la siguiente estructura:



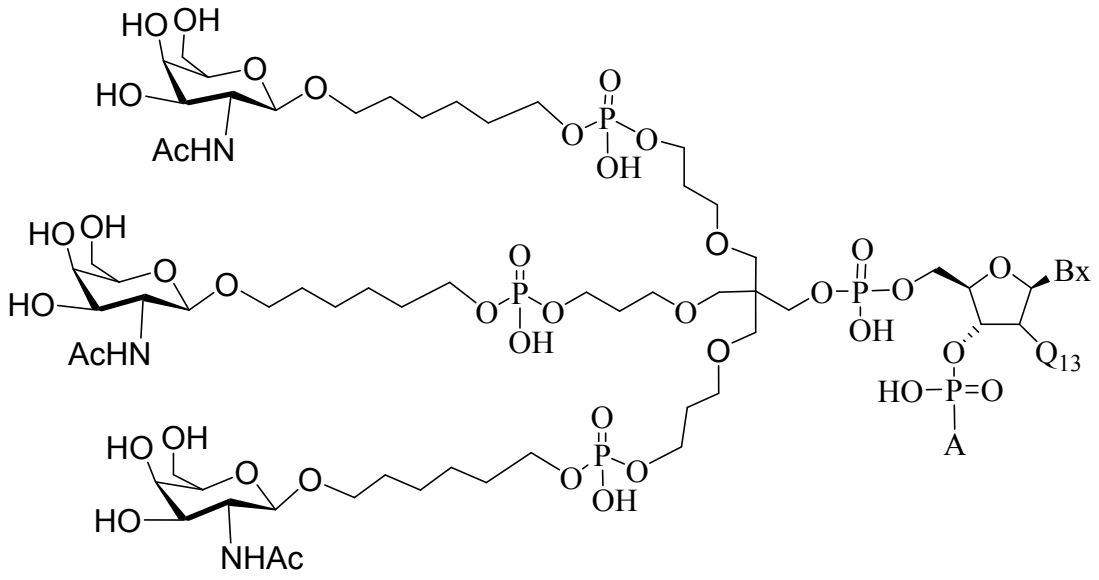
donde cada n es, independientemente, de 1 a 20;

Q_{13} es H o $O(CH_2)_2$-OCH_3;

A es el oligonucleótido modificado; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

174. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 172, donde el compuesto tiene la siguiente estructura:



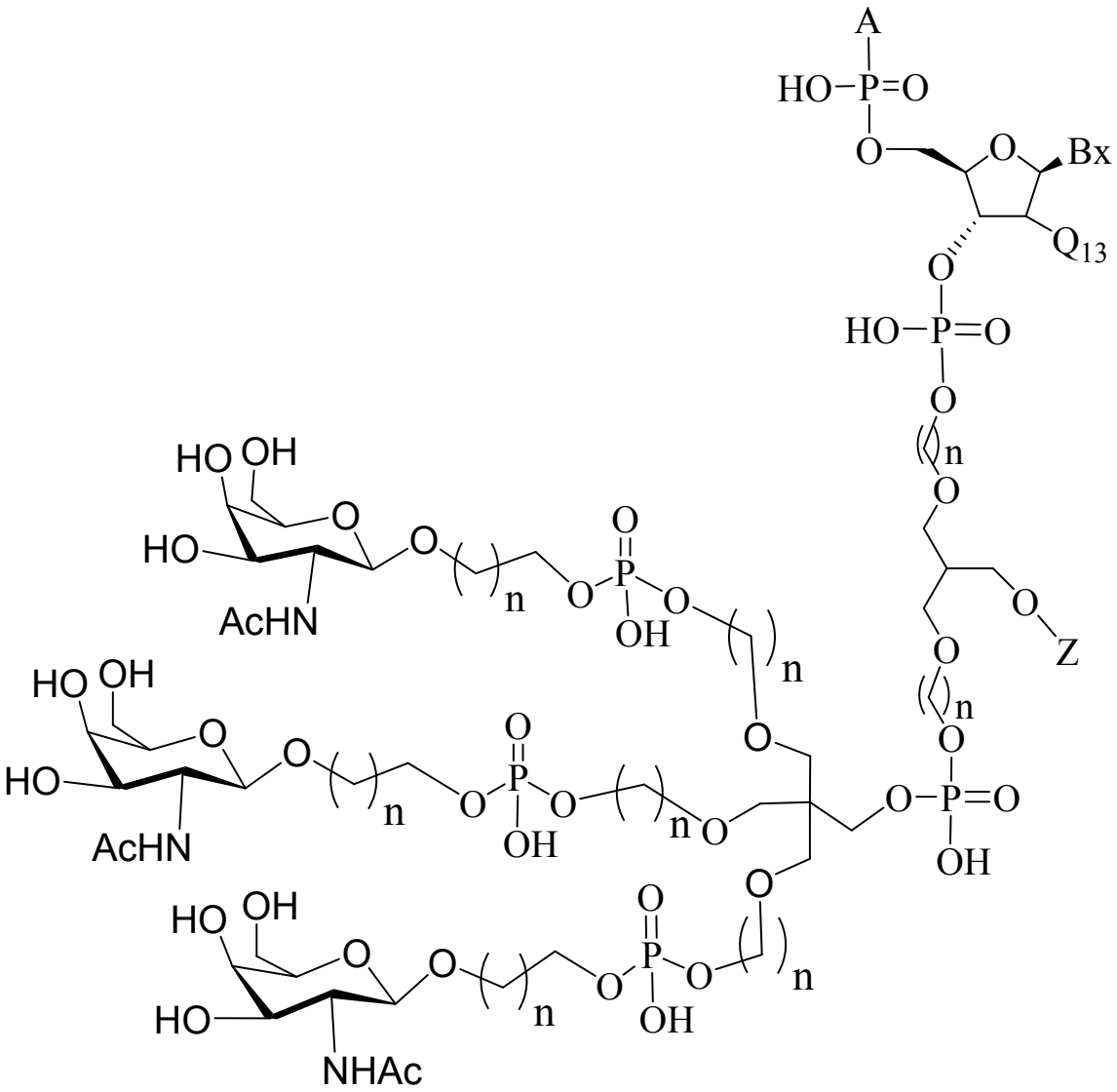
donde cada n es, independientemente, de 1 a 20;

Q_{13} es H o $O(CH_2)_2$-OCH_3;

A es el oligonucleótido modificado; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

175. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 172, donde el compuesto tiene la siguiente estructura:



donde cada n es, independientemente, de 1 a 20;

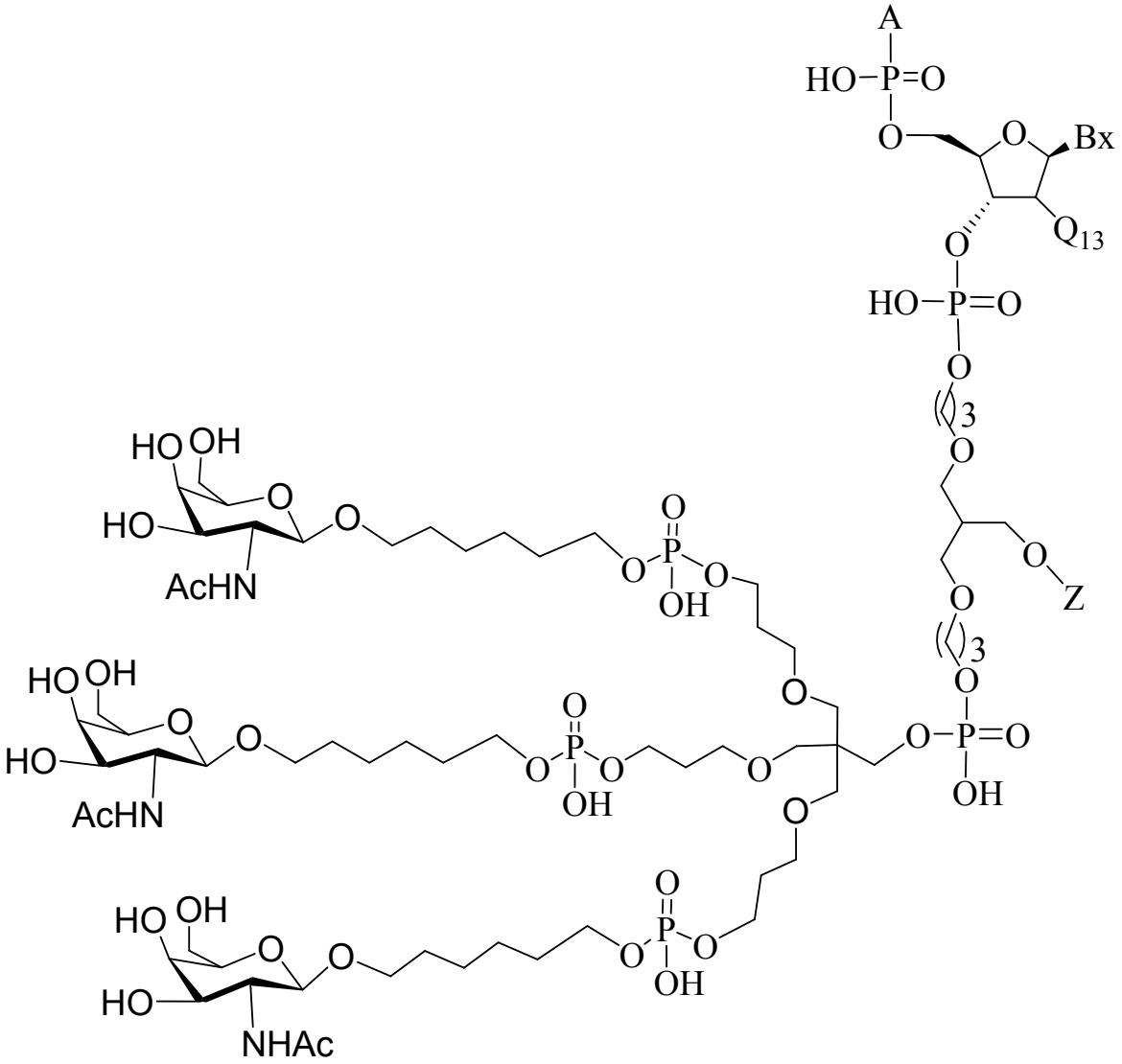
Q_{13} es H o $O(CH_2)_2$-OCH_3;

A es el oligonucleótido modificado;

Z es H o un soporte sólido unido; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

176. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 172, donde el compuesto tiene la siguiente estructura:



donde cada n es, independientemente, de 1 a 20;

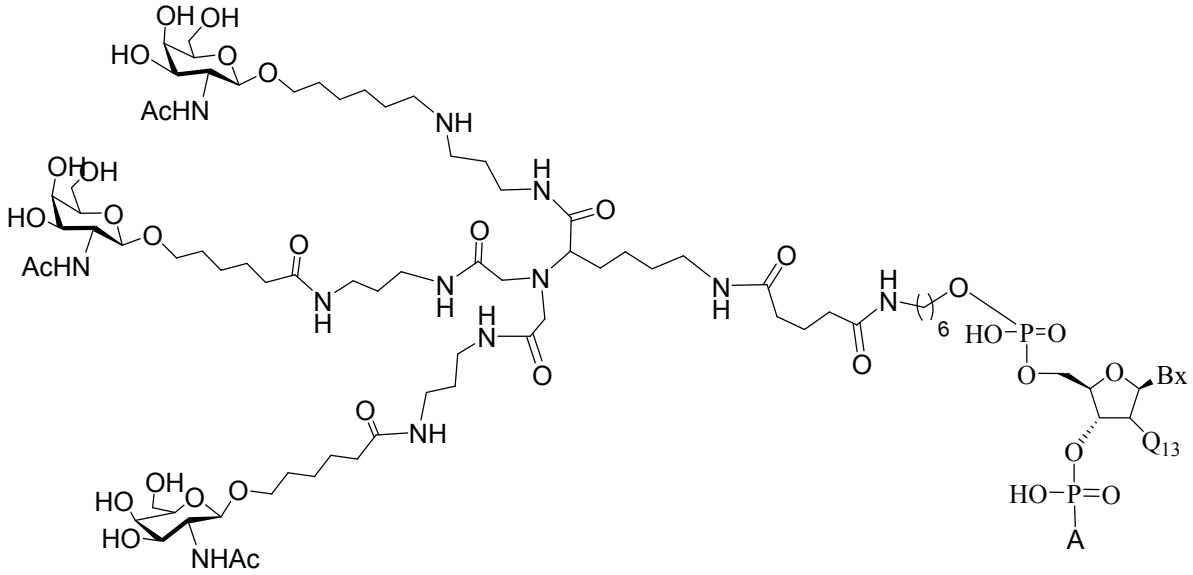
Q_{13} es H o $O(CH_2)_2$-OCH_3;

A es el oligonucleótido modificado;

Z es H o un soporte sólido unido; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

177. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 172, donde el compuesto tiene la siguiente estructura:



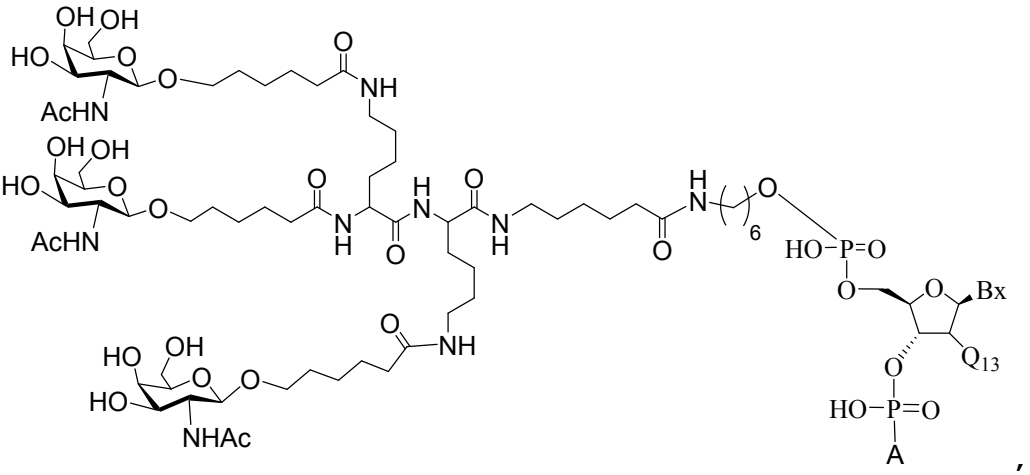
donde Q_{13} es H u $O(CH_2)_2$-OCH_3;

A es el oligonucleótido modificado; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

178. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a

172, donde el compuesto tiene la siguiente estructura:



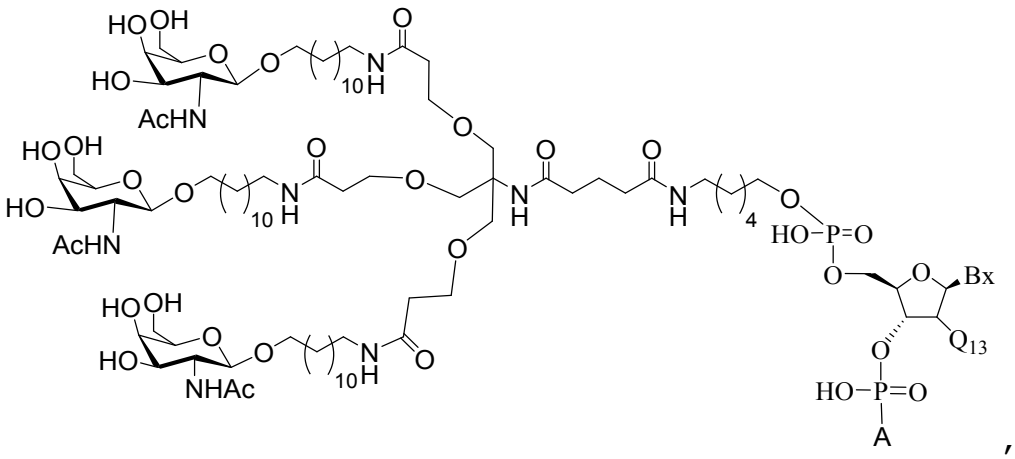
,

donde Q_{13} es H o $O(CH_2)_2$-OCH_3;

A es el oligonucleótido modificado; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

179. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 172, donde el compuesto tiene la siguiente estructura:



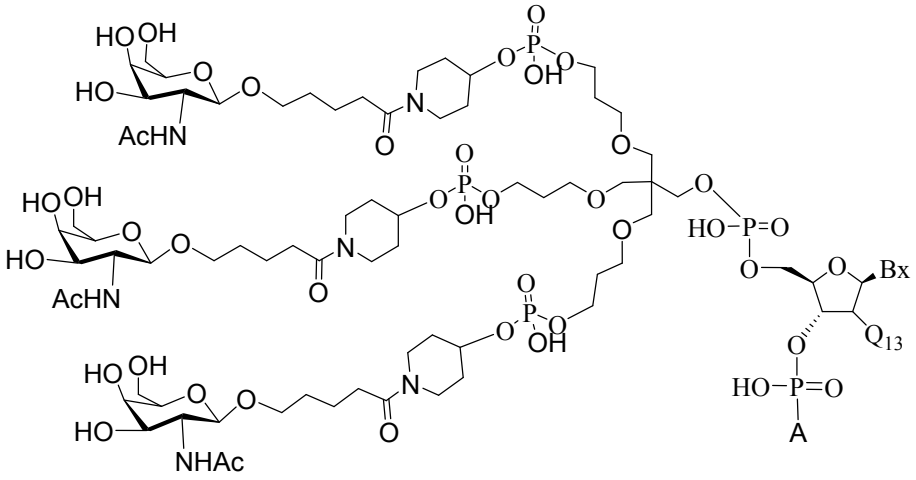
,

donde Q_{13} es H o $O(CH_2)_2$-OCH_3;

A es el oligonucleótido modificado; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

180. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 172, donde el compuesto tiene la siguiente estructura:

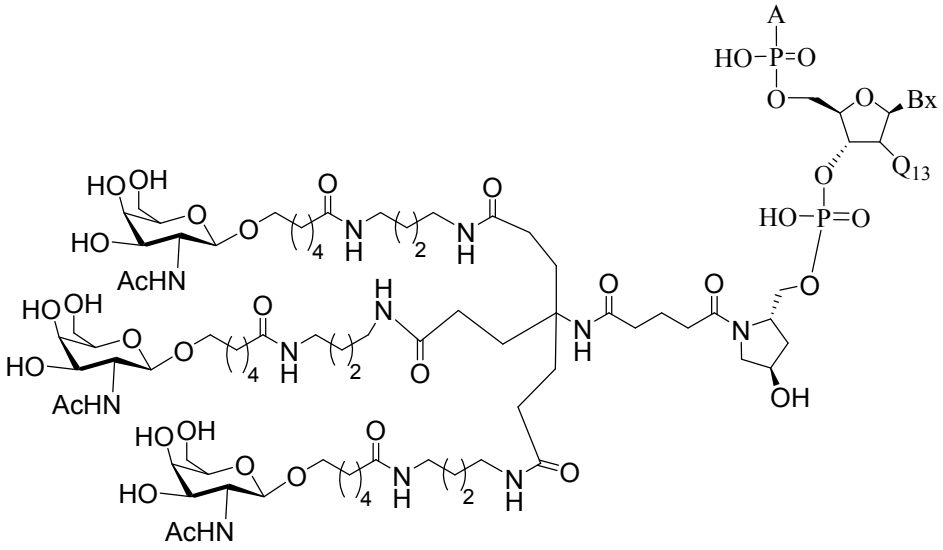


donde Q_{13} es H u $O(CH_2)_2$-OCH_3;

A es el oligonucleótido modificado; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

181. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 172, donde el compuesto tiene la siguiente estructura:

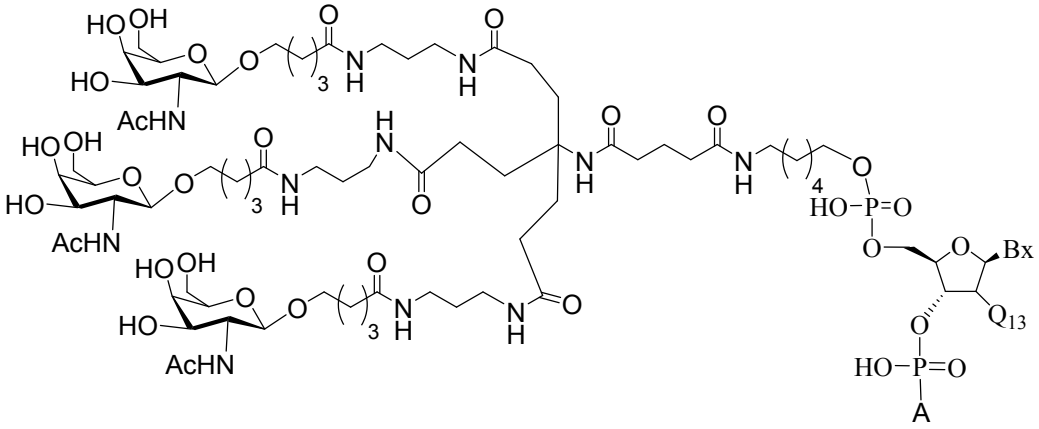


donde Q_{13} es H u $O(CH_2)_2$-OCH_3;

A es el oligonucleótido modificado; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

182. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 172, donde el compuesto tiene la siguiente estructura:

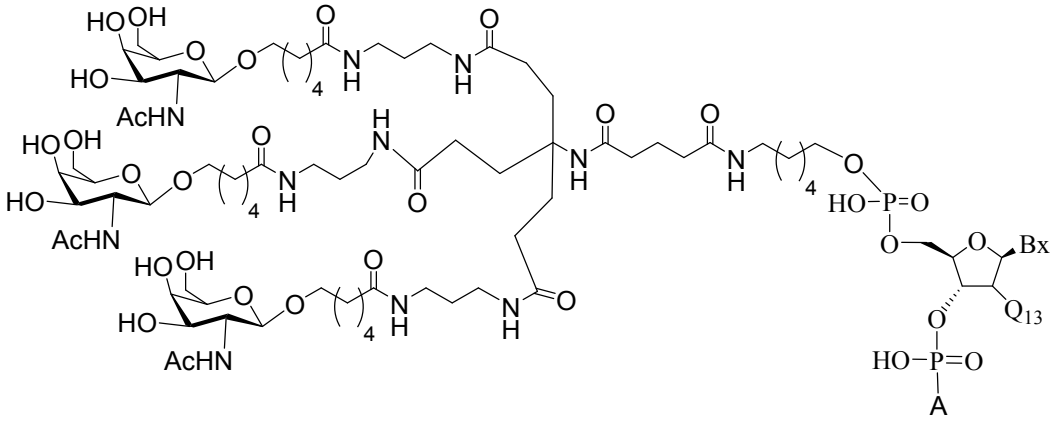


donde Q_{13} es H u $O(CH_2)_2$-OCH_3;

A es el oligonucleótido modificado; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

183. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 172, donde el compuesto tiene la siguiente estructura:

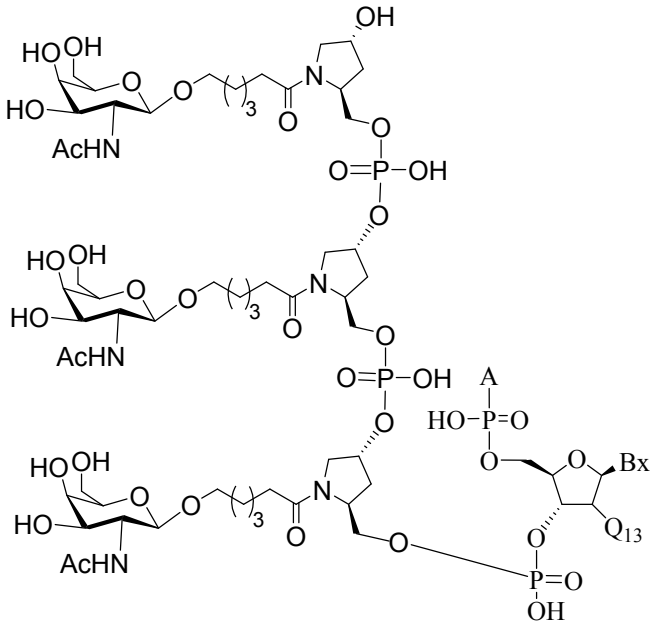


donde Q_{13} es H u $O(CH_2)_2$-OCH_3;

A es el oligonucleótido modificado; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

184. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 172, donde el compuesto tiene la siguiente estructura:

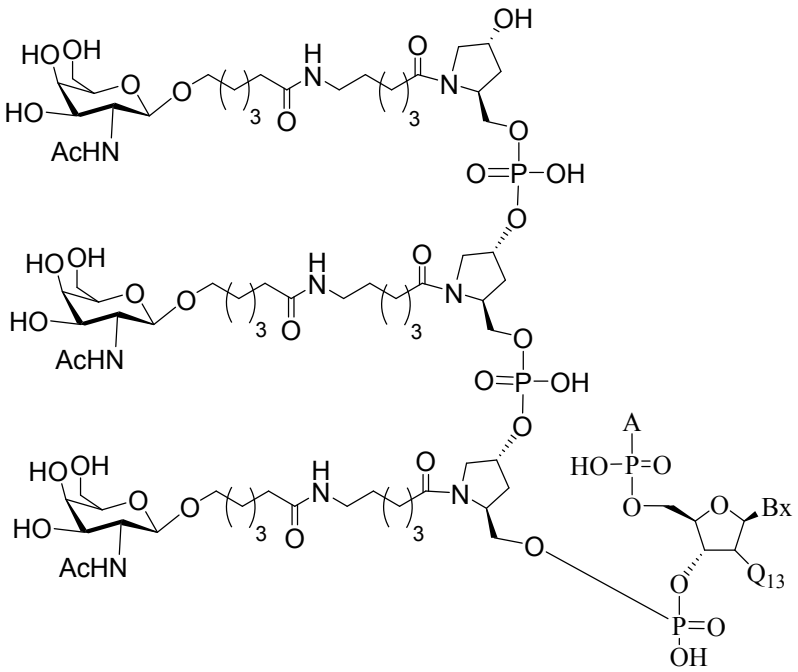


donde Q_{13} es H u $O(CH_2)_2$-OCH_3;

A es el oligonucleótido modificado; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

185. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 172, donde el compuesto tiene la siguiente estructura:

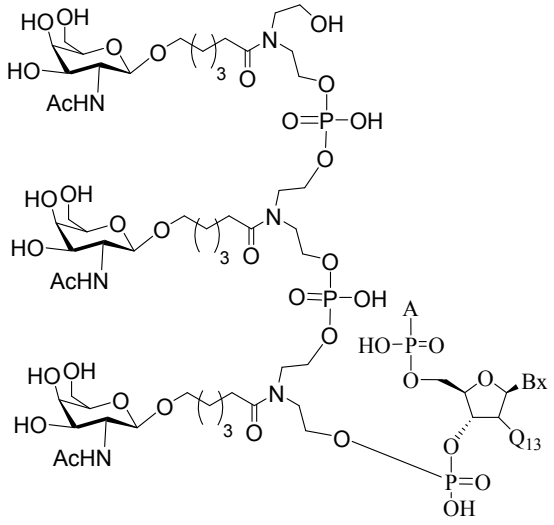


donde Q_{13} es H u $O(CH_2)_2$-OCH_3;

A es el oligonucleótido modificado; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

186. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 172, donde el compuesto tiene la siguiente estructura:

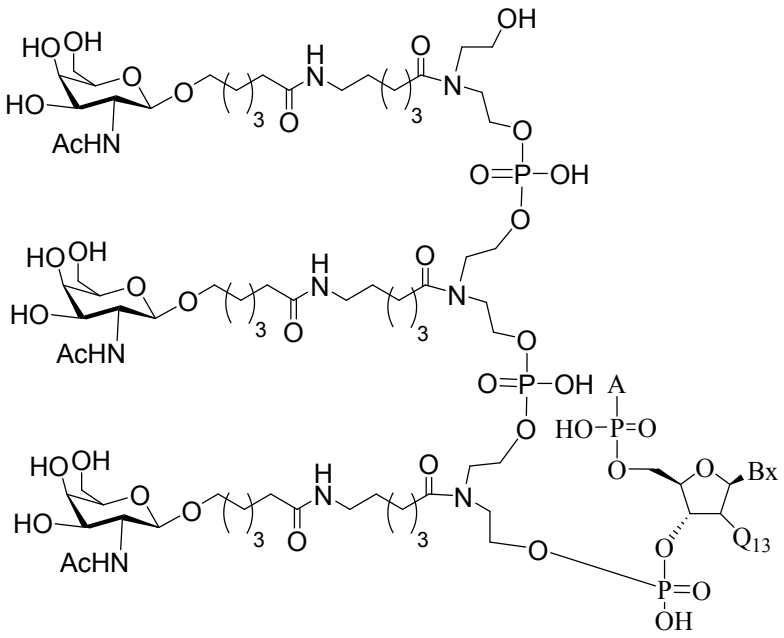


donde Q_{13} es H u $O(CH_2)_2$-OCH_3;

A es el oligonucleótido modificado; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

187. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 172, donde el compuesto tiene la siguiente estructura:

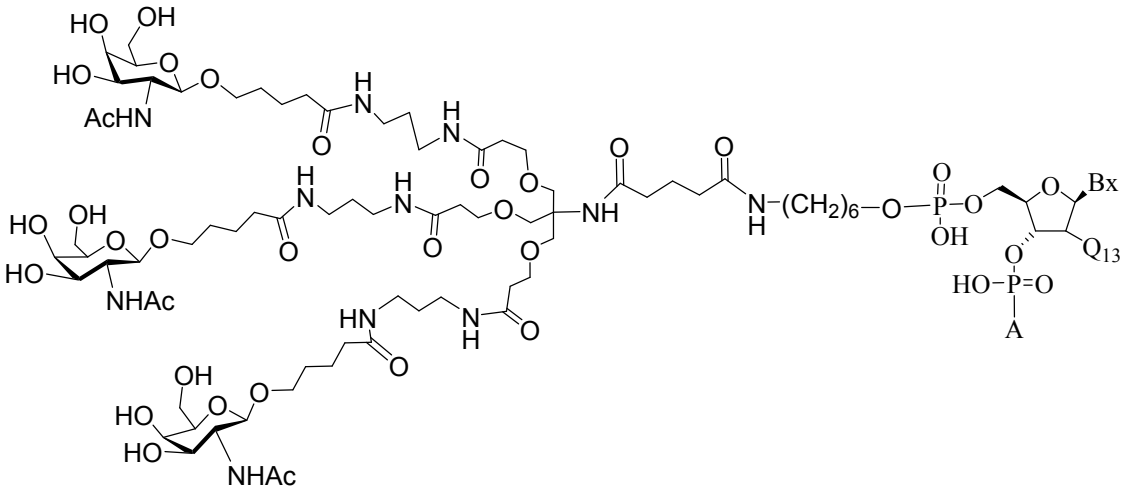


donde Q_{13} es H u $O(CH_2)_2$-OCH_3;

A es el oligonucleótido modificado; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

188. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 172, donde el grupo conjugado comprende:

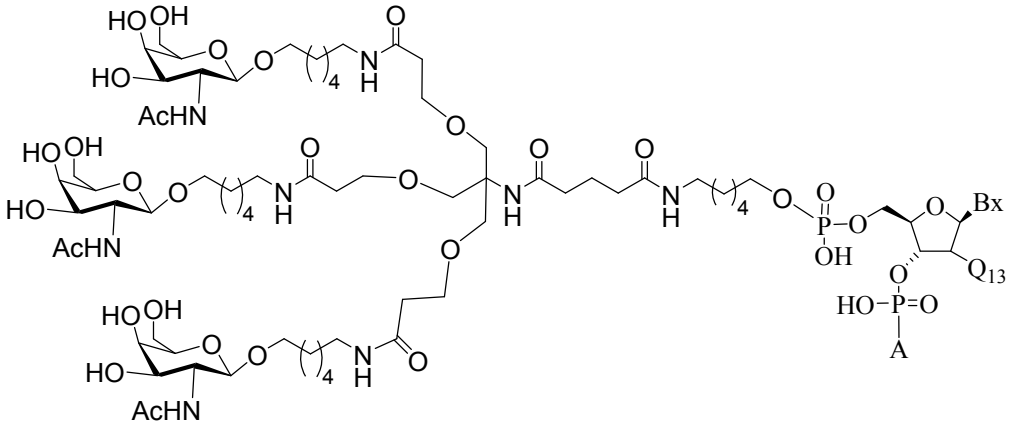


donde Q_{13} es H u $O(CH_2)_2$-OCH_3;

A es el oligonucleótido modificado; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

189. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 172, donde el grupo conjugado comprende:

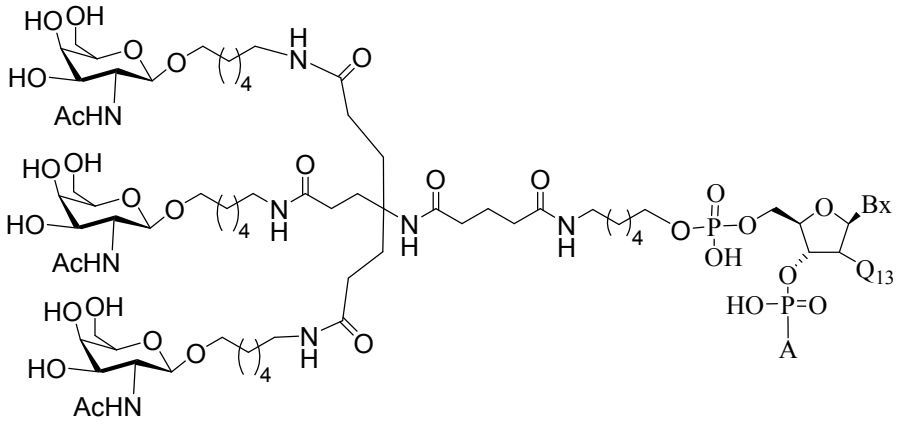


donde Q_{13} es H o $O(CH_2)_2$-OCH_3;

A es el oligonucleótido modificado; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

200. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 172, donde el grupo conjugado comprende:



donde Q_{13} es H o $O(CH_2)_2$-OCH_3;

A es el oligonucleótido modificado; y

Bx es un resto de base heterocíclica.

201. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 173 a 200, donde B_x se selecciona de entre adenina, guanina, timina, uracilo citosina o 5-metilcitosina.

202. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 173 a 200, donde B_x es adenina.

203. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 173 a 200, donde B_x es timina.

204. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 173

a 200, donde Q_{13} es $O(CH_2)_2$-OCH_3.

205. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 173 a 200, donde Q_{13} es H.

206. Un compuesto que comprende ISIS 696844, ISIS 696845, ISIS 698969 o ISIS 698970.

207. Un compuesto que consiste en ISIS 696844, ISIS 696845, ISIS 698969 o ISIS 698970.

208. Una composición que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-207 o sal de este y al menos uno de un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

209. Un profármaco que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 208.

210. Un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento en un sujeto que comprende administrarle al sujeto el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-207, la composición de la reivindicación 208, o el profármaco

de la reivindicación 209, lo que trata, previene o mejora la enfermedad.

211. El método de la reivindicación 210, donde la vía alternativa del complemento se activa más que lo normal.

212. El método de la reivindicación 210 o 211, donde la enfermedad es degeneración macular.

213. El método de la reivindicación 212, donde la degeneración macular es degeneración macular asociada a la edad (DMAE).

214. El método de la reivindicación 213, donde la DMAE es DMAE húmeda.

215. El método de la reivindicación 213, donde la DMAE es DMAE seca.

216. El método de la reivindicación 215, donde la DMAE seca es atrofia geográfica.

217. El método de la reivindicación 210 o 211, donde la enfermedad es una enfermedad de riñón.

218. El método de la reivindicación 217, donde la enfermedad de riñón es nefritis lúpica.

219. El método de la reivindicación 217, donde la enfermedad de riñón es lupus eritematoso sistémico (LES).

220. El método de la reivindicación 217, donde la enfermedad de riñón es enfermedad de depósitos densos (EDD).

221. El método de la reivindicación 217, donde la enfermedad de riñón es glomerulonefritis C3 (C3GN).

222. El método de la reivindicación 217, donde la enfermedad de riñón es nefropatía CFHR5.

223. El método de la reivindicación 217, donde la enfermedad de riñón es el síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS).

224. El método de la reivindicación 223, donde el aHUS se caracteriza por microangiopatía trombótica.

225. El método de cualquiera de las reivindicaciones 217-224, donde la enfermedad de riñón está asociada a los

depósitos de C3.

226. El método de la reivindicación 225, donde la enfermedad de riñón está asociada a los depósitos de C3 en el glomérulo.

227. El método de cualquiera de las reivindicaciones 217-226, donde la enfermedad de riñón está asociada a niveles de C3 en circulación más bajos que lo normal.

228. El método de la reivindicación 227, donde los niveles de C3 en circulación son niveles de C3 en suero o plasma.

229. El método de cualquiera de las reivindicaciones 210-216, donde administrar el compuesto o composición reduce o inhibe la acumulación de niveles oculares de C3.

230. El método de la reivindicación 229, donde los niveles de C3 son niveles de proteína de C3.

231. El método de cualquiera de las reivindicaciones 210-216, donde administrar el compuesto o composición reduce el nivel de depósitos oculares de C3 o inhibe la acumulación de depósitos oculares de C3.

232. El método de cualquiera de las reivindicaciones 229-231, donde el compuesto o composición se le administra al sujeto de forma parenteral.

233. El método de cualquiera de las reivindicaciones 217-228, donde administrar el compuesto o composición reduce o inhibe la acumulación de niveles de C3 en el riñón.

234. El método de la reivindicación 233, donde los niveles de C3 son niveles de proteína de C3.

235. El método de la reivindicación 233 o 234, donde administrar el—compuesto o composición reduce el nivel de los depósitos de C3 en el riñón o inhibe la acumulación de depósitos de C3 en el riñón.

236. El método de cualquiera de las reivindicaciones 233-235, donde los niveles de C3 en el riñón son niveles de C3 en el glomérulo.

237. El método de cualquiera de las reivindicaciones 233-236, donde el compuesto o composición se le administra al sujeto de forma parenteral.

238. El método de cualquiera de las reivindicaciones 210-237, donde se identifica que el sujeto padece o presenta riesgo de padecer una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento.

239. El método de la reivindicación 238, donde la identificación comprende detectar los niveles del complemento o niveles de complejo de ataque a la membrana en el suero del sujeto.

240. El método de la reivindicación 238, donde la identificación comprende realizar una prueba genética para determinar mutaciones génicas de factores del complemento asociados a la enfermedad.

241. Un método para inhibir la expresión del Factor B del complemento (CFB) en un sujeto que padece, o que presenta riesgo de padecer, una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento que comprende administrarle el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-207, la composición de la reivindicación 208 o el profármaco de la reivindicación 209 al sujeto para inhibir, de esta forma, la expresión de CFB en el sujeto.

242. El método de la reivindicación 241, donde la vía alternativa del complemento se activa más que lo normal.

243. El método de la reivindicación 241 o 242, donde administrar el compuesto o composición inhibe la expresión de CFB en el ojo.

244. El método de la reivindicación 243, donde el sujeto padece, o presenta riesgo de padecer, degeneración macular asociada a la edad (DMAE).

245. El método de la reivindicación 241 o 242, donde administrar el compuesto o composición inhibe la expresión de CFB en el riñón.

246. El método de la reivindicación 245, donde administrar el compuesto o composición inhibe la expresión de CFB en el glomérulo.

247. El método de la reivindicación 245 o 246, donde el sujeto padece, o presenta riesgo de padecer, nefritis lúpica, enfermedad de depósitos densos (EDD), glomerulonefritis C3 (C3GN), nefropatía CFHR5, o síndrome urémico hemolítico

atípico (aHUS) o cualquier combinación de estas.

248. Un método para reducir o inhibir la acumulación de depósitos de C3 en el ojo de un sujeto que padece, o que presenta riesgo de padecer, una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento que comprende administrarle el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-207, la composición de la reivindicación 208 o el profármaco de la reivindicación 209 al sujeto para reducir o inhibir, de esta forma, la acumulación de depósitos de C3 en el ojo del sujeto.

249. El método de la reivindicación 248, donde la vía alternativa del complemento se activa más que lo normal.

250. El método de la reivindicación 248 o 249, donde el sujeto padece, o presenta riesgo de padecer, degeneración macular asociada a la edad (DMAE).

251. Un método para reducir o inhibir la acumulación de depósitos de C3 en el riñón de un sujeto que padece, o que presenta riesgo de padecer, una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento que comprende administrarle el compuesto de cualquiera de las

reivindicaciones 1-207, la composición de la reivindicación 208 o el profármaco de la reivindicación 209 al sujeto para reducir o inhibir, de esta forma, la acumulación de depósitos de C3 en el riñón del sujeto.

252. El método de la reivindicación 251, donde la vía alternativa del complemento se activa más que lo normal.

253. El método de la reivindicación 251 o 252, donde el sujeto padece, o presenta riesgo de padecer, nefritis lúpica, enfermedad de depósitos densos (EDD), glomerulonefritis C3 (C3GN), nefropatía CFHR5, o síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS) o cualquier combinación de estas.

254. El método de cualquiera de las reivindicaciones 241-253, donde el compuesto o composición se le administra al sujeto de forma parenteral.

255. Uso del compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-207, la composición de la reivindicación 208, o el profármaco de la reivindicación 209 para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad asociada a la desregulación de la vía alternativa del complemento.

256. El uso de la reivindicación 255, donde la vía alternativa del complemento se activa más que lo normal.

257. El uso de la reivindicación 255 o 256, donde la enfermedad es degeneración macular.

258. El uso de la reivindicación 257, donde la degeneración macular es degeneración macular asociada a la edad (DMAE).

259. El uso de la reivindicación 258, donde la DMAE es DMAE húmeda.

260. El uso de la reivindicación 258, donde la DMAE es DMAE seca.

261. El uso de la reivindicación 260, donde la DMAE seca es atrofia geográfica.

262. El uso de la reivindicación 255 o 256, donde la enfermedad es una enfermedad de riñón.

263. El uso de la reivindicación 262, donde la enfermedad renal es nefritis lúpica, enfermedad de depósitos densos (EDD), glomerulonefritis C3 (C3GN), nefropatía CFHR5, o

síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS) o cualquier combinación de estas.

RESUMEN

Las modalidades de la presente proporcionan métodos, compuestos y composiciones para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad asociada a una desregulación de la vía alternativa del complemento al administrarle un inhibidor específico del Factor B del Complemento (CFB) a un sujeto.