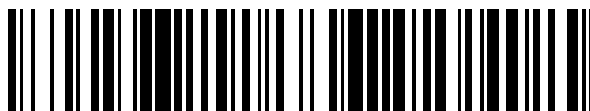


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 665**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61K 31/7115 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2008 E 08801379 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2203559**

54 Título: **Tratamiento de combinación para el tratamiento de infección por virus de la hepatitis C**

30 Prioridad:

04.10.2007 US 977497 P

11.10.2007 US 979217 P

12.02.2008 US 28062

17.07.2008 EP 08104780

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2014

73 Titular/es:

STELLA APS (100.0%)

Fremtidsvej 3

2970 Hørsholm , DK

72 Inventor/es:

ELMÉN, JOACIM

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 463 665 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de combinación para el tratamiento de infección por virus de la hepatitis C

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona composiciones y métodos útiles para el tratamiento de infección por virus de la hepatitis C. En particular, esta invención se refiere al uso de una combinación de compuestos, uno que puede inhibir miR-122 y otro que puede inhibir Apo-B100 o alternativamente inhibir otra molécula en la ruta de ensamblaje de VLDL. La inhibición de miR-122 en combinación con la inhibición de la ruta de ensamblaje de VLDL, es decir Apo-B100, es beneficiosa para el tratamiento de infección por virus de la hepatitis C.

Antecedentes

15 Aproximadamente 150-200 millones de personas en todo el mundo presentan infección crónica por virus de la hepatitis C (VHC). La infección puede provocar inflamación hepática (hepatitis) que con frecuencia es asintomática, pero una hepatitis crónica posterior puede dar más tarde como resultado cirrosis (cicatrización fibrótica del hígado) y cáncer de hígado.

20 El virus de la hepatitis C (VHC) se propaga mediante contacto sangre-sangre con la sangre de una persona infectada. Los síntomas pueden tratarse médicamente, y puede aclararse el virus de una proporción de pacientes mediante un ciclo largo de medicamentos antivirales. Aunque una intervención médica temprana es útil, con frecuencia las personas con infección por VHC experimentan síntomas leves, y por consiguiente no buscan tratamiento. En los EE.UU., las personas con una historia de uso de drogas intravenosas, uso de drogas inhaladas, tatuajes o que se han expuesto a sangre mediante relaciones sexuales sin protección o prácticas sociales corren un riesgo aumentado de adquirir esta enfermedad. La hepatitis C es la causa principal de trasplante de hígado en los Estados Unidos.

30 miR-122 es un microARN específico del hígado, bien conservado dentro de los vertebrados. miR-122 está implicado en el metabolismo del colesterol (Esau *et al.* 2005) y recientemente se ha mostrado que miR-122 es importante para la replicación del virus de la hepatitis C (VHC) (Jopling *et al.* 2005 y documento WO 2005/107826).

La secuencia de miR-122 está bien conservada entre diferentes especies de mamíferos (mirbase, Sanger Center, R.U.).

35 >hsa-miR-122 MIMAT0000421

UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG

40 >mmu-miR-122 MIMAT0000246

UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG

>mo-miR-122 MIMAT0000827

45 UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG

>dre-miR-122 MIMAT0001818

50 UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG

>xtr-miR-122 MIMAT0003585

UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGU

55 >gga-miR-122 MIMAT0001190

UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGU

60 >bta-miR-122 MIMAT0003849

UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG

65 Joplin *et al.* también muestran que el bloqueo de miR-122 mediante un oligonucleótido inhibe la replicación genómica de VHC. miR-122 interacciona con secuencias diana en 5'UTR y 3'UTR del virus, mutaciones en estos sitios reducen la replicación del virus. Los sitios diana de miR-122 tanto 5'UTR como 3'UTR están conservados en

los genotipos de VHC 1a, 1b, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto sugiere que la replicación de todos los genotipos de VHC puede reducirse bloqueando miR-122. Recientemente también se ha mostrado que la replicación del genotipo 2 se bloquea seleccionando como diana miR-122 con un oligonucleótido complementario (Randall *et al.* PNAS 2007).

5 Un segundo factor celular de importancia para la capacidad de VHC de replicarse en células de mamífero es la ruta de ensamblaje de VLDL (Huang *et al.* 2007). El ensamblaje de VLDL es importante para el empaquetamiento/liberación de las partículas virales a partir de la célula huésped. Reducir el ensamblaje de VLDL también reduce la liberación de partículas de VHC.

10 Un factor de particular importancia en la ruta de ensamblaje de VLDL es la apolipoproteína B (también conocida como ApoB, apolipoproteína B-100; ApoB-100, apolipoproteína B-48; ApoB-48 y antígeno Ag(x)). ApoB es una glicoproteína grande que realiza un papel indispensable en el ensamblaje y la secreción de lípidos y en el transporte y la captación y suministro mediados por receptor de distintas clases de lipoproteínas. ApoB desempeña un papel importante en la regulación de los niveles de lipoproteínas circulantes y por tanto es relevante en cuanto a la propensión a aterosclerosis que está altamente correlacionada con la concentración ambiental de lipoproteínas que contienen apolipoproteína B. Véase Davidson y Shelness (Annul Rev. Nutr., 2000, 20, 169-193) para más detalles sobre las dos formas de ApoB presentes en mamíferos, su estructura y la importancia medicinal de ApoB.

20 El documento WO 2007/027775 reivindica el uso de oligonucleótidos anti-miR-122 para el tratamiento de enfermedades metabólicas o cardiovasculares.

En los mamíferos existen dos formas de apolipoproteína B. ApoB-100 representa la proteína de longitud completa que contiene 4536 residuos de aminoácido sintetizada exclusivamente en el hígado humano (Davidson y Shelness, Annul Rev. Nutr., 2000, 20, 169-193). Una forma truncada conocida como ApoB-48 es colineal con los 2152 residuos amino-terminales y se sintetiza en el intestino delgado de todos los mamíferos (Davidson y Shelness, Annul Rev. Nutr., 2000, 20, 169-193).

30 La base mediante la cual el gen estructural común de la apolipoproteína B produce dos isoformas de proteína distintas es un proceso conocido como edición del ARN. Una reacción de edición de citosina a uracilo específica del sitio produce un codón de terminación UAA y la terminación traduccional de apolipoproteína B para producir ApoB-48 (Davidson y Shelness, Annul Rev. Nutr., 2000, 20, 169-193).

Aproximadamente el 70 % de todos los infectados establecen infección crónica. La terapia antiviral actual contra VHC consiste en interferón en combinación con ribavirina, que es eficaz en algunos pacientes, sin embargo un gran grupo no responden o no toleran el tratamiento. Por tanto, existe una necesidad de modalidades de tratamiento novedosas para VHC. La presente invención proporciona un tratamiento de combinación novedoso para VHC, que comprende un inhibidor de miR-122 en combinación con un inhibidor de ApoB-100 o un inhibidor de la ruta de ensamblaje de VLDL. El tratamiento de combinación proporcionado conduce a una reducción de dos factores de huésped endógenos, miR-122 y la ruta de VLDL (o APOB-100), que se necesitan para la replicación completa de VHC. La implementación de un tratamiento que no selecciona directamente como diana el virus, sino que en vez de eso inhibe factores de huésped que son importantes para la replicación de VHC en la célula huésped, reducirá el problema relacionado con la alta tasa de mutación de un virus replicante de ARN/ARN, lo que podría aumentar la probabilidad de mutaciones de escape y resistencia a terapias que seleccionan directamente como diana el virus.

45 La invención se refiere a la combinación de compuestos que modulan (de manera adecuada inhiben) el ensamblaje de VLDL y compuestos que inhiben la función de miR-122, y a que usando ambos compuestos en la prevención o el tratamiento médico de infección por VHC se logra un tratamiento mejorado. Sin desear limitarse a ninguna teoría específica, se considera que combatir el virus en dos etapas diferentes de su ciclo vital conduce a una sinergia en la inhibición y a menor resistencia a fármacos.

50 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un tratamiento de combinación novedoso para infección por virus de la hepatitis C, usando los efectos combinados de bloquear miR-122 y VLDL/apoB.

55 La composición consiste en un inhibidor oligonucleotídico de miR-122 que consiste en la secuencia 5'-CcAttGTcaCaCtCC- 3', y en el que las letras minúsculas representan ADN, las letras mayúsculas representan ANB y todas las C de ANB son 5'-metil-citosina y todos los enlaces internucleosídicos son enlaces fosforotioato en combinación con cualquier agente adicional de ensamblaje de VLDL según la reivindicación 1 (tal como un oligonucleótido antisentido de ANB que reduce ApoB100 o ARNip que bloquea ApoB100 u otros fármacos actuales que reducen la ruta/ensamblaje de VLDL, por ejemplo inhibidores de MTP (proteína de transferencia de triglicéridos microsomal) (tales como BMS-2101038 usado por Huang *et al.* 2007) o cualquier otro agente que reduce/bloquea la ruta/ensamblaje de VLDL). También es posible que esto pueda combinarse con agentes antivirales adicionales.

65 En una realización, la presente invención usa oligonucleótido antisentido, tal como compuestos oligoméricos de ácido nucleico bloqueado (ANB), para modular el ensamblaje de VLDL, por ejemplo inhibiendo la expresión de

apolipoproteína B, incluyendo la inhibición de la isoforma alternativa de apolipoproteína B, ApoB-48.

miR-122 está implicado en, e incluso se considera esencial para, la replicación de VHC en células hepáticas humanas.

5 La invención proporciona un medicamento que comprende el inhibidor de miR-122, el inhibidor de ensamblaje de VLDL y un portador farmacológicamente aceptable adecuado.

De manera adecuada, el medicamento es para el tratamiento de infección por VHC.

10 Se reconocerá que, preferiblemente, el inhibidor de miR-122 y el inhibidor de ensamblaje de VLDL no son el mismo compuesto, sino que son compuestos diferentes. Con respecto a esto, es preferible que el inhibidor de ensamblaje de VLDL no sea un inhibidor directo de miR-122, tal como un oligonucleótido antisentido frente a miR-122.

15 La invención también proporciona un método para la preparación de un medicamento, comprendiendo dicho método mezclar dicho inhibidor de miR-122, dicho inhibidor de ensamblaje de VLDL y dicho portador farmacológicamente aceptable adecuado.

20 La invención proporciona además un kit para el tratamiento de infección por VHC que comprende un inhibidor de miR-122 y un inhibidor de ensamblaje de VLDL según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

La invención proporciona además el uso de un inhibidor de miR-122 según la invención y un inhibidor de ensamblaje de VLDL según la invención (o el kit según la reivindicación 18) para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de infección por VHC.

25 En una realización dicho tratamiento o prevención es para la prevención de reinfección postrasplante.

En una realización el uso del medicamento se realiza para el tratamiento de pacientes que pueden ser, o son, resistentes a otro tratamiento existente, tal como tratamiento con interferón y/o ribavirina.

30 En una realización el medicamento se administra por vía parental.

En una realización, el medicamento se administra por vía intravenosa o intramuscular o intraperitoneal.

35 En una realización, el inhibidor de miR-122 y el inhibidor de ensamblaje de VLDL se administran simultáneamente en un régimen de dosificación combinado.

En una realización, el inhibidor de miR-122 y el inhibidor de ensamblaje de VLDL se administran simultáneamente en regímenes de dosificación separados.

40 En una realización, el inhibidor de miR-122 y el inhibidor de ensamblaje de VLDL deben administrarse por separado en dos formas farmacéuticas diferentes.

45 El inhibidor de miR-122 y el inhibidor de ensamblaje de VLDL pueden usarse en un método para el tratamiento o la prevención de infección por VHC en un paciente, comprendiendo dicho método las etapas de administrar el medicamento según la invención a un paciente que lo necesita, opcionalmente usando las vías de administración, o para el fin, al que se hace referencia en el presente documento.

50 La invención proporciona además un método para la regulación por disminución concurrente de ensamblaje de VLDL y miR-122 y/o infección por VHC en una célula de mamífero o ser humano, comprendiendo dicho método administrar el inhibidor de miR-122 y el inhibidor de ensamblaje de VLDL a dicha célula.

La invención proporciona además un método para la regulación por disminución concurrente de ApoB y miR-122 y/o infección por VHC en una célula de mamífero o ser humano, comprendiendo dicho método administrar el inhibidor de miR-122 y un inhibidor de ApoB a dicha célula.

55 En los métodos anteriores de regulación por disminución concurrente, la célula comprende normalmente miR-122 y opcionalmente VHC, y puede comprender de manera adecuada el ARNm que codifica para ApoB-100 (o una diana de ARNm o VLDL alternativa tal como se hace referencia en el presente documento).

60 La invención proporciona además el inhibidor de miR-122 como medicamento para el tratamiento de infección por VHC en pacientes tratados con un inhibidor de APOB-100.

65 La invención proporciona además un inhibidor de APOB-100 como medicamento para el tratamiento de infección por VHC en pacientes tratados con el inhibidor de miR-122.

La invención proporciona además el uso de los medicamentos y las composiciones de la invención, en el que el medicamento es para la prevención de reinfección postrasplante.

La invención proporciona además el uso de los medicamentos y las composiciones de la invención, en el que el medicamento es para el tratamiento profiláctico.

La invención proporciona además el uso de los medicamentos y las composiciones de la invención, en el que el medicamento es para el tratamiento de pacientes con infección por VHC, en el que dicho tratamiento no es profiláctico o para la prevención de reinfección postrasplante.

La invención proporciona además uno cualquiera de los medicamentos y las composiciones anteriores, en los que el medicamento se prepara para el tratamiento de pacientes que son resistentes a otro tratamiento existente, tal como tratamiento con interferón y/o ribavirina.

La invención proporciona además los medicamentos y las composiciones anteriores, en los que el antagonista de APOB-100, es un oligonucleótido complementario a la totalidad o parte de la secuencia de ARNm de APOB-100 o es un inhibidor de MTP.

La invención proporciona además los medicamentos y las composiciones anteriores, en los que el antagonista de apoB-100 es un oligonucleótido que contiene uno o más residuos de ANB.

La invención proporciona además medicamentos y composiciones que comprenden un oligonucleótido de apoB-100 antisentido que comprende uno o más residuos de ANB, en los que el oligonucleótido contiene uno o más apareamientos erróneos.

El inhibidor de miR-122 es un oligonucleótido que es complementario a parte de la secuencia de ARN de miR-122.

El inhibidor de miR-122 es un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia que es complementaria a la secuencia de semilla de miR-122.

La invención proporciona además medicamentos y composiciones tal como se describió anteriormente, en los que el inhibidor de miR-122 es SEQ ID NO: 63.

El inhibidor de miR-122 es un oligonucleótido que contiene uno o más residuos de ANB.

La invención proporciona además medicamentos y composiciones tal como se describió anteriormente, en los que el medicamento se administra por vía parental.

La invención proporciona además medicamentos y composiciones tal como se describió anteriormente, en los que el medicamento se administra por vía intravenosa o intramuscular o intraperitoneal.

La invención proporciona además medicamentos y composiciones tal como se describió anteriormente, en los que el inhibidor de miR-122 y el inhibidor de APOB-100 se administran simultáneamente en un régimen de dosificación combinado.

La invención proporciona además medicamentos y composiciones tal como se describió anteriormente, en los que el inhibidor de miR-122 y el inhibidor de APOB-100 se administran simultáneamente en regímenes de dosificación separados.

La invención proporciona además medicamentos y composiciones tal como se describió anteriormente, en los que los medicamentos y las composiciones se preparan para su uso en combinación con tratamiento con interferón y/o ribavirina.

Los medicamentos y las composiciones de la invención pueden usarse en un método de tratamiento de un sujeto que padece infección por VHC, comprendiendo el método la etapa de administrar una composición farmacéutica tal como se define en el presente documento al sujeto que lo necesita.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. El efecto del tratamiento con diferentes oligonucleótidos anti-miR de ANB sobre la expresión de ácido nucleico diana en la línea celular que expresa miR-122a, Huh-7. Se muestran cantidades de miR-122a (unidades arbitrarias) derivadas a partir de qRT-PCR específica para miR-122a en comparación con células sin tratar (simulado). Los oligonucleótidos anti-miR de ANB se usaron a dos concentraciones, 1 y 100 nM, respectivamente. También se incluye un control de apareamiento erróneo (SEQ ID NO: 64) con respecto a SEQ ID NO: 63.

Figura 2. Evaluación de respuesta a la dosis de silenciamiento con compuesto anti-miR-122a de ANB para SEQ ID

NO: 66 y SEQ ID NO: 63 en comparación con SEQ ID NO: 61 *in vivo* en hígados de ratones usando RT-PCR en tiempo real de miR-122a.

5 Figura 2b. Niveles de miR-122 en el hígado de ratón tras el tratamiento con diferentes compuestos anti-miR de ANB. Las moléculas anti-miR de ANB SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 63 se administraron en ratones normales mediante tres inyecciones i.p. cada dos días a lo largo de un periodo de seis días a dosis indicadas y se sacrificaron 48 horas tras la última dosis. Se extrajo ARN total de los hígados de ratones y se midió miR-122 mediante qPCR específica para miR-122.

10 Figura 3. Evaluación de niveles de colesterol en plasma en ratones tratados con compuesto anti-miR-122a de ANB en comparación con los ratones control que recibieron solución salina.

Figura 4a. Evaluación de niveles de ARNm de Bckdk relativos en ratones tratados con compuesto anti-miR-122a de ANB en comparación con ratones con control de solución salina usando RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

15 Figura 4b. Evaluación de niveles de ARNm de aldolasa A relativos en ratones tratados con compuesto anti-miR-122a de ANB en comparación con ratones con control de solución salina usando RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

20 Figura 4c. Evaluación de niveles de ARNm de GAPDH en ratones tratados con compuesto anti-miR-122a de ANB (animales 4-30) en comparación con ratones con control de solución salina (animales 1-3) usando RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

Figura 5. Evaluación de respuesta a la dosis de silenciamiento con compuesto anti-miRTM-122a de ANB *in vivo* en hígados de ratones usando RT-PCR en tiempo real de miR-122a. Se trataron seis grupos de animales (5 ratones por grupo) de la siguiente manera. A los animales del grupo 1 se les inyectaron 0,2 ml de solución salina i.v. en 3 días sucesivos, el grupo 2 recibió 2,5 mg/kg de SEQ ID NO: 61, el grupo 3 recibió 6,25 mg/kg, el grupo 4 recibió 12,5 mg/kg y el grupo 5 recibió 25 mg/kg, mientras que el grupo 6 recibió 25 mg/kg de SEQ ID NO: 65 (oligonucleótido anti-miRTM de ANB de apareamiento erróneo), todos de la misma manera. Se repitió el experimento (por tanto n = 10) y se muestran los resultados combinados.

30 Figura 6. Transferencia de tipo Northern que compara SEQ ID NO: 63 con SEQ ID NO: 61. Se sometió ARN total de un ratón en cada grupo a transferencia de tipo Northern específica para miR-122. Se indican miR-122 maduro y el dúplex (microARN bloqueado) formado entre el compuesto anti-miR de ANB y miR-122.

35 Figura 7. Se trataron ratones con 25 mg/kg/día de compuesto anti-miR de ANB o solución salina durante tres días consecutivos y se sacrificaron 1, 2 ó 3 semanas tras la última dosis. También se incluyen los valores de los animales sacrificados 24 horas tras la última dosis (ejemplo 11 "diseño antiguo"). Se evaluaron los niveles de miR-122 mediante qPCR y se normalizaron con respecto a la media del grupo de solución salina en cada punto de tiempo individual. También se incluyen los valores de los animales sacrificados 24 horas tras la última dosis (media y D.E. mostradas, n=7, 24 h, n=10). El sacrificio en el día 9, 16 ó 23 corresponde al sacrificio 1, 2 ó 3 semanas tras la última dosis.

45 Figura 8. Se trataron ratones con 25 mg/kg/día de anti-miR de ANB o solución salina durante tres días consecutivos y se sacrificaron 1, 2 ó 3 semanas tras la última dosis. También se incluyen los valores de los animales sacrificados 24 horas tras la última dosis (ejemplo 11 "diseño antiguo"). Se midió el colesterol en plasma y se normalizó con respecto al grupo de solución salina en cada punto de tiempo (media y D.E. mostradas, n=7, 24 h, n=10).

Figura 9. Inducción de ARNm diana de miR-122a dependiente de la dosis mediante inhibición por SEQ ID NO: 61 de miR-122a. Se trataron ratones con diferentes dosis de SEQ ID NO: 61 durante tres días consecutivos tal como se describió anteriormente y se sacrificaron 24 horas tras la última dosis. Se sometió ARN total extraído del hígado a qPCR. Se investigaron genes con sitio diana de miR-122 predicho y que se observó que estaban regulados por incremento mediante análisis con micromatriz para determinar la inducción dependiente de la dosis aumentando dosis de SEQ ID NO: 61 usando qPCR. Se sometió ARN total de hígado de 2 a 3 ratones por grupo sacrificados 24 horas tras la última dosis a qPCR para los genes indicados. En figura 9 se muestran los niveles de ARNm con respecto al grupo de solución salina, n=2-3 (2,5 - 12,5 mg/kg/día: n=2, sin D.E.). También se muestra el control de apareamiento erróneo (mm, SEQ ID NO: 65).

Figura 10. Inducción transitoria de ARNm diana de miR-122a tras el tratamiento con SEQ ID NO: 61. Se trataron ratones hembra NMRI con 25 mg/kg/día de SEQ ID NO: 61 junto con control de solución salina durante tres días consecutivos y se sacrificaron 1, 2 ó 3 semanas tras la última dosis, respectivamente. Se extrajo ARN de hígados y se investigaron mediante qPCR niveles de ARNm de ARNm diana de miR-122a predichos, seleccionados mediante datos de micromatriz. Se analizaron tres animales de cada grupo.

Figura 11. Inducción de Vldlr en hígado mediante el tratamiento con SEQ ID NO: 61. Se investigaron las mismas muestras de ARN de hígado que en el ejemplo (figura 10) para determinar la inducción de Vldlr.

Figura 12. Estabilidad de dúplex miR-122a/SEQ ID NO: 61 en plasma de ratón. Se sometió a prueba la estabilidad de SEQ ID NO: 61 y dúplex SEQ ID NO: 61/miR-122a en plasma de ratón a 37°C a lo largo de 96 horas. En la figura 12 se muestra una PAGE teñida con SYBR-Gold.

Figura 13. El secuestro de miR-122a maduro mediante SEQ ID NO: 61 conduce a la formación de dúplex. En la figura 13 se muestra una membrana analizada con sonda con una sonda específica para miR-122a (panel superior) y analizada con sonda de nuevo con una sonda específica para Let-7 (panel inferior). Con la sonda para miR-122, pudieron detectarse dos bandas, una correspondiente a miR-122 maduro y una correspondiente a un dúplex entre SEQ ID NO: 61 y miR-122.

Figura 14. Secuestro de miR-122a mediante SEQ ID NO: 61 junto con la distribución de SEQ ID NO: 61 evaluado mediante hibridación *in situ* de secciones de hígado. Criosecciones de hígado de animales tratados fueron

Figura 15. Expresión génica en hígado en ratones tratados con compuesto anti-miR de ANB para miR-122. Se compararon ratones tratados con solución salina y compuesto anti-miR de ANB mediante obtención de perfiles de expresión de todo el genoma usando matrices Mouse Genome 430 2.0 de Affymetrix. (a,1) Se muestra el número de sondas que presentan expresión diferencial en muestras de hígado de ratones tratados con compuesto anti-miR-122 de ANB y solución salina 24 horas tras el tratamiento. (b,2) La aparición de secuencia de semilla de miR-122 en genes expresados de manera diferencial. El gráfico muestra el porcentaje de transcritos con al menos una secuencia de reconocimiento de semilla de miR-122 en su 3' UTR. Azar: se generaron secuencias al azar y se buscaron secuencias de reconocimiento de semilla de miR-122. Perfiles de expresión génica en hígado temporal en ratones tratados con compuesto anti-miR de ANB. Se trataron ratones con 25 mg/kg/día de compuesto anti-miR de ANB o solución salina durante tres días consecutivos y se sacrificaron 1, 2 ó 3 semanas tras la última dosis. También se incluyen los valores de los animales sacrificados 24 horas tras la última dosis. (c,3) También se sometieron muestras de ARN de diferentes puntos de tiempo a obtención de perfiles de expresión. Análisis de agrupaciones jerárquicas de perfiles de expresión de genes identificados como que se expresan de manera diferencial entre ratones tratados con compuesto anti-miR de ANB y solución salina 24 horas, una semana o tres semanas tras el tratamiento. (d,4) Se realizó un seguimiento a lo largo del tiempo de perfiles de expresión de genes identificados como que se expresan de manera diferencial entre ratones tratados con compuesto anti-miR de ANB y solución salina 24 horas tras el tratamiento. Las razones de expresión de genes regulados por incremento y por disminución en ratones tratados con compuesto anti-miR de ANB se aproximan a 1 a lo largo del transcurso de tiempo, lo que indica un efecto reversible del tratamiento con compuesto anti-miR de ANB.

Figura 16. El efecto del tratamiento con SEQ ID NO: 61 y 3595 sobre los niveles de miR-122 en hígados de ratones.

Figura 17. El efecto del tratamiento con SEQ ID NO: 61 y 3595 sobre los niveles de aldolasa A en hígados de ratones.

Figura 18. El efecto del tratamiento con SEQ ID NO: 61 y 3595 sobre los niveles de Bckdk en hígados de ratones.

Figura 19. El efecto del tratamiento con SEQ ID NO: 61 y 3595 sobre los niveles de CD320 en hígados de ratones.

Figura 20. El efecto del tratamiento con SEQ ID NO: 61 y 3595 sobre los niveles de Ndr3 en hígados de ratones.

Figura 21. El efecto del tratamiento a largo plazo con SEQ ID NO: 63 sobre el colesterol en plasma total en ratones hipercolesterolémicos y normales. Se obtuvieron muestras semanales de plasma sanguíneo de los ratones tratados con SEQ ID NO: 63 y con control de solución salina una vez por semana seguido por evaluación del colesterol en plasma total. Se trataron los ratones con 5 mg/kg de SEQ ID NO: 63, control de apareamiento erróneo o solución salina dos veces por semana. Se trataron los ratones normales en paralelo.

Figura 22. El efecto del tratamiento a largo plazo con SEQ ID NO: 63 sobre los niveles de miR-122 en ratones hipercolesterolémicos y normales.

Figura 23. El efecto del tratamiento a largo plazo con SEQ ID NO: 63 sobre los niveles de aldolasa A en ratones hipercolesterolémicos y normales.

Figura 24. El efecto del tratamiento a largo plazo con SEQ ID NO: 63 sobre los niveles de Bckdk en ratones hipercolesterolémicos y normales.

Figura 25. El efecto del tratamiento a largo plazo con SEQ ID NO: 63 sobre los niveles de AST en ratones hipercolesterolémicos y normales.

Figura 26. El efecto del tratamiento a largo plazo con SEQ ID NO: 63 sobre los niveles de ALT en ratones hipercolesterolémicos y normales.

Figura 27. Desrepresión funcional de luciferasa de renilla con diana de miR-122 mediante oligonucleótidos que

bloquean miR-122 en una línea celular que expresa miR-122 de manera endógena, Huh-7. “Diana de miR-122” es el plásmido correspondiente a diana de miR-122 pero que no se transfecta conjuntamente con oligos que bloquean miR-122 y por tanto representa la expresión de luciferasa de renilla completamente reprimida por miR-122.

5 Figura 28. Diagrama que ilustra la alineación de un oligonucleótido según la invención y una diana de microARN (miR-122).

Figura 29. Se midió la expresión de ARNm de apoB-100 mediante qPCR normalizada con respecto al gen de mantenimiento GAPDH y se presenta con respecto al grupo de solución salina. Se administraron dosis a ratones (n = 3 ó 5) 3 días consecutivos y se sacrificaron 24 horas tras la última dosis, se aisló el hígado y se analizó. SEQ ID NO se refiere a las indicadas en la tabla 1 del ejemplo 2.

Figura 30. Niveles de colesterol en suero en el sacrificio (día 3) tras administrar la dosis de oligonucleótidos antisentido de apoB-100 de diferente longitud. SEQ ID NO se refiere a las indicadas en la tabla 1 del ejemplo 2.

Figura 31. Se midió la expresión de ARNm de apoB-100 mediante qPCR normalizada con respecto al gen de mantenimiento GAPDH y se presenta con respecto al grupo de solución salina. Se administraron dosis a ratones (n = 5) una vez y se sacrificaron en días diferentes tras la dosis, se aisló el hígado y se analizó. SEQ ID NO se refiere a las indicadas en la tabla 1 del ejemplo 2.

Figura 32. Colesterol total en suero medido en el sacrificio (días 1, 3, 5, 6 y 8 tras la administración de oligos de apoB100) usando un kit ABX pentra, n = 5. SEQ ID NO se refiere a las indicadas en la tabla 1 del ejemplo 2.

Figura 33. Se midió la expresión de ARNm de apoB-100 mediante qPCR normalizada con respecto al gen de mantenimiento GAPDH y se presenta con respecto al grupo de solución salina. Se administraron dosis a ratones (n = 5) una vez y se sacrificaron en días diferentes tras la dosis, se aisló el hígado y se analizó. SEQ ID NO se refiere a las indicadas en la tabla 1 del ejemplo 2.

Figura 34. Colesterol total en suero medido en el sacrificio (días 1, 3, 5, 6, 8 y 16 tras la administración de oligos antisentido de apoB-100) usando un kit ABX pentra, n = 5. SEQ ID NO se refiere a las indicadas en la tabla 1 del ejemplo 2.

Figura 35. Se midió la expresión de ARNm de apoB-100 mediante qPCR normalizada con respecto al gen de mantenimiento GAPDH y se presenta con respecto al grupo de solución salina. Se administraron dosis de 1 ó 5 mg/kg a ratones (n = 5) 3 días consecutivos y se sacrificaron 24 horas tras la última dosis (día 3), se aisló el hígado y se analizó. SEQ ID NO se refiere a las indicadas en la tabla 1 del ejemplo 2.

Figura 36. Colesterol total en suero medido en el sacrificio (día 3 tras la administración de apoB-100) usando un kit ABX pentra, n = 5. SEQ ID NO se refiere a las indicadas en la tabla 1 del ejemplo 2.

Descripción detallada de la invención

Términos usados en la descripción

45 “VHC” significa virus de la hepatitis C.

El término “compuesto oligomérico”, que es intercambiable con el término “oligonucleótido”, “oligo” y “compuesto oligonucleotídico”, se refieren, en el contexto de la presente invención, a un oligómero, es decir un polímero de ácido nucleico (por ejemplo ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN)) o análogo de ácido nucleico de los conocidos en la técnica, preferiblemente ácido nucleico bloqueado (ANB), o una mezcla de los mismos). Este término incluye oligonucleótidos compuestos por nucleobases que se producen de manera natural, azúcares y enlaces internucleosídicos (estructura principal) así como oligonucleótidos que tienen porciones que no se producen de manera natural que funcionan de manera similar o con funciones específicas mejoradas. Con frecuencia se prefieren oligonucleótidos total o parcialmente modificados o sustituidos con respecto a formas nativas debido a varias propiedades deseables de tales oligonucleótidos, tales como, por ejemplo, la capacidad para penetrar en una membrana celular, buena resistencia frente a nucleasas extra e intracelulares, alta afinidad y especificidad para la diana de ácido nucleico. Se prefiere particularmente el análogo de ANB, por ejemplo, con respecto a las propiedades anteriormente mencionadas. Por tanto, en una realización altamente preferible, los términos “compuesto oligomérico”, “oligonucleótido”, “oligo” y “compuesto oligonucleotídico” según la invención son compuestos que se construyen con unidades tanto de nucleótido como de análogo de nucleótido, tales como las unidades de ANB, para formar un compuesto polimérico de entre 12-50 nucleótidos/análogos de nucleótido (oligómero).

El término “unidad” se entiende como un monómero.

65 En una realización el inhibidor de ensamblaje de VLDL es un inhibidor de una molécula implicada en, tal como una molécula que regula, el ensamblaje de VLDL, tal como, en un ejemplo no limitativo, una molécula

seleccionada del grupo que consiste en apoB-48, apoB-100, apoC, apoE, MTP (proteína de transferencia microsomal), TGH (triacilglicerol hidrolasa), ACAT2 (acil-COA:colesterol acil transferasa de hígado y de intestino), fosfolipasa D, iPLA2 (fosfolipasa citosólica independiente de calcio A2).

5 En una realización el inhibidor de ensamblaje de VLDL es un inhibidor de ApoB.

En una realización el inhibidor de ensamblaje de VLDL es un inhibidor de MTP (proteína de transferencia microsomal).

10 En una realización el inhibidor de ensamblaje de VLDL es un compuesto oligomérico antisentido que comprende una secuencia de nucleobases que es complementaria a una región correspondiente del ARNm que codifica para dicha molécula implicada en el ensamblaje de VLDL.

15 En una realización el inhibidor de ensamblaje de VLDL se selecciona de los inhibidores de ApoB-100, tales como a los que se hace referencia en el presente documento, tales como SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 103 o uno cualquiera de los compuestos dados a conocer en la tabla 1.

20 En una realización el compuesto oligomérico antisentido que inhibe el ensamblaje de VLDL tiene una longitud de entre 10 y 23 nucleobases, tal como 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ó 23 nucleobases.

25 En una realización el compuesto oligomérico antisentido que inhibe el ensamblaje de VLDL es un oligonucleótido gápmero que consiste en, o comprende, una secuencia de nucleobases de fórmula 5' A - B - C 3' u, opcionalmente, 5' A-B-C-D 3', en la que: la región A consiste en, o comprende, entre 1 y 5 análogos de nucleótido; la región B comprende 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 nucleobases que, cuando se forman en un dúplex con un ARNm complementario, pueden reclutar ARNasaH, tal como unidad de nucleótido de ADN; la región C consiste en, o comprende, entre 1 y 5 análogos de nucleótido; y cuando está presente, la región D consiste en 1, 2 ó 3 unidades de ADN.

30 En una realización los análogos de nucleótido presentes en las regiones A y C se seleccionan independientemente del grupo que consiste en 2'-O-alkil-unidad de ARN, 2'-OMe-unidad de ARN, 2'-amino-unidad de ADN, 2'-fluoro-unidad de ADN, unidad de ANB, unidad de ANP, unidad de ANH y unidad de ANI.

En una realización los análogos de nucleótido presentes en las regiones A y C son todos iguales y son preferiblemente unidades de ANB.

35 Compuestos que inhiben ApoB para su uso en la invención

Compuesto antisentido de apoB de ANB: un oligonucleótido antisentido que contiene ANB que selecciona como diana apoB100.

40 Los compuestos que inhiben ApoB100 útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, compuestos tales como los dados a conocer en los documentos WO 2007/031081, US 4920115, US 5919795, US 6121283, EP 1099442, US 2006040989, WO 2005058824, WO 2006010423, US 2006035858, WO 2006020676, WO 2006036916, WO 2006053430, WO 2006113910, US 20050712211, WO 2000097662, WO 2003011887 y WO 2004044181. Se prefieren especialmente los compuestos dados a conocer en los documentos US 60/896.419 y US 60/977409.

En los documentos WO 2006/036916, WO 2003/011887, WO 2004/044181 se dan a conocer compuestos adicionales que pueden ser útiles en la presente invención.

50 En esta sección referente a compuestos que inhiben apoB para su uso en la invención, SEQ ID NO se refiere a las indicadas en la tabla 1 del ejemplo 2.

55 Los compuestos que inhiben apoB-100 de la presente invención emplean preferiblemente compuestos oligoméricos, particularmente oligonucleótidos antisentido, para su uso en la modulación de la función de moléculas de ácido nucleico que codifican para apolipoproteína B (tal como Apo-B100 y/o ApoB-48). La modulación es en última instancia un cambio en la cantidad de apolipoproteína B producida. En una realización esto se logra proporcionando compuestos oligoméricos, que se hibridan específicamente con ácidos nucleicos, tales como ARN mensajero, que codifica para apolipoproteína B. La modulación da preferiblemente como resultado la inhibición de la expresión de apolipoproteína B, es decir conduce a una disminución en el número de proteínas funcionales producidas.

60 Se identifican compuestos oligoméricos, que modulan la expresión de la diana, mediante experimentación o mediante diseño racional basándose en información de secuencia sobre la diana y saber hacer sobre cómo diseñar de la mejor manera un compuesto oligonucleotídico contra una diana deseada. Las secuencias de estos compuestos son realizaciones preferidas de la invención. Asimismo, los motivos de secuencia en la diana con los que son complementarios estos compuestos oligoméricos preferidos (denominados "puntos calientes") son sitios preferidos para la selección como diana.

- En una realización, el compuesto oligomérico antisentido que inhibe el ensamblaje de VLDL tiene una longitud de entre 10 y 23 nucleobases, tal como 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ó 23 nucleobases. Normalmente, las nucleobases forman una secuencia de nucleobases contigua. En una realización, el compuesto oligomérico que inhibe el ensamblaje de VLDL consiste en un total de 10-15 nucleobases, en el que la secuencia de nucleobases de dicho compuesto está presente en SEQ ID NO 1, en el que dicho compuesto comprende al menos 3 análogos de nucleótido.
- En una realización, el compuesto oligomérico antisentido que inhibe el ensamblaje de VLDL es un oligonucleótido gápmero que consiste en, o comprende, una secuencia de nucleobases de fórmula 5' A - B - C 3' u, opcionalmente, 5' A-B-C-D 3', en la que: la región A consiste en, o comprende, entre 1 y 5 análogos de nucleótido; la región B comprende 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 nucleobases que, cuando se forman en un dúplex con un ARNm complementario, pueden reclutar ARNasaH, tal como unidad de nucleótido de ADN; la región C consiste en, o comprende, entre 1 y 5 análogos de nucleótido; y cuando está presente, la región D consiste en 1, 2 ó 3 unidades de ADN.
- El gápmero puede comprender, o consistir en, en un sentido de 5' a 3' i) región A: un tramo de 2-4 análogos de nucleótido, seguido por ii) región B: un tramo de 6-11 nucleótidos (tales como nucleótidos de ADN), que está seguido por iii) región C: un tramo de 2-4 análogos de nucleótido, y opcionalmente iv) uno o dos nucleótidos (D).
- En una realización la región A tiene una longitud de 1 análogo de nucleótido.
- En una realización la región A tiene una longitud de 2 análogos de nucleótido.
- En una realización la región A tiene una longitud de 3 análogos de nucleótido.
- En una realización la región A tiene una longitud de 4 análogos de nucleótido.
- En una realización la región C tiene una longitud de 1 análogo de nucleótido.
- En una realización la región C tiene una longitud de 2 análogos de nucleótido.
- En una realización la región C tiene una longitud de 3 análogos de nucleótido.
- En una realización la región C tiene una longitud de 4 análogos de nucleótido.
- En una realización la región B tiene una longitud de entre 7 y 10 nucleótidos (tales como nucleótidos de ADN), tal como 8 ó 9 nucleótidos (tales como nucleótidos de ADN).
- En una realización el compuesto que inhibe el ensamblaje de VLDL tiene una longitud de desde 12-15 nucleobases.
- En una realización el compuesto que inhibe el ensamblaje de VLDL tiene una longitud de 12, 13 ó 14 nucleobases.
- En una realización la secuencia de nucleobases del compuesto que inhibe el ensamblaje de VLDL comprende un grupo de enlace internucleobases seleccionado del grupo que consiste en un grupo fosfato, un grupo fosfodiéster, un grupo fosforotioato y un grupo boranofosfato, el enlace internucleosídico puede ser -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-.
- En una realización, los grupos de enlace internucleobases entre las unidades de nucleobase de la secuencia de nucleobases del compuesto que inhibe el ensamblaje de VLDL se seleccionan independientemente de los grupos de enlace o bien fosforotioato o bien fosfodiéster.
- En una realización la región A comprende al menos un enlace fosfodiéster entre dos unidades de análogo de nucleótido o una unidad de análogo de nucleótido y una unidad de nucleótido. Se entenderá que el grupo de enlace entre un análogo de nucleótido y una unidad de nucleótido en este contexto se refiere al grupo de enlace entre las regiones A y B.
- En una realización la región C comprende al menos un enlace fosfodiéster entre dos unidades de análogo de nucleótido o una unidad de análogo de nucleótido y una unidad de nucleótido. Se entenderá que el grupo de enlace entre un análogo de nucleótido y una unidad de nucleótido en este contexto se refiere al grupo de enlace entre las regiones B y C.
- En una realización los enlaces internucleotídicos entre los nucleótidos de la región B son fosforotioato.
- En una realización el enlace internucleobases entre el análogo de nucleótido en 3' de A y el nucleótido en 5' de la región B es un fosforotioato.
- En una realización el enlace internucleobases entre el nucleótido en 3' de la región B y el análogo de nucleótido en

5' de la región C es un fosforotioato.

En una realización el enlace internucleobases entre el análogo de nucleótido en 3' de A y el nucleótido en 5' de la región B es un fosfodiéster.

5 En una realización el enlace internucleobases entre el nucleótido en 3' de la región B y el análogo de nucleótido en 5' de la región C es un fosfodiéster.

10 En una realización el enlace internucleobases entre los dos análogos de nucleótido en 5' de la región A son fosfodiéster.

En una realización el enlace internucleobases entre los dos análogos de nucleótido en 3' de la región C son fosfodiéster.

15 En una realización el enlace internucleobases entre los dos análogos de nucleótido en 3' de la región A son fosfodiéster.

20 En una realización el enlace internucleobases entre los dos análogos de nucleótido en 5' de la región C son fosfodiéster.

En una realización la región A tiene una longitud de 4 análogos de nucleótido y el enlace internucleobases entre los dos análogos de nucleótido centrales de la región A son fosfodiéster.

25 En una realización la región C tiene una longitud de 4 análogos de nucleótido y el enlace internucleobases entre los dos análogos de nucleótido centrales de la región C son fosfodiéster.

En una realización todos los enlaces internucleobases entre análogos de nucleótido presentes en el compuesto de la invención son fosfodiéster.

30 En una realización, tal como las realizaciones a las que se hizo referencia anteriormente, según sea adecuado y cuando no se indique específicamente, todos los demás enlaces internucleobases son o bien fosfodiéster o bien fosforotioato o bien, en una realización separada, una mezcla de los mismos.

35 En una realización todos los grupos de enlace internucleobases son fosforotioato.

40 En una realización los análogos de nucleótido presentes dentro del compuesto que inhibe el ensamblaje de VLDL, tal como en las regiones A y C, se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: 2'-O-alkil-monómeros de ARN, 2'-amino-monómeros de ADN, 2'-fluoro-monómeros de ADN, monómeros de ANB, monómeros de ácido arabinonucleico (AAN), 2'-fluoro-monómeros de AAN, monómeros de ANH, monómeros de ANI.

En una realización los análogos de nucleótido se seleccionan independientemente del grupo que consiste en 2'-MOE-ARN (2'-O-metoxietil-ARN), 2'-fluoro-ADN y ANB.

45 En una realización al menos uno de dichos análogos de nucleótido es un ácido nucleico bloqueado (ANB).

En una realización al menos uno de dichos análogos de nucleótido es 2'-MOE-ARN, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 2'-MOE-unidades de nucleobase de ARN.

50 En una realización al menos uno de dichos análogos de nucleótido es 2'-fluoro-ADN, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 2'-fluoro-unidades de nucleobase de ADN.

55 En una realización 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de los análogos de nucleótido son ANB y cualquier análogo de nucleótido restante puede seleccionarse de los grupos de análogos de nucleótido a los que se hace referencia en una cualquiera de las reivindicaciones 26 - 30.

En una realización todos los análogos de nucleótido son ANB.

60 En una realización los análogos de nucleótido de ANB presentes dentro del compuesto que inhibe el ensamblaje de VLDL se seleccionan de beta-D-oxi-ANB, alfa-L-oxi-ANB, beta-D-amino-ANB y beta-D-tio-ANB.

En una realización la secuencia de nucleobases se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15.

65 En una realización el compuesto que inhibe el ensamblaje de VLDL se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25.

En una realización el compuesto que inhibe el ensamblaje de VLDL se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, y 33.

5 En una realización el compuesto que inhibe el ensamblaje de VLDL se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40.

La invención también se refiere a un conjugado que comprende el compuesto que inhibe el ensamblaje de VLDL y al menos un resto distinto de nucleótido o distinto de polinucleótido unido de manera covalente a dicho compuesto.

10 En una realización referente al conjugado, el resto distinto de nucleótido o distinto de polinucleótido consiste en, o comprende, un grupo esteroide tal como colesterol.

En una realización, el medicamento puede comprender además al menos un compuesto hipocolesterolemizante.

15 Pueden seleccionarse compuestos hipocolesterolemizantes adecuados de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en resinas secuestradoras de sales biliares (por ejemplo, colestiramina, colestipol y clorhidrato de colestevlam), inhibidores de HMGCoA-reductasa (por ejemplo, lovastatina, cerivastatina, prevastatina, atorvastatina, simvastatina y fluvastatina), ácido nicotínico, derivados de ácido fibrótico (por ejemplo, clofibrato, gemfibrozilo, fenofibrato, bezafibrato y ciprofibrato), probucol, neomicina, dextrotiroxina, ésteres de estanoles vegetales, 20 inhibidores de la absorción de colesterol (por ejemplo, ezetimiba), implitapida, inhibidores de transportadores de ácidos biliares (transportadores de ácidos biliares dependientes de sodio apicales), reguladores de CYP7a hepática, agentes terapéuticos de sustitución de estrógeno (por ejemplo, tamoxifeno), y antiinflamatorios (por ejemplo, glucocorticoides). Pueden preferirse particularmente combinaciones con estatinas.

25 En una realización preferida, los oligonucleótidos pueden hibridarse con el ácido nucleico diana, tal como un miR-122 o ARNm de ApoB, para formar un dúplex con una T_f de al menos 37°C, tal como al menos 40°C, al menos 50°C, al menos 55°C o al menos 60°C. En un aspecto la T_f es de entre 37°C y 80°C, tal como entre 40 ó 50 y 70°C.

Medición de la T_f

30 Se mezcla una disolución de 3 μ M del compuesto en fosfato de sodio 10 mM/NaCl 100 mM/EDTA 0,1 nM, pH 7,0, con su oligonucleótido de ADN o ARN complementario a una concentración de 3 μ M en fosfato de sodio 10 mM/NaCl 100 mM/EDTA 0,1 nM, pH 7,0 a 90°C durante un minuto y se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Entonces se determina la curva de fusión del dúplex midiendo la absorbancia a 260 nm con una tasa de calentamiento de 1°C/min en el intervalo de 25 a 95°C. Se mide la T_f como el máximo de la primera derivado de la 35 curva de fusión.

Los compuestos oligoméricos son preferiblemente compuestos oligoméricos antisentido, también denominados "oligonucleótidos antisentido" e "inhibidores antisentido".

40 Los inhibidores antisentido son preferiblemente oligonucleótidos monocatenarios. Los oligonucleótidos monocatenarios son preferiblemente complementarios a la región correspondiente del ácido nucleico diana.

45 Normalmente, los oligonucleótidos "antisentido" monocatenarios interactúan específicamente con el ARNm del gen diana, o bien provocando la degradación dirigida del ARNm, por ejemplo mediante el mecanismo de RNasaH, o bien evitando de otro modo la traducción.

En una realización el compuesto oligomérico según la invención puede seleccionar como diana el ADN que codifica para ApoB de mamífero.

50 El término "nucleobase" tal como se usa en el presente documento se refiere a nucleótidos de ADN y ARN y análogos de nucleótido de los mismos.

55 El compuesto oligomérico según la invención comprende preferiblemente al menos tres análogos de nucleótido. Los al menos tres análogos de nucleótido son preferiblemente análogos de nucleótido de ácido nucleico bloqueado, y el compuesto oligomérico que comprende tales análogos de nucleótido se denomina en el presente documento "compuesto oligomérico de ANB", "compuesto oligonucleotídico de ANB" y "oligonucleótido de ANB".

60 Los análogos de nucleótido adecuados para su uso en el oligonucleótido al que se hace referencia en el presente documento se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: 2'-O-alquil-monómeros de ARN, 2'-amino-monómeros de ADN, 2'-fluoro-monómeros de ADN, monómeros de ANB, monómeros de ácido arabinonucleico (AAN), 2'-fluoro-monómeros de AAN, monómeros de ANH, monómeros de ANI.

65 Se prefieren 2'-O-metoxietil-ARN, 2'-fluoro-monómeros de ADN y ANB y como tal el oligonucleótido de la invención puede comprender análogos de nucleótido que se seleccionan independientemente de estos tres tipos de análogos o puede comprender sólo un tipo seleccionado de los tres tipos. En una realización más preferida el oligonucleótido

sólo comprende análogos de nucleótido de ANB y nucleótidos (nucleótidos de ARN o ADN, lo más preferiblemente de ADN).

La invención se refiere a un compuesto oligomérico que consiste en 10-15, tal como 11-15, 12-15, 13-15, en particular 12-14 nucleobases, en el que la secuencia de nucleobases está presente en SEQ ID NO. 1. En la tabla 1 se facilita la lista de tales secuencias. Grupos preferidos de secuencias presentes en SEQ ID NO: 1 son SEQ ID NO: 4-15.

Los términos “correspondiente a” / “corresponde a” se refieren a la comparación entre la secuencia combinada de nucleótidos y análogos de nucleótido del compuesto oligomérico de la invención o subsecuencia de la misma y la secuencia de nucleótidos equivalente de, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de apolipoproteína B (es decir la diana de ácido nucleico). Se comparan análogos de nucleótido directamente con sus nucleótidos equivalentes. Por tanto, los compuestos de la invención pueden tener una secuencia que está presente (es decir corresponde a) la secuencia de ApoB humana, es decir SEQ ID NO: 1.

Grupos preferidos de secuencias presentes en SEQ ID NO: 1 son SEQ ID NO: 4-15.

Secuencias de oligonucleótidos antisentido de ApoB preferidas para su uso en la invención:

SEQ ID NO: 31: 5'- G_s^o C_s^o a_s t_s t_s g_s g_s t_s a_s t_s T_s^o mC^o A^o -3'

SEQ ID NO: 26: 5'- G_s^o mC_s^o a_s t_s t_s g_s g_s t_s a_s t_s T_s^o mC_s^o A^o -3'

SEQ ID NO: 103: 5'- mC_s^o A_s^o G_s^o c_s a_s t_s t_s g_s g_s t_s a_s t_s T_s^o mC_s^o A_s^o g -3'-

En otra realización preferida, el inhibidor de ensamblaje de VLDL que va a usarse en combinación con un inhibidor de miR-122 es un inhibidor de MTP, tal como BMS-2101038 (Huan *et al.* 2007, PNAS, vol. 104 (14) página 5848-5853).

En otra realización preferida, el inhibidor de ensamblaje de VLDL que va a usarse en combinación con un inhibidor de miR-122 es un inhibidor de una molécula importante para el ensamblaje de VLDL, tal como, en un ejemplo no limitativo, apoB-48, apoB-100, apoC, apoE, MTP (proteína de transferencia microsomal), TGH (triacilglicerol hidrolasa), ACAT2 (acil-CoA:colesterol acil transferasa del hígado y del intestino), fosfolipasa D, iPLA2 (fosfolipasa citosólica independiente de calcio A2).

Compuestos que inhiben miR-122 para su uso en la invención.

El inhibidor de miR-122 es un oligonucleótido antisentido. El inhibidor de miR-122 tiene una longitud de 15 nucleobases. El inhibidor de miR-122 comprende una secuencia de nucleobases contigua que es complementaria a la región correspondiente de miR-122. El inhibidor de miR-122 es SEQ ID NO: 63.

En una realización el inhibidor de ensamblaje de VLDL comprende una o más unidades de análogo de nucleótido (monómero), tales como un análogo de nucleótido seleccionado del grupo que consiste en 2'-O-alkil-unidad de ARN, 2'-OMe-unidad de ARN, 2'-amino-unidad de ADN, 2'-fluoro-unidad de ADN, unidad de ANB, unidad de ANP, unidad de ANH y unidad de ANI.

Se dan a conocer inhibidores de miR-122 en los documentos WO 2005/107816A2, WO 2007/021896, WO 2007/0049547 y WO 2006/020768. Se dan a conocer compuestos adicionales que inhiben miR-122 en los documentos WO 03/029459, US 2005/0182005, US 2005/0227934, US 20050261218, Boutla *et al.* 2003 (Nucleic Acids Research 31: 4973-4980), Lecellier *et al.* Science 2005, 308, 557-560, Naguibneva *et al.* Nature Cell Biology 2006 8 (3), 278-84. El inhibidor de miR-122 es un oligómero de ANB, es decir un compuesto anti-miR-122 de ANB: un oligonucleótido antisentido que contiene ANB que selecciona como diana miR-122:

Se dan a conocer compuestos que inhiben miR-122 en los documentos WO 2007/112753 y WO 2007/112754.

El oligonucleótido (oligonucleótido antisentido) que inhibe miR-122 es monocatenario. Por tanto, se entenderá que dentro del contexto de la invención el término oligonucleótido puede usarse de manera intercambiable con el término oligonucleótido monocatenario.

Los oligonucleótidos cortos son particularmente eficaces para aliviar la represión de miARN-122 *in vivo*. Se encuentra que la incorporación de análogos de nucleótido de alta afinidad en los oligonucleótidos da como resultado moléculas anti-microARN altamente eficaces que parecen funcionar mediante la formación de dúplex casi irreversibles con la diana de miARN, en vez de mecanismos basados en escisión de ARN, tales como mecanismos asociados con ARNasaH o RISC.

El oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende una región de secuencia de nucleobases contigua que es

complementaria en un 100% a la región de semilla de microARN-122 humano.

El oligonucleótido monocatenario según la invención es complementario a parte de la secuencia de microARN-122 humano maduro.

5 En una realización, la décima nucleobase del oligonucleótido que inhibe miR-122, contando desde el extremo 3', es un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB.

10 En una realización, tanto la novena como la décima nucleobase del oligonucleótido que inhibe miR-122, calculada desde el extremo 3', es un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB.

15 En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 no comprende una región de más de 5 unidades de nucleótido de ADN consecutivas. En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 no comprende una región de más de 6 unidades de nucleótido de ADN consecutivas. En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 no comprende una región de más de 7 unidades de nucleótido de ADN consecutivas. En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 no comprende una región de más de 8 unidades de nucleótido de ADN consecutivas. En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 no comprende una región de más de 3 unidades de nucleótido de ADN consecutivas. En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 no comprende una región de más de 2 unidades de nucleótido de ADN consecutivas.

20 En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos una región que consiste en al menos dos unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tales como al menos dos unidades de ANB consecutivas.

25 En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos una región que consiste en al menos tres unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tales como al menos tres unidades de ANB consecutivas.

30 En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 no comprende una región de más de 7 unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tales como las unidades de ANB. En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 no comprende una región de más de 6 unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tales como las unidades de ANB. En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 no comprende una región de más de 5 unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tales como las unidades de ANB. En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 no comprende una región de más de 4 unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tales como las unidades de ANB. En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 no comprende una región de más de 3 unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tales como las unidades de ANB. En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 no comprende una región de más de 2 unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tales como las unidades de ANB.

40 En una realización, la primera o segunda nucleobase en 3' del oligonucleótido que inhibe miR-122 corresponde al segundo nucleótido en 5' de la secuencia de microARN.

En una realización, las unidades de nucleobase 1 a 6 (inclusive) del oligonucleótido que inhibe miR-122, medidas desde el extremo 3' de la región del oligonucleótido que inhibe miR-122, son complementarias a la secuencia de región de semilla de microARN.

45 En una realización, las unidades de nucleobase 1 a 7 (inclusive) del oligonucleótido que inhibe miR-122, medidas desde el extremo 3' de la región del oligonucleótido que inhibe miR-122, son complementarias a la secuencia de región de semilla de microARN.

50 En una realización, las unidades de nucleobase 2 a 7 (inclusive) del oligonucleótido que inhibe miR-122, medidas desde el extremo 3' de la región del oligonucleótido que inhibe miR-122, son complementarias a la secuencia de región de semilla de microARN.

55 En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos una unidad de análogo de nucleótido, tal como al menos una unidad de ANB, en una posición que está dentro de la región complementaria a la región de semilla de miARN. En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 puede comprender entre una y 6 o entre 1 y 7 unidades de análogo de nucleótido, tales como entre 1 y 6 y 1 y 7 unidades de ANB, en una posición que está dentro de la región complementaria a la región de semilla de miARN.

60 En una realización, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido que inhibe miR-122, que es complementaria a la secuencia de la región de semilla de microARN, se selecciona del grupo que consiste en (X)Xxxxxx, (X)xXXXXx, (X)xxXxxx, (X)xxxXxx, (X)xxxxXx y (X)xxxxxX, según se lee en un sentido 3'-5', en la que "X" indica un análogo de nucleótido, (X) indica un análogo de nucleótido opcional, tal como una unidad de ANB, y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

65 En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos dos unidades de análogo de nucleótido, tales como al menos dos unidades de ANB, en posiciones que son complementarias a la región de

semilla de miARN.

- En una realización, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido que inhibe miR-122, que es complementaria a la secuencia de la región de semilla de microARN, se selecciona del grupo que consiste en (X)XXXXxx, (X)XxXxxx, (X)XxxXxx, (X)XxxxXx, (X)XxxxxX, (X)xXXxxx, (X)x:XXxxx, (X)xXxxXx, (X)xXxxxX, (X)xxXXxx, (X)xxXxXx, (X)xxXxxX, (X)xxxXXx, (X)xxxXxX y (X)xxxxXX, en la que "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB, (X) indica un análogo de nucleótido opcional, tal como una unidad de ANB, y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos tres unidades de análogo de nucleótido, tales como al menos tres unidades de ANB, en posiciones que son complementarias a la región de semilla de miARN.
- En una realización, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido que inhibe miR-122, que es complementaria a la secuencia de la región de semilla de microARN, se selecciona del grupo que consiste en (X)XXXXxx, (X)xXXxxx, (X) xxXXxx, (X)xxxXXX, (X)XXxXxx, (X)XXxxXx, (X)XXxxxX, (X)xXXxXx, (X)xXXxxX, (X)xxXXxX, (X)XxXXxx, (X)XxxXXx, (X)XxxxXX, (X)xXxXXx, (X)xXxxXX, (X)xxXxXX, (X)xXxXxX y (X)XxXxXx, en la que "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB, (X) indica un análogo de nucleótido opcional, tal como una unidad de ANB, y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos cuatro unidades de análogo de nucleótido, tales como al menos cuatro unidades de ANB, en posiciones que son complementarias a la región de semilla de miARN.
- En una realización la secuencia de nucleobases del oligonucleótido que inhibe miR-122, que es complementaria a la secuencia de la región de semilla de microARN, se selecciona del grupo que consiste en (X)xxXXX, (X)xXxXXX, (X) xXXxXX, (X)xXXXxX, (X)xXXXXx, (X)XxxXXXX, (X)XxXxXX, (X)XxXXxX, (X)XxXXx, (X)XXxxXX, (X)XXxXxX, (X) XXxXXx, (X)XXXxxX, (X)XXXxXx y (X)XXXXxx, en la que "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB, (X) indica un análogo de nucleótido opcional, tal como una unidad de ANB, y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos cinco unidades de análogo de nucleótido, tales como al menos cinco unidades de ANB, en posiciones que son complementarias a la región de semilla de miARN.
- En una realización, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido que inhibe miR-122, que es complementaria a la secuencia de la región de semilla de microARN, se selecciona del grupo que consiste en (X)xXXXXX, (X)XxXXXX, (X) XXxXXX, (X)XXXxXX, (X)XXXXxX y (X)XXXXxx, en la que "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB, (X) indica un análogo de nucleótido opcional, tal como una unidad de ANB, y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende seis o siete unidades de análogo de nucleótido, tales como seis o siete unidades de ANB, en posiciones que son complementarias a la región de semilla de miARN.
- En una realización, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido que inhibe miR-122, que es complementaria a la secuencia de la región de semilla de microARN, se selecciona del grupo que consiste en XXXXXX, Xxxxxxxx, XxxXXXX, XXXxXXX, XXXXxx, XXXXxX y XXXXXXx, en la que "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB, tal como una unidad de ANB, y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- En una realización, el motivo de dos nucleobases en las posiciones 7 a 8, contando desde el extremo 3' del oligonucleótido que inhibe miR-122, se selecciona del grupo que consiste en xx, XX, xX y Xx, en el que "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB, tal como una unidad de ANB, y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- En una realización, el motivo de dos nucleobases en las posiciones 7 a 8, contando desde el extremo 3' del oligonucleótido que inhibe miR-122, se selecciona del grupo que consiste en XX, xX y Xx, en el que "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB, tal como una unidad de ANB, y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos 12 nucleobases y en el que el motivo de dos nucleobases en las posiciones 11 a 12, contando desde el extremo 3' del oligonucleótido que inhibe miR-122, se selecciona del grupo que consiste en xx, XX, xX y Xx, en el que "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB, tal como una unidad de ANB, y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos 12 nucleobases y en el que el motivo

de dos nucleobases en las posiciones 11 a 12, contando desde el extremo 3' del oligonucleótido que inhibe miR-122, se selecciona del grupo que consiste en XX, xX y Xx, en el que "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB, tal como una unidad de ANB, y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

- 5 En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos 13 nucleobases y en el que el motivo de tres nucleobases en las posiciones 11 a 13, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xxx, Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX y XXX, en el que "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB, tal como una unidad de ANB, y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

- 10 En una realización, el motivo de tres nucleobases en las posiciones 11 a 13, contando desde el extremo 3' del oligonucleótido que inhibe miR-122, se selecciona del grupo que consiste en Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX y XXX, en el que "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB, tal como una unidad de ANB, y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

- 15 En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos 14 nucleobases y en el que el motivo de cuatro nucleobases en las posiciones 11 a 14, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xxxx, Xxxx, xXxx, xxXx, xxxX, XXxx, XxXx, XxxX, xXXx, xXxX, xxXX, XXXx, XxxX, xXXX, XXxX y XXXX en el que "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB, tal como una unidad de ANB, y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

- 20 En una realización, el motivo de cuatro nucleobases en las posiciones 11 a 14 del oligonucleótido que inhibe miR-122 contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en Xxxx, xXxx, xxXx, xxxX, XXxx, XxXx, XxxX, xXXx, xxXX, XXXx, XxXX, xXXX, Xxxx y XXXX, en el que "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB. y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

- 25 En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende 15 nucleobases y el motivo de cinco nucleobases en las posiciones 11 a 15, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en Xxxxx, xXxxx, xxXxx, xxxXx, xxxxX, XXxxx, XxXxx, XxxXx, XxxxX, xXXxx, xXxX., xXxxX, xxXXx, xxXxX, xxxXX, XXXxx, XXxxX, XxxXX, xXXXx, xxXXX, XXxXX, XxXxX, XXXXx, XXXxX, XXxXX, XxXXXX, xXXXX y XXXXX en el
30 que "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB, tal como una unidad de ANB, y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

- En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende 16 nucleobases y el motivo de seis nucleobases en las posiciones 11 a 16, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en
- 35 Xxxxxx, xXxxxx, xxXxxx, xxxXxx, xxxxXx, xxxxxX, XXxxxx, XxXxxx, XxxXxx, XxxxXx, XxxxxX, xXXxxx, xXxXxx, xXxxXx, xXxxxX, xxXXxx, xxXxXx, xxXxxX, xxxXXx, xxxXxX, xxxxxX, XXXxxx, XXxXxx, XXxxXx, XXxxxX, XxXXxx, XxXxxX, XxxXXx, XxxxXX, xXXXxx, xXXxXx, xXXxxX, xXxXXx, xXxxXX, xxXXXX, xxXXxX, xxXxXX, xxxXXX, XXXxxX, XXXxxX, XXxxXX, XxxXXX, xxXXXX, xXxXXX, XxXxXX, XXxXxX, XXXxXx, XXXXXx y
- 40 XXXXXX en el que "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB, tal como una unidad de ANB, y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

- En una realización, el motivo de seis nucleobases en las posiciones 11 a 16 del oligonucleótido que inhibe miR-122, contando desde el extremo 3', es xxXxxX, en el que "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB, tal como una unidad de ANB, y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

- En una realización, las tres nucleobases más en 5' se seleccionan del grupo que consiste en Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX y XXX, en las que "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB, tal como una unidad de ANB. y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

- 50 En una realización, x" indica una unidad de ADN.

- En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende una unidad de análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB, en el extremo 5'.

- 55 En una realización, las unidades de análogo de nucleótido, tales como X, se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: 2'-O-alkil-unidad de ARN, 2'-OMe-unidad de ARN, 2'-amino-unidad de ADN, 2'-fluoro-unidad de ADN, unidad de ANB, unidad de ANP, unidad de ANH, unidad de ANI.

- 60 En una realización, todas las nucleobases del oligonucleótido que inhibe miR-122 de la invención son unidades de análogo de nucleótido.

- En una realización, las unidades de análogo de nucleótido, tales como X, se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: 2'-OMe-unidades de ARN, 2'-fluoro-unidades de ADN y unidades de ANB.

- 65 En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende dicha al menos una unidad de análogo de ANB

y al menos una unidad de análogo de nucleótido adicional distinta de ANB.

En una realización, la unidad o unidades de análogo de nucleótido distintas de ANB se seleccionan independientemente de 2'-OMe-unidades de ARN y 2'-fluoro-unidades de ADN.

5 En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 consiste en al menos una secuencia XYX o YXY, en la que X es ANB e Y es o bien 2'-OMe-unidad de ARN o bien 2'-fluoro-unidad de ADN.

10 En una realización, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido que inhibe miR-122 consiste en unidades X e Y alternativas.

En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende unidades de ADN y ANB alternas (Xx) o (xX).

15 En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende un motivo de alternar ANB seguido por 2 unidades de ADN (Xxx), xXx o xxX.

20 En una realización, al menos una de las unidades de análogo de nucleótido de ADN o las unidades de análogo de nucleótido distintas de ANB se sustituyen por una nucleobase de ANB en una posición seleccionada de las posiciones identificadas como unidades de nucleobase de ANB en una cualquiera de las realizaciones a las que se hizo referencia anteriormente.

En una realización, "X" indica una unidad de ANB.

25 En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos 2 unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos 3 unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos 4 unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos 5 unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos 6 unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos 7 unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos 8 unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos 9 unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos 10 unidades de análogo de nucleótido.

30 En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos 2 unidades de ANB, tal como al menos 3 unidades de ANB, tal como al menos 4 unidades de ANB, tal como al menos 5 unidades de ANB, tal como al menos 6 unidades de ANB, tal como al menos 7 unidades de ANB, tal como al menos 8 unidades de ANB, tal como al menos 9 unidades de ANB, tal como al menos 10 unidades de ANB.

35 En una realización en la que al menos uno de los análogos de nucleótido, tales como las unidades de ANB, es o bien citosina o bien guanina, tal como entre 1 - 10 de los análogos de nucleótido, tales como las unidades de ANB, es o bien citosina o bien guanina, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 de los análogos de nucleótido, tales como las unidades de ANB, es o bien citosina o bien guanina.

40 En una realización al menos dos de los análogos de nucleótido tales como las unidades de ANB son o bien citosina o bien guanina. En una realización al menos tres de los análogos de nucleótido tales como las unidades de ANB son o bien citosina o bien guanina. En una realización al menos cuatro de los análogos de nucleótido tales como las unidades de ANB son o bien citosina o bien guanina. En una realización al menos cinco de los análogos de nucleótido tales como las unidades de ANB son o bien citosina o bien guanina. En una realización al menos seis de los análogos de nucleótido tales como las unidades de ANB son o bien citosina o bien guanina. En una realización al menos siete de los análogos de nucleótido tales como las unidades de ANB son o bien citosina o bien guanina. En una realización al menos ocho de los análogos de nucleótido tales como las unidades de ANB son o bien citosina o bien guanina.

50 En una realización preferida los análogos de nucleótido tienen una estabilidad térmica de dúplex superior un nucleótido de ARN complementario a la afinidad de unión de un nucleótido de ADN equivalente a dicho nucleótido de ARN complementario.

55 En una realización, los análogos de nucleótido confieren una estabilidad en suero potenciada frente al oligonucleótido monocatenario.

60 En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 forma una conformación de hélice A con una molécula de ARN monocatenario complementaria.

65 Un dúplex entre dos moléculas de ARN existe normalmente en una conformación de forma A, mientras que un dúplex entre dos moléculas de ADN existe normalmente en una conformación de forma B. Un dúplex entre una molécula de ADN y una de ARN existe normalmente en una conformación intermedia (forma AIB). Puede usarse el uso de análogos de nucleótido, tales como beta-D-oxi-ANB, para promover una conformación más de tipo forma A. Se usa el análisis mediante RMN o dicroísmos circulares (CD) convencional para determinar la forma de dúplex entre los oligonucleótidos de la invención y moléculas de ARN complementarias.

Normalmente se requiere un tramo de al menos 5 (normalmente no eficaz para reclutar ARNasa H), más preferiblemente al menos 6, más preferiblemente al menos 7 u 8 nucleobases de ADN consecutivas (o nucleobases alternativas que pueden reclutar ARNasaH, tales como alfa-L-amino-ANB) para que un oligonucleótido sea eficaz para reclutar ARNasaH.

El documento EP 1222309 proporciona métodos *in vitro* para determinar la actividad ARNasaH, lo que puede usarse para determinar la capacidad para reclutar ARNasaH. Se considera que un compuesto puede reclutar ARNasa H si, cuando se le proporciona la diana de ARN complementaria, tiene una tasa inicial, medida en pmol/l/min, de al menos el 1%, tal como al menos el 5%, tal como al menos el 10% o menos del 20% del oligonucleótido sólo de ADN equivalente, sin sustituciones en 2', con grupos de enlace fosforotioato entre todos los nucleótidos en el oligonucleótido, usando la metodología proporcionada por el ejemplo 91 - 95 del documento EP 1 222 309.

Se considera que un compuesto esencialmente no puede reclutar ARNasaH si, cuando se le proporciona la diana de ARN complementaria, y ARNasaH, la tasa inicial de ARNasaH, medida en pmol/l/min, es inferior al 1%, tal como inferior al 5%, tal como inferior al 10% o inferior al 20% de la tasa inicial determinada usando el oligonucleótido sólo de ADN equivalente, sin sustituciones en 2', con grupos de enlace fosforotioato entre todos los nucleótidos en el oligonucleótido, usando la metodología proporcionada por el ejemplo 91 - 95 del documento EP 1 222 309.

En una realización, la unidad o unidades de ANB se seleccionan independientemente del grupo que consiste en oxi-ANB, tio-ANB y amino-ANB, en cualquiera de las configuraciones D-□ y L-□ o combinaciones de las mismas.

En una realización específica las unidades de ANB pueden ser una nucleobase de ANE.

En una realización las unidades de ANB son beta-D-oxi-ANB.

En una realización las unidades de ANB son alfa-L-amino-ANB.

El oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende enlaces fosforotioato, y

todos los enlaces internucleosídicos son enlaces fosforotioato.

En una realización, la composición farmacéutica según la invención comprende un portador tal como solución salina o solución salina tamponada.

Por tanto, la secuencia principal es una secuencia de ADN desde las posiciones uno a seis, dos a siete o las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', correspondientes a las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 5', del microARN diana correspondiente.

miR-122a

La secuencia de miR-122a desde las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 5', es gagugu (véase la entrada en miRBase HGNC:MIRN122A). La secuencia de ADN correspondiente es ctcaca.

Por consiguiente, en un aspecto la presente invención se refiere a un oligonucleótido, tal como un oligonucleótido que tiene una longitud de desde 12 hasta 26 nucleótidos, que tiene la secuencia de ADN desde las posiciones uno a seis, dos a siete o tres a ocho, preferiblemente desde las posiciones dos a siete o tres a ocho, contando desde el extremo 3':

ctcaca,

en la que al menos una, tal como una, preferiblemente al menos dos, tal como dos o tres, unidades de ADN en dicha secuencia se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente.

Una realización se refiere al oligonucleótido que inhibe miR-122 tal como se describió anteriormente que tiene una secuencia de ADN desde las posiciones uno a siete, dos a ocho o tres a nueve, preferiblemente desde las posiciones dos a ocho o tres a nueve, contando desde el extremo 3':

ctcacac,

en la que al menos una, tal como una, preferiblemente al menos dos, tal como dos, más preferiblemente al menos tres, tal como tres o cuatro, unidades de ADN en dicha secuencia se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente.

En otra realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 tiene una secuencia de ADN desde las posiciones uno a ocho, dos a nueve o tres a diez, preferiblemente desde las posiciones dos a nueve o tres a diez, contando desde el

extremo 3':

ctcacact,

- 5 en la que al menos una, tal como una, preferiblemente al menos dos, tal como dos, más preferiblemente al menos tres, tal como tres o cuatro, unidades de ADN en dicha secuencia se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente.

- 10 En aún otra realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 tiene una secuencia de ADN desde las posiciones uno a nueve, dos a diez o tres a once, preferiblemente desde las posiciones dos a diez o tres a once, contando desde el extremo 3':

ctcacactg,

- 15 en la que al menos una, tal como una, preferiblemente al menos dos, tal como dos, más preferiblemente al menos tres, tal como tres, incluso más preferiblemente al menos cuatro, tal como cuatro o cinco, unidades de ADN en dicha secuencia se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente.

Modificación de nucleótidos en la secuencia principal

- 20 Tal como se mencionó anteriormente, en la secuencia principal del oligonucleótido que inhibe miR-122 al menos una, tal como una, preferiblemente al menos dos, tal como dos o tres, unidades de ADN en dicha secuencia se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente. Los presentes inventores han encontrado además que la inhibición de los microARN diana puede aumentarse adicionalmente asegurándose de que dos unidades de ANB en dicha secuencia principal están separadas por al menos una unidad de ADN.

- 30 Por consiguiente, en una realización el oligonucleótido que inhibe miR-122 tal como se describió anteriormente, en el que al menos dos, tal como dos o tres, unidades de ADN desde las posiciones uno a seis, dos a siete o tres a ocho, preferiblemente desde las posiciones dos a siete o tres a ocho, contando desde el extremo 3', se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente y en el que las unidades de ANB están separadas por al menos una unidad de ADN.

- 35 Los presentes inventores también han encontrado que la inhibición de microARN diana puede aumentarse aún adicionalmente asegurándose de que dos unidades de ANB en la secuencia principal están separadas por como máximo dos unidades de ADN. Por consiguiente, en una realización el oligonucleótido que inhibe miR-122 tal como se describió anteriormente, en el que el número de unidades de ADN consecutivas desde las posiciones uno a seis, dos a siete o tres a ocho, preferiblemente desde las posiciones dos a siete o tres a ocho, contando desde el extremo 3', es como máximo de dos.

- 40 Dichos hallazgos se aplican a la secuencia principal en sí, es decir el hallazgo se aplica a las posiciones de los oligonucleótidos de la presente invención correspondientes a la secuencia principal. Por tanto, otra realización se refiere al oligonucleótido tal como se describió anteriormente, en el que al menos dos, tal como dos, tres o cuatro, unidades de ADN desde las posiciones uno a siete, dos a ocho o tres a nueve, preferiblemente desde las posiciones dos a ocho o tres a nueve, contando desde el extremo 3', se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente y en el que las unidades de ANB están separadas por al menos una unidad de ADN. Una realización adicional se refiere al oligonucleótido tal como se describió anteriormente, en el que el número de unidades de ADN consecutivas desde las posiciones uno a siete, dos a ocho o tres a nueve, preferiblemente desde las posiciones dos a ocho o tres a nueve, contando desde el extremo 3', es como máximo de dos.

- 50 Aún otra realización se refiere al oligonucleótido tal como se describió anteriormente, en el que al menos dos, tal como dos, tres o cuatro, unidades de ADN desde las posiciones uno a ocho, dos a nueve o tres a diez, preferiblemente desde las posiciones dos a nueve o tres a diez, contando desde el extremo 3', se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente y en el que las unidades de ANB están separadas por al menos una unidad de ADN. Una realización aún adicional se refiere al oligonucleótido tal como se describió anteriormente, en el que el número de unidades de ADN consecutivas desde las posiciones uno a ocho, dos a nueve o tres a diez, preferiblemente desde las posiciones dos a nueve o tres a diez, contando desde el extremo 3', es como máximo de dos.

- 60 Todavía otra realización se refiere al oligonucleótido tal como se describió anteriormente, en el que al menos dos, tal como dos, tres, cuatro o cinco, unidades de ADN desde las posiciones uno a nueve, dos a diez o tres a once, preferiblemente desde las posiciones dos a diez o tres a once, contando desde el extremo 3', se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente y en el que las unidades de ANB están separadas por al menos una unidad de ADN. Una realización todavía adicional se refiere al oligonucleótido tal como se describió anteriormente, en el que el número de unidades de ADN consecutivas desde las posiciones uno a nueve, dos a diez o tres a once, preferiblemente desde las posiciones dos a diez o tres a once, contando desde el extremo 3', es como máximo de dos.

Modificación de nucleótidos fuera de la secuencia principal

Tal como se mencionó anteriormente, los nucleótidos fuera de la secuencia principal pueden ser unidades de ANB y/o unidades distintas de ANB. En una realización, la invención se refiere al oligonucleótido tal como se describió anteriormente, en el que el número de unidades de ANB fuera de la secuencia principal es de al menos una, tal como una, dos, tres o cuatro, y en el que dichas unidades de ANB están separadas por al menos una unidad distinta de ANB. En una realización adicional, el patrón de sustitución fuera de la secuencia principal es tal que el número de unidades distintas de ANB consecutivas fuera de la secuencia principal es como máximo de dos. Modificación de nucleótidos en las posiciones 3 a 8, contando desde el extremo 3'.

En las siguientes realizaciones que se refieren a la modificación de nucleótidos en las posiciones 3 a 8, contando desde el extremo 3', las unidades de ANB pueden sustituirse por otros análogos de nucleótido, tales como a los que se hace referencia en el presente documento. Por tanto, "X" puede seleccionarse del grupo que consiste en 2'-O- alquil-unidad de ARN, 2'-OME-unidad de ARN, 2'-amino-unidad de ADN, 2'-fluoro- unidad de ADN, unidad de ANB, unidad de ANP, unidad de ANH, unidad de ANI. "x" es preferiblemente ADN o ARN, lo más preferiblemente ADN.

En una realización interesante de la invención, el oligonucleótido que inhibe miR-122 se modifica en las posiciones 3 a 8, contando desde el extremo 3'. El diseño de esta secuencia puede definirse mediante el número de unidades distintas de ANB presentes o mediante el número de unidades de ANB presentes. En una realización preferida de las primeras, al menos uno, tal como uno, de los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', es una unidad distinta de ANB. En otra realización, al menos dos, tal como dos, de los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', son unidades distintas de ANB. En aún otra realización, al menos tres, tal como tres, de los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', son unidades distintas de ANB. En todavía otra realización, al menos cuatro, tal como cuatro, de los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', son unidades distintas de ANB. En una realización adicional, al menos cinco, tal como cinco, de los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', son unidades distintas de ANB. En una realización aún adicional, los seis nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', son unidades distintas de ANB. En una realización preferida, dicha unidad distinta de ANB es una unidad de ADN.

Definido de manera alternativa, en una realización preferida, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos una unidad de ANB en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. En una realización del mismo, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende una unidad de ANB en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. El patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', puede seleccionarse del grupo que consiste en Xxxxxx, xXxxxx, xxXxxx, xxxXxx, xxxxXx y xxxxxX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB.

En otra realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos dos unidades de ANB en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. En una realización del mismo, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende dos unidades de ANB en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. El patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', puede seleccionarse del grupo que consiste en XXxxxx, XxXxxx, XxxXxx, XxxxXx, XxxxxX, xXXxxx, xXxXxx, xXxxXx, xXxxxX, xxXXxx, xxXxXx, xxXxxX, xxxXXx, xxxXxX y xxxxxX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización preferida, el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en XxXxxx, XxxXxx, XxxxXx, XxxxxX, xXxXxx, xXxxXx, xXxxxX, xxXxXx, xxXxxX y xxxXxX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización más preferida, el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xXxXxx, xXxxXx, xXxxxX, xxXxXx, xxXxxX y xxxXxX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización incluso más preferida, el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xXxXxx, xXxxXx y xxXxXx, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización más preferida, el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', es xXxXxx, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB.

En aún otra realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos tres unidades de ANB en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. En una realización del mismo, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende tres unidades de ANB en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. El patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', puede seleccionarse del grupo que consiste en XXXxxx, xXXXxx, xxXXXx, xxxXXX, XXxXxx, XXxxXx, XXxxxX, xXXxXx, xXXxxX, XxXXxx, XxxXXx, XxxxXX, xXxXXx, xXxxXX, xxXxXX, xXxXxX y XxXxXx, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización preferida, el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en XXxXxx, XXxxXx, XXxxxX, xXXxXx, xXXxxX, xxXXxX, XxxXXx, XxxxXX, XxxXx, xXxxXX, xxXxXX, xXxXxX y XxXxXx, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización más

preferida, el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xXXxXx, xXXxxX, xxXXxX, xXxXXx, xXxxXX, xxXxXX y xXxXxX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización incluso más preferida, el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', es xXxXxX o XxXxXx, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización más preferida, el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', es xXxXxX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB.

En una realización adicional, el oligonucleótido que inhibe miR-122 según la presente invención comprende al menos cuatro unidades de ANB en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. En una realización del mismo, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende cuatro unidades de ANB en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. El patrón de sustitución para el nucleótido en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', puede seleccionarse del grupo que consiste en xxXXXX, xXxXXX, xXXxXX, xXXXxX, xXXXXx, XxxXXX, XxXxXX, XxXXxX, XxXXXx, XXxxXX, XXxXxX, XXxXXx, XXXxxX, XXXxXx y XXXXxx, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB.

En una realización aún adicional, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos cinco unidades de ANB en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. En una realización del mismo, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende cinco unidades de ANB en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. El patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', puede seleccionarse del grupo que consiste en xxxXXXX, XxXXXX, XXxXXX, XXXxXX, XXXXxX y XXXXXx, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB.

Preferiblemente, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende una o dos unidades de ANB en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. Esto se considera ventajoso para la estabilidad de la hélice A formada por el dúplex oligo:microARN, un dúplex que se parece en su estructura a un dúplex ARN:ARN.

En una realización preferida, dicha unidad distinta de ANB es una unidad de ADN.

Variación de la longitud de los oligonucleótidos

No es necesario que la longitud del oligonucleótido que inhibe miR-122 corresponda exactamente con la longitud del microARN-122 diana. De hecho, se considera ventajoso tener oligonucleótidos cortos, tales como de entre 10 -17 ó 10 -16 nucleobases.

En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 tiene una longitud de desde 8 hasta 24 nucleótidos, tal como de 10 a 24, entre 12 y 24 nucleótidos, tal como una longitud de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ó 24 nucleótidos, preferiblemente una longitud de desde 10 - 22, tal como entre 12 y 22 nucleótidos, tal como una longitud de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ó 22 nucleótidos, más preferiblemente una longitud de desde 10 - 20, tal como entre 12 y 20 nucleótidos, tal como una longitud de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 nucleótidos, incluso más preferiblemente una longitud de desde 10 hasta 19, tal como entre 12 y 19 nucleótidos, tal como una longitud de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ó 19 nucleótidos, por ejemplo una longitud de desde 10 hasta 18, tal como entre 12 y 18 nucleótidos, tal como una longitud de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18 nucleótidos, más preferiblemente una longitud de desde 10 - 17, tal como desde 12 hasta 17 nucleótidos, tal como una longitud de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ó 17 nucleótidos, lo más preferiblemente una longitud de desde 10 hasta 16, tal como entre 12 y 16 nucleótidos, tal como una longitud de 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 nucleótidos.

Modificación de nucleótidos desde la posición 11, contando desde el extremo 3', hasta el extremo 5'

El patrón de sustitución para los nucleótidos desde la posición 11, contando desde el extremo 3', hasta el extremo 5', puede incluir unidades de análogo de nucleótido (tal como ANB) o puede no incluirlas. En una realización preferida, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos una unidad de análogo de nucleótido (tal como ANB), tal como una unidad de análogo de nucleótido, desde la posición 11, contando desde el extremo 3', hasta el extremo 5'. En otra realización preferida, el oligonucleótido que inhibe miR-122 comprende al menos dos unidades de análogo de nucleótido, tales como las unidades de ANB, tales como dos unidades de análogo de nucleótido, desde la posición 11, contando desde el extremo 3', hasta el extremo 5'.

En las siguientes realizaciones que se refieren a la modificación de nucleótidos en las nucleobases desde la posición 11 hasta el extremo 5' del oligonucleótido, las unidades de ANB pueden sustituirse por otros análogos de nucleótido, tales como a los que se hace referencia en el presente documento. Por tanto, "X" puede seleccionarse del grupo que consiste en 2'-O-alkil-unidad de ARN, 2'-OMe-unidad de ARN, 2'-amino-unidad de ADN, 2'-fluoro-unidad de ADN, unidad de ANB, unidad de ANP, unidad de ANH, unidad de ANI. "x" es preferiblemente ADN o ARN, lo más preferiblemente ADN.

En una realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 tiene el siguiente patrón de sustitución, que se repite desde el nucleótido once, contando desde el extremo 3', hasta el extremo 5': xXxX o XxXx, en el que "X" indica una

unidad de ANB y “x” indica una unidad distinta de ANB. En otra realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 tiene el siguiente patrón de sustitución, que se repite desde el nucleótido once, contando desde el extremo 3’, hasta el extremo 5’: XxxXxx, xXxxXx o xxXxxX, en el que “X” indica una unidad de ANB y “x” indica una unidad distinta de ANB. En aún otra realización, el oligonucleótido que inhibe miR-122 tiene el siguiente patrón de sustitución, que se repite desde el nucleótido once, contando desde el extremo 3’, hasta el extremo 5’: XxxxXxxx, xXxxxXxx, xxXxxxXx o xxxXxxxX, en el que “X” indica una unidad de ANB y “x” indica una unidad distinta de ANB.

El patrón de sustitución específico para los nucleótidos desde la posición 11, contando desde el extremo 3', hasta el extremo 5', depende del número de nucleótidos en el oligonucleótido que inhibe miR-122. En una realización preferida, el oligonucleótido que inhibe miR-122 contiene 12 nucleótidos y el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 12, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xX y Xx, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización más preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 12, contando desde el extremo 3', es xX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. Alternativamente, no están presentes unidades de ANB en las posiciones 11 a 12, contando desde el extremo 3', es decir el patrón de sustitución es xx.

En otra realización preferida, el oligonucleótido que inhibe miR-122 contiene 13 nucleótidos y el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 13, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX y XXX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización más preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 13, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xXx, xxX y xxx, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización más preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 13, contando desde el extremo 3', es xxX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. Alternativamente, no están presentes unidades de ANB en las posiciones 11 a 13, contando desde el extremo 3', es decir el patrón de sustitución es xxx.

En aún otra realización preferida, el oligonucleótido que inhibe miR-122 contiene 14 nucleótidos y el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 14, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en Xxxx, xXxx, xxXx, xxxX, XXxx, XxXx, XxxX, xXXx, xXxX y xxXX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 14, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xXxx, xxXx, xxxX, xXxX y xxXX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización más preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 14, contando desde el extremo 3', es xXxX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. Alternativamente, no están presentes unidades de ANB en las posiciones 11 a 14, contando desde el extremo 3', es decir el patrón de sustitución es xxxx

En una realización adicional preferida, el oligonucleótido que inhibe miR-122 contiene 15 nucleótidos y el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 15, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en Xxxxx, xXxxx, xxXxx, xxxXx, xxxxX, XXxxx, XxXxx, XxxXx, XxxxX, xXXxx, xXxXx, xXxxX, xxXXx, xxXxX, xxxXX y XxXxX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 15, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xxXxx, XxXxx, XxxXx, xXxXx, xXxxX y xxXxX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización más preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 15, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xxXxx, xXxXx, xXxxX y xxXxX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización incluso más preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 15, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xXxxX y xxXxX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización más preferida, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 15, contando desde el extremo 3', es xxXxX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. Alternativamente, no están presentes unidades de ANB en las posiciones 11 a 15, contando desde el extremo 3', es decir el patrón de sustitución es xxxxx

En una realización aún adicional preferida, el oligonucleótido que inhibe miR-122 contiene 16 nucleótidos y el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 16, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en Xxxxxx, xXxxxx, xxXxxx, xxxXxx, xxxxXx, xxxxxX, XXxxxx, XxXxxx, XxxXxx, XxxxXx, XxxxxX, xXXxxx, xXxXxx, xXxxXx, xXxxxX, xxXXxx, xxXxXx, xxXxxX, xxxXXx, xxxXxX, xxxxxX, XXXxxx, XXxXxx, XXxxXx, XxxxxX, XxXXxx, XxXxXx, XxXxxX, XxxXXx, XxxxXX, xXXxxX, xXXxXx, xXXxxX, xXxXXx, xXxXxX, xXxxXX, xxXXxx, xxXxXX y xxxXXX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 16, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en XxxXxx, xXxXxx, xXxxXx, xxXxXx, xxXxxX, XxXxXx, XxXxxX, XxxXxx, xXxXxX, xXxxXX y xxXxXX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización más preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 16, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xXxXxx, xXxxXx, xxXxXx, xxXxxX, xXxXxx, xXxxXX y xxXxXX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad

distinta de ANB. En una realización todavía más preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 16, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xxXxxX y xXxXxX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. En una realización más preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 16, contando desde el extremo 3', es xxXxxX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. Alternativamente, no están presentes unidades de ANB en las posiciones 11 a 16, contando desde el extremo 3', es decir el patrón de sustitución es xxxxxx

En una realización preferida de la invención, el oligonucleótido que inhibe miR-122 contiene una unidad de ANB en el extremo 5'. En otra realización preferida, el oligonucleótido que inhibe miR-122 contiene una unidad de ANB en las dos primeras posiciones, contando desde el extremo 5'.

En una realización particularmente preferida, el oligonucleótido que inhibe miR-122 contiene 13 nucleótidos y el patrón de sustitución, comenzando desde el extremo 3', es XXxXxXxxXXxxX, en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad distinta de ANB. La secuencia preferida para esta realización, comenzando desde el extremo 3', es CCtCaCacTGtTA, en la que una letra mayúscula indica una base nitrogenada en una unidad de ANB y una letra minúscula indica una base nitrogenada en una unidad distinta de ANB.

En otra realización particularmente preferida, el oligonucleótido que inhibe miR-122 contiene 15 nucleótidos y el patrón de sustitución, comenzando desde el extremo 3', es

La secuencia comenzando desde el extremo 3' es CCtCaCacTGtTAcC, en la que una letra mayúscula indica una base nitrogenada en una unidad de ANB y una letra minúscula indica una base nitrogenada en una unidad distinta de ANB.

Modificación del grupo de enlace internucleosídico

Los grupos de enlace internucleosídico típicos en oligonucleótidos son grupos fosfato, pero estos pueden sustituirse por grupos de enlace internucleosídico diferentes de fosfato.

Los ejemplos específicos de grupos de enlace internucleosídico diferentes de fosfato (-O-P(O)₂-O-) incluyen -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O)₂-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S-, -O-P(O,S)-S-, -S-P(O)₂-S-, -O-PO(R^H)-O-, O-PO(OCH₃)-O-, -O-PO(NR^H)-O-, -O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-, -O-PO(BH₃)-O-, -O-PO(NHR^H)-O-, -O-P(O)₂-NR^H-, -NR^H-P(O)₂-O-, -NR^H-CO-O-, -NR^H-CO-NR^H-, -O-CO-O-, -O-CO-NR^H-, -NR^H-CO-CH₂-, -O-CH₂-CO-NR^H-, -OCH₂-CH₂-NR^H-, -CO-NR^H-CH₂-, -CH₂-NR^H-CO-, -O-CH₂-CH₂-S-, -S-CH₂-CH₂-O-, -S-CH₂-CH₂-S-, -CH₂-SO₂-CH₂-, -CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-CO-, -CH₂-NCH₃-O-CH₂-, en los que R^H es hidrógeno o alquilo C₁₋₄.

Cuando el grupo de enlace internucleosídico está modificado, el grupo de enlace internucleosídico es preferiblemente un grupo fosforotioato (-O-P(O,S)-O-). En una realización preferida, todos los grupos de enlace internucleosídico de los oligonucleótidos según la presente invención son fosforotioato.

Diseños para microARN específicos

La siguiente tabla proporciona ejemplos del oligonucleótido que inhibe miR-122, tales como los usados en composiciones farmacéuticas, en comparación con un tipo de moléculas de la técnica anterior.

diana: hsa-miR-122a MIMAT0000421		SEQ ID
uggagugugacaaugguguuugu		SEQ ID NO: 58
examinado en la línea celular HUH-7 que expresa miR-122		
N.º de oligo, microARN diana, secuencia de oligo	Diseño	
miR-122 5'-ACAAacaccattgtcacacTCCA-3'	Complemento completo, hueco	SEQ ID NO: 67
miR-122 5'-acaaacACCATTTGtcactcca-3'	Complemento completo, bloque	SEQ ID NO: 68
miR-122 5'-acAaaCacCatTgtCacActCca-3'	Complemento completo, ANB_3	SEQ ID NO: 69
miR-122 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3'	Nuevo diseño	SEQ ID NO: 63
miR-122 5'-CcAtTGTcaCACtCC-3'	Nuevo diseño potenciado	SEQ ID NO: 70
miR-122 5'-ATTGTcACACtCC-3'	ED – 13 meros	SEQ ID NO: 71
miR-122 5'-TGTcACACtCC-3'	ED – 11 meros	SEQ ID NO: 72
miR-122 5'-CC ^M AT ^M GTc ^M CA ^M CT ^M CC-3'	Nuevo diseño - 2'MOE	SEQ ID NO: 73
miR-122 5'-CC ^F AT ^F GTc ^F A ^F CA ^F CT ^F CC-3'	Nuevo diseño - 2'Fluoro	SEQ ID NO: 74

Las letras mayúsculas sin superíndice M o F se refieren a unidades de ANB. Letra minúscula = ADN, excepto por las letras minúsculas en negrita = ARN. Opcionalmente las citosinas de ANB pueden estar metiladas. Las letras mayúsculas seguidas por un superíndice M se refieren a 2'OME-unidades de ARN, las letras mayúsculas seguidas por un superíndice F se refieren a 2'fluoro-unidades de ADN, las letras minúsculas se refieren a ADN. En una realización, los oligos anteriores pueden estar totalmente de fosforotioato, pero pueden usarse otros enlaces de nucleobases tal como se describe en el presente documento. En una realización todos los enlaces de nucleobases son fosfodiéster. Se considera que para su uso dentro del cerebro/la médula espinal es preferible usar enlaces fosfodiéster, por ejemplo para el uso de compuestos anti-miR que seleccionan como diana miR21.

dLdLdLdL(d)(L)(d)(L)(d)(L)(d) “uno sí y uno no”

LdLdLdLdL(d)(L)(d)(L)(d)(L)(d)(L) “uno sí y uno no”

MLMLMLMLML(M)(L)(M)(L)(M)(L)(M) “uno sí y uno no”

LMLMLMLML(M)(L)(M)(L)(M)(L)(M)(L) “uno sí y uno no”

FLFLFLFLFL(F)(L)(F)(L)(F)(L)(F) “uno sí y uno no”

LFLFLFLFL(F)(L)(F)(L)(F)(L)(F)(L) “uno sí y uno no”

En los que L = unidad de ANB, d= unidades de ADN, M = 2'MOE-ARN, F = 2'fluoro y los residuos entre paréntesis son opcionales.

Ejemplos específicos de los oligonucleótidos que inhiben miR-122 pueden seleccionarse del grupo que consiste en:

SEQ ID NO:	Secuencia
75	tgCatGgaTttGcaCa
76	tgCatGgaTttGcaC
77	CatGgaTttGcaC
78	tGcAtGgAtTtGcAc
79	cAtGgAtTtGcAc
80	CatGGatTtGcAC
81	TgCatGGatTtGcAC
82	TgCaTgGaTTtGcACa
83	cCatTgtCacActCca
84	cCatTptAacTctCca
85	ccAttGtcAcaCtcCa
86	cCatTgtCacActCc
87	atTqtCacActCc
88	ccAttGtcAcaCtcC
89	AttGtcAcaCtcC
90	aTtGtCaCaCtCc
91	AttGTcaCaCtCC
92	CcAttGTcaCaCtCC
93	CcaTtgTcacActcCa
94	CCAttgtcacacTCCa
95	tCacGatTagCatTaa
96	aTcaCgaTtaGcaTta
97	TcAcGaTtAgCaTtAa

98	AtcAcGaTtAgCaTta
99	gAgcCgaAcgAacAa
100	acCgaAcgAacAa
101	GaGcCgAaCgAaCaA
102	GcCgAaCpAaCaA

Conjugados

La invención también se refiere a conjugados que comprenden el oligonucleótido que inhibe miR-122.

5 En una realización el compuesto oligomérico (oligonucleótido) está unido a ligandos/conjugados, que pueden usarse, por ejemplo, para aumentar la captación celular de oligonucleótidos antisentido. Esta conjugación puede tener lugar en las posiciones terminales 5'/3'-OH pero los ligandos también pueden tener lugar en los azúcares y/o las bases. En particular, el factor de crecimiento al que puede conjugarse el oligonucleótido antisentido puede comprender transferrina o folato. Pueden prepararse complejos de transferrina-polilisina-oligonucleótido o complejos de folato-polilisina-oligonucleótido para su captación por células que expresan altos niveles de receptor de transferrina o folato. Otros ejemplos de conjugados/ligandos son restos colesterol, intercaladores de dúplex tales como acridina, poli-L-lisina, "ocupación de extremos" con uno o más grupos de enlaces resistentes a nucleasa tales como fosforomonotioato y similares. La invención también proporciona un conjugado que comprende el compuesto según la invención tal como se describe en el presente documento, y al menos un resto distinto de nucleótido o distinto de polinucleótido unido de manera covalente a dicho compuesto. Por tanto, en una realización en la que el compuesto de la invención consiste en un ácido nucleico especificado, tal como se da a conocer en el presente documento, el compuesto también puede comprender al menos un resto distinto de nucleótido o distinto de polinucleótido (por ejemplo que no comprende uno o más nucleótidos o análogos de nucleótido) unido de manera covalente a dicho compuesto. Por ejemplo, el resto distinto de nucleobase puede ser o comprender un esteroide tal como colesterol.

Por tanto, se reconocerá que el oligonucleótido de la invención, tal como el oligonucleótido usado en formulaciones farmacéuticas (terapéuticas) puede comprender componentes distintos de nucleobases adicionales, tales como los conjugados definidos en el presente documento.

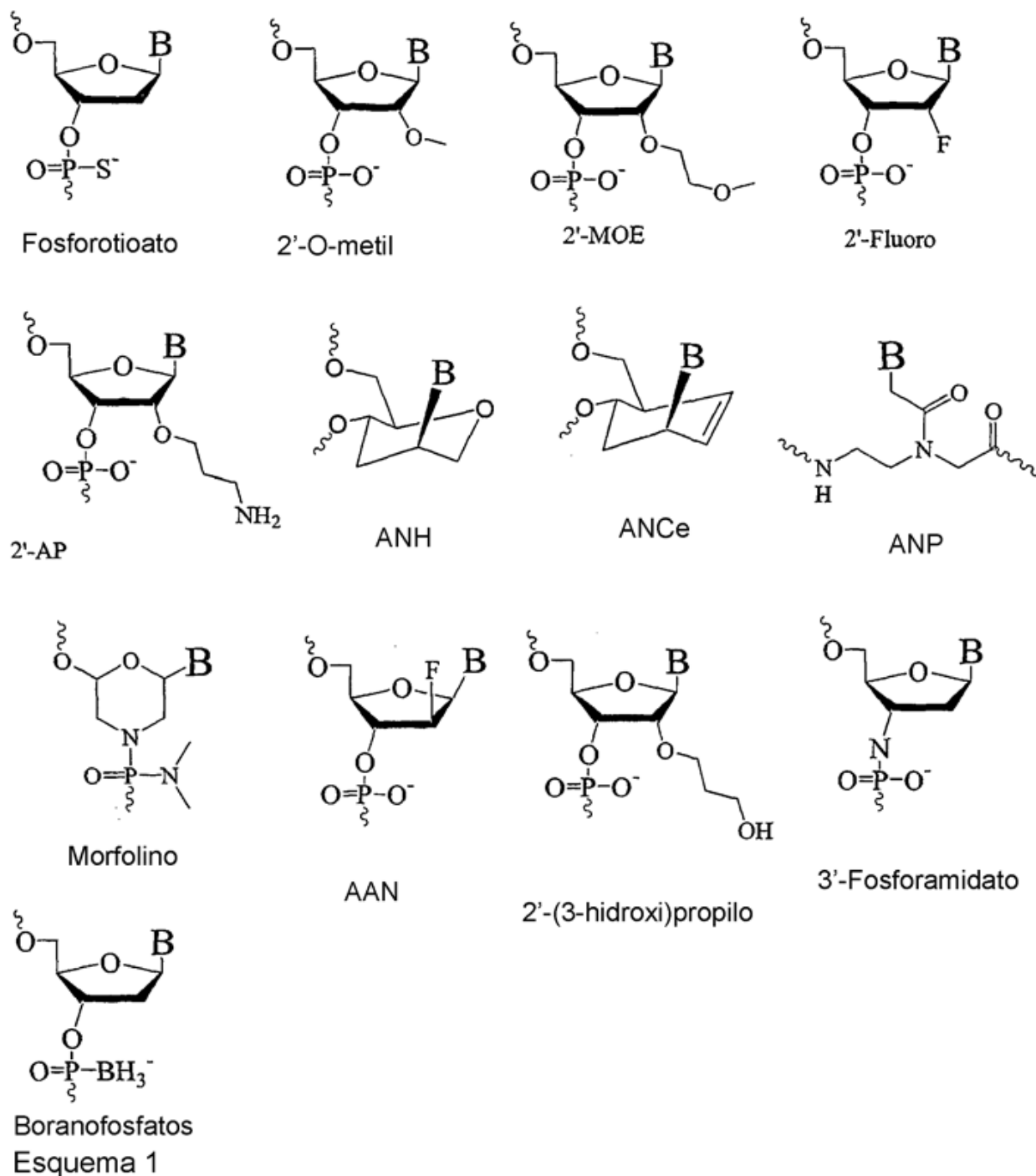
Términos

30 Cuando se usa en el presente documento, el término "análogo de nucleótido" se refiere a un nucleótido que no se produce de manera natural en el que, por ejemplo en una realización preferida, la unidad de ribosa es diferente de 2-desoxirribosa y/o la base nitrogenada es diferente de A, C, T y G y/o el grupo de enlace fosfato internucleosídico es diferente. Se describen ejemplos específicos de análogos de nucleósido, por ejemplo, por Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 y Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213, y en los esquemas 1

35 Se pretende que los términos "análogo de nucleósido/nucleótido correspondiente" y "nucleósido/nucleótido correspondiente" indiquen que la base nitrogenada en el análogo de nucleósido/nucleótido y el nucleósido/nucleótido es idéntica. Por ejemplo, cuando la unidad de 2-desoxirribosa del nucleótido está unida a una adenina, el "análogo de nucleósido correspondiente" contiene una unidad de pentosa (diferente de 2-desoxirribosa) unida a una adenina.

40 El término "ácido nucleico" se define como una molécula formada mediante enlace covalente de dos o más nucleótidos. Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Por ejemplo, ADN y ARN son ácidos nucleicos.

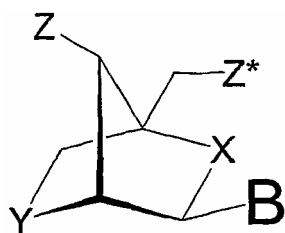
45 Un análogo de nucleótido preferido es ANB, tal como beta-D-oxi-ANB, alfa-L-oxi-ANB, beta-D-amino-ANB y beta-D-tio-ANB, lo más preferido es beta-D-oxi-ANB. Los compuestos de la invención son normalmente aquellos en los que dichos nucleótidos comprenden un grupo de enlace seleccionado del grupo que consiste en un grupo fosfato, un grupo fosforotioato y un grupo boranofosfato, el enlace internucleosídico puede ser -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, en particular un grupo fosfato y/o un grupo fosforotioato. En una realización particular, todos los nucleótidos comprenden un grupo fosforotioato. En una realización, algunos o todos de los nucleótidos están unidos entre sí por medio de un grupo fosforotioato. De manera adecuada, todos los nucleótidos están unidos entre sí por medio de un grupo fosforotioato.



En una realización interesante, los compuestos comprenden desde 3-8 análogos de nucleótido, por ejemplo 6 ó 7 análogos de nucleótido. En las realizaciones mucho más preferidas, al menos uno de dichos análogos de nucleótido es un ácido nucleico bloqueado (ANB), tal como al menos 3 o al menos 4 o al menos 5 o al menos 6 o al menos 7 u 8, de los análogos de nucleótido pueden ser ANB, en una realización todos los análogos de nucleótido pueden ser ANB.

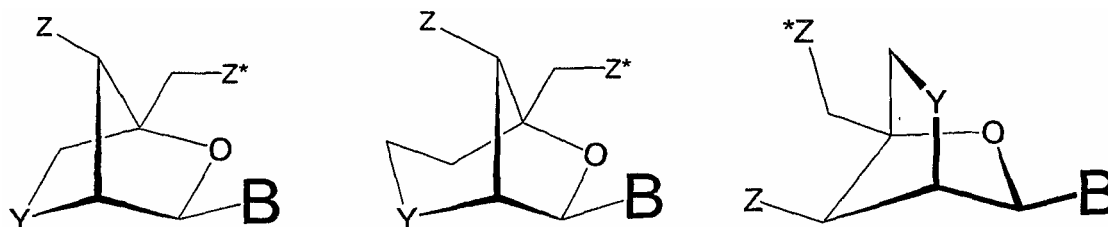
El término "ANB" se refiere a un análogo de nucleótido que contiene un análogo de nucleótido bicíclico, también denominado monómero de ANB.

El término "ANB" cuando se usa en el contexto de un "oligonucleótido de ANB" se refiere a un oligonucleótido que contiene uno o más análogos de nucleósido bicíclicos. El ácido nucleico bloqueado (ANB) usado en los compuestos oligonucleotídicos de la invención tiene la estructura de la fórmula general



X e Y se seleccionan independientemente de los grupos -O-, -S-, -N(H)-, N(R)-, -CH₂- o -CH- (si es parte de un doble enlace), -CH₂-O-, -CH₂-S-, -CH₂-N(H)-, -CH₂-N(R)-, -CH₂-CH₂- o -CH₂-CH- (si es parte de un doble enlace), -CH=CH-, en los que R se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄; Z y Z* se seleccionan independientemente de un enlace internucleosídico, un grupo terminal o un grupo protector; B constituye una nucleobase natural o no natural; y los grupos asimétricos pueden encontrarse en cualquier orientación.

Preferiblemente, el ácido nucleico bloqueado (ANB) usado en el compuesto oligonucleotídico de la invención comprende al menos una unidad de ácido nucleico bloqueado (ANB) según cualquiera de las fórmulas

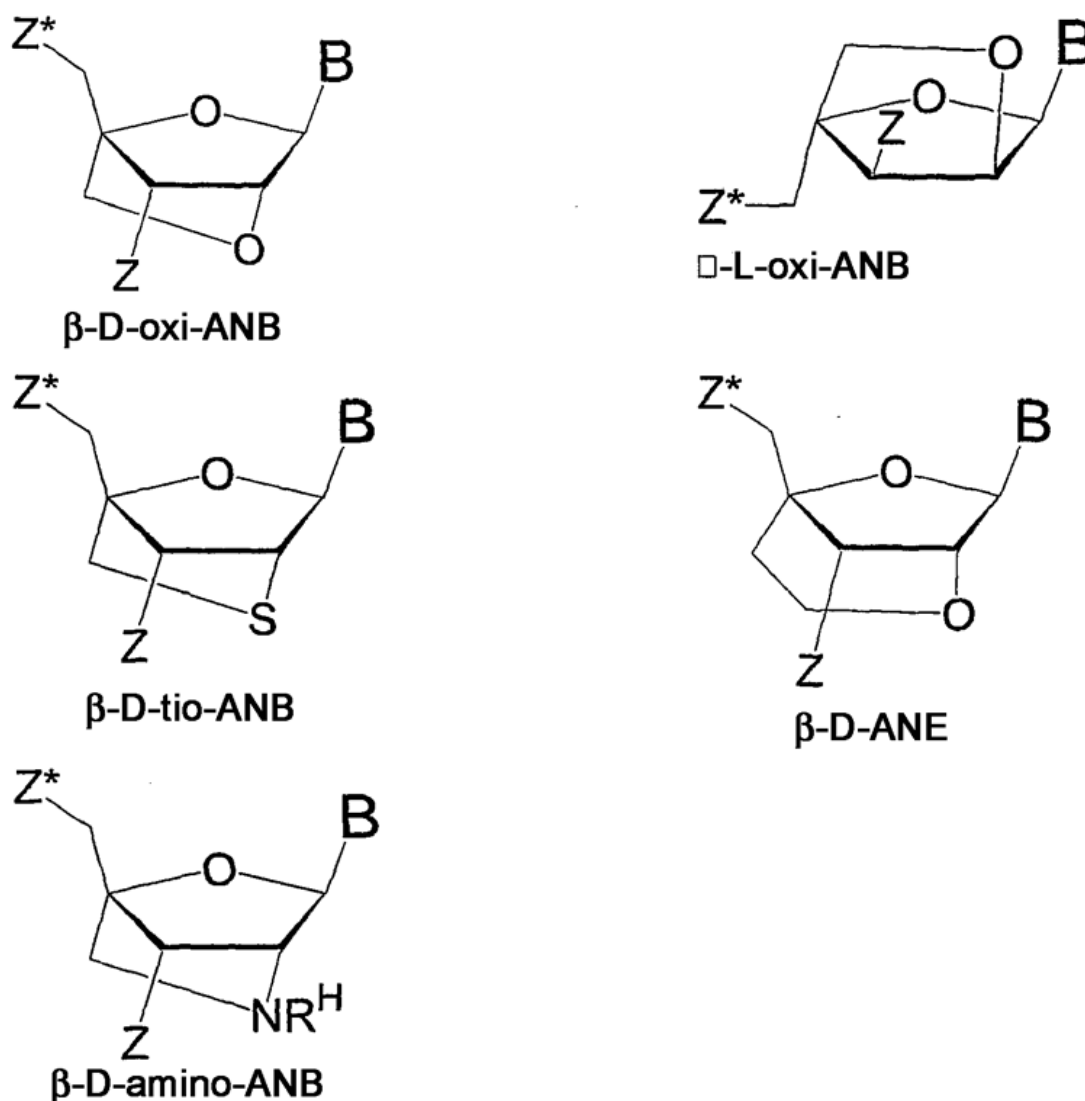


en las que Y es -O-, -S-, -NH- o N(RH); Z y Z* se seleccionan independientemente de un enlace internucleosídico, un grupo terminal o un grupo protector; B constituye una nucleobase natural o no natural, y R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄.

Preferiblemente, el ácido nucleico bloqueado (ANB) usado en el compuesto oligonucleotídico de la invención comprende enlaces internucleosídicos seleccionados del grupo que consiste en -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O)₂-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S-, -O-P(O,S)-S-, -S-P(O)₂-S-, -O-PO(R^H)-O-, O-PO(OCH₃)-O-, -O-PO(NR^H)-O-, -O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-, -O-PO(BH₃)-O-, -O-PO(NHR^H)-O-, -O-P(O)₂-NR^H-, -NR^H-P(O)₂-O-, -NR^H-CO-O-, en los que R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄.

Tal como se menciona, en una realización interesante de la invención, los compuestos oligonucleotídicos contienen al menos una unidad de química denominada ANB (ácido nucleico bloqueado).

Se muestran las unidades de ANB específicamente preferidas en el esquema 2.



Esquema 2

El término "tio-ANB" comprende un nucleótido bloqueado en el que al menos uno de X o Y en la fórmula general anterior se selecciona de S o $-\text{CH}_2\text{-S}-$. Tio-ANB puede estar en la configuración tanto beta-D como alfa-L.

5

El término "amino-ANB" comprende un nucleótido bloqueado en el que al menos uno de X o Y en la fórmula general anterior es $-\text{N}(\text{H})-$, $\text{N}(\text{R})-$, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{H})-$, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{R})-$ en los que R se selecciona de hidrógeno y alquilo C_{1-4} . Amino-ANB puede estar en la configuración tanto beta-D como alfa-L.

10 El término "oxi-ANB" comprende un nucleótido bloqueado en el que al menos uno de X o Y en la fórmula general anterior representa $-\text{O}-$ o $-\text{CH}_2\text{-O}-$. Oxi-ANB puede estar en la configuración tanto beta-D como alfa-L.

El término "ANE-ANB" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en la fórmula general anterior es $-\text{CH}_2\text{-O}-$ (en el que el átomo de oxígeno de $-\text{CH}_2\text{-O}-$ está unido a la 2'-posición con respecto a la nucleobase B).

15

En una realización preferida ANB se selecciona de beta-D-oxi-ANB, alfa-L-oxi-ANB, beta-D-amino-ANB y beta-D-tio-ANB, en particular beta-D-oxi-ANB. Los nucleósidos y/o ANB están normalmente unidos entre sí por medio de grupos fosfato y/o por medio de grupos fosforotioato.

20 El término "al menos [un número entero]" comprende los números enteros superiores o iguales a dicho número entero, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, etcétera.

Tal como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico diana" abarca ADN que codifica para una proteína de la ruta de ensamblaje de VLDL, incluyendo Apo-B100 y miR-122, ARN (incluyendo pre-ARNm y ARNm y ARNm editado) transcrito a partir de tal ADN y también ADNc derivado de tal ARN.

25

La "proteína diana" es apolipoproteína B de mamífero, preferiblemente apolipoproteína B de ser humano. Se reconocerá que dado que tanto ApoB-100 como ApoB-48 se originan de la misma secuencia genética, los compuestos oligoméricos según la invención pueden usarse para la regulación por disminución de cualquiera o ambas formas de apolipoproteína B, y tanto ARNm que codifica para ApoB-100 como la forma editada de ARN, que codifica para Apo-B48.

Tal como se usa en el presente documento, el término "gen" significa el gen incluyendo exones, intrones, regiones en 5' y 3' no codificantes y elementos reguladores y todas las variantes actualmente conocidas de los mismos y cualquier variante adicional que pueda esclarecerse.

Tal como se usa en el presente documento, el término "ARNm" significa el/los transcrito(s) de ARNm actualmente conocido(s) de un gen diana y cualquier transcrito adicional que pueda identificarse.

Tal como se usa en el presente documento, el término "modulación" significa o bien un aumento (estimulación) o bien una disminución (inhibición) en la expresión de un gen. En la presente invención, la inhibición es la forma preferida de modulación de la expresión génica y ARNm es una diana preferida.

Tal como se usa en el presente documento, el término "dirigir" un compuesto antisentido a un ácido nucleico diana particular significa proporcionar el oligonucleótido antisentido a la célula, animal o ser humano de tal manera que el compuesto antisentido puede unirse a, y modular la función de, su diana pretendida.

En una realización interesante, el extremo 3' del compuesto de la invención comprende un nucleótido en vez de un análogo de nucleótido.

Preferiblemente, el compuesto oligomérico, tal como un oligonucleótido antisentido, según la invención comprende al menos una unidad de ácido nucleico bloqueado (ANB), tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 unidades de ácido nucleico bloqueado (ANB), preferiblemente entre 4 y 8 unidades de ANB, tales como 4-6 unidades de ANB, lo más preferiblemente 4, 5 ó 6 unidades de ANB. De manera adecuada, el compuesto oligomérico puede comprender tanto beta-D-oxi-ANB como una o más de las siguientes unidades de ANB: tio-ANB, amino-ANB, oxi-ANB, ANE-ANB y/o alfa-ANB en las configuraciones o bien D-beta o bien L-alfa o combinaciones de las mismas.

Preferiblemente, el compuesto oligomérico, tal como un oligonucleótido antisentido, puede comprender unidades tanto de ANB como de ADN. Preferiblemente el total combinado de unidades de ANB y de ADN es de entre 10-15.

En una realización, dentro del compuesto oligomérico según la invención, tal como un oligonucleótido antisentido, que comprende ANB, todos los residuos C de ANB son 5'-metil-citosina.

Preparación de compuestos oligonucleotídicos

Los elementos estructurales de análogos de nucleótido de ANB, □-D-oxi-ANB, □-D-tio-ANB, □-D-amino-ANB y □-L-oxi-ANB, pueden prepararse siguiendo procedimientos publicados y referencias citadas en los mismos, véase, por ejemplo, el documento WO 03/095467 A1; D. S. Pedersen, C. Rosenbohm, T. Koch (2002) Preparation of LNA Phosphoramidites, Synthesis 6, 802-808; M. D. Sørensen, L. Kværnø, T. Brild, A. E. Håkansson, B. Verbeure, G. Gaubert, P. Herdewijn, J. Wengel (2002) □-L-ribo-configured Locked Nucleic Acid (□-l-LNA): Synthesis and Properties, J. Am. Chem. Soc., 124, 2164-2176; S. K. Singh, R. Kumar, J. Wengel (1998) Synthesis of Novel Bicyclo[2.2.1] Ribonucleosides: 2'-Amino- and 2'-Thio-LNA Monomeric Nucleosides, J. Org. Chem. 1998, 63, 6078-6079; C. Rosenbohm, S. M. Christensen, M. D. Sørensen, D. S. Pedersen, L. E. Larsen, J. Wengel, T. Koch (2003) Synthesis of 2'-amino-LNA: a new strategy, Org. Biomol. Chem. 1, 655-663; y el documento WO 2004/069991 A2.

Un ejemplo particular de un monómero de timidina de ANB es (1S,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-hidroximetil-3-(timidin-1il)-2,5-dioxa-biciclo[2:2:1]heptano.

Los oligonucleótidos de ANB pueden prepararse tal como se describe en los ejemplos y en los documentos WO 99/14226, WO 00/56746, WO 00/56748, WO 00/66604, WO 00/125248, WO 02/28875, WO 2002/094250 y WO 03/006475. Por tanto, los oligonucleótidos de ANB pueden producirse usando las técnicas de oligomerización de química de ácidos nucleicos bien conocidas por un experto habitual en la técnica de química orgánica. Generalmente, se usa el enfoque de ciclos de oligomerización convencionales del la fosforamidita (S. L. Beaucage y R. P. Iyer, Tetrahedron, 1993, 49, 6123; S. L. Beaucage y R. P. Iyer, Tetrahedron, 1992, 48, 2223), pero también puede usarse, por ejemplo, química de H-fosfonato, química de fosfotriéster.

Para algunos monómeros, puede ser necesario o beneficioso un tiempo de acoplamiento más prolongado y/o acoplamientos repetidos y/o el uso de reactivos de acoplamiento más concentrados.

Las fosforamiditas empleadas se acoplan normalmente con rendimientos por etapas >95% satisfactorios. La oxidación de fósforo (III) para dar fósforo (V) se realiza normalmente con, por ejemplo, yodo/piridina/H₂O. Esto

produce, tras la desprotección, el enlace internucleosídico fosforodiéster nativo. En el caso de preparar un enlace internucleosídico fosforotioato, se realiza una etapa de tiolación cambiando la oxidación normal, por ejemplo con yodo/piridina/H₂O, usada para la síntesis de enlaces internucleosídicos fosforodiéster, por una oxidación que usa el reactivo ADTT (hidruro de xantano (0,01 M en acetonitrilo:piridina 9:1; v/v)). También es posible usar otros reactivos de tiolación, tales como Beaucage y PADS. Los oligonucleótidos de ANB de fosforotioato se sintetizaron eficazmente con rendimientos de acoplamiento por etapas $\geq 98\%$.

También pueden sintetizarse eficazmente oligonucleótidos de ANB que comprenden □-D-amino-ANB, □-D-tio-ANB y/o □-L-ANB con rendimientos de acoplamiento por etapas $\geq 98\%$ usando los procedimientos de fosforamidita.

Puede lograrse la purificación de oligonucleótidos de ANB usando cartuchos de purificación de fase inversa desechables y/o HPLC de fase inversa y/o precipitación en etanol o butanol. Se usaron electroforesis en gel capilar, HPLC de fase inversa, MALDI-EM y ESI-EM para verificar la pureza de los oligonucleótidos de ANB sintetizados.

Sales

El compuesto oligomérico puede emplearse en una variedad de sales farmacéuticamente aceptables. Tal como se usa en el presente documento, el término se refiere a sales que conservan la actividad biológica deseada del oligonucleótido de ANB y muestran efectos toxicológicos no deseados mínimos. Pueden formarse ejemplos no limitativos de tales sales con aminoácidos orgánicos y sales de adición de bases formadas con cationes de metales tales como zinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio, sodio, potasio y similares o con un catión formado a partir de amoníaco, N,N-dibenciletilen-diamina, D-glucosamina, tetraetilamonio o etilendiamina; o combinaciones, por ejemplo, una sal de tanato de zinc o similar.

Tales sales se forman a partir del compuesto oligomérico que presenta un grupo fosforodiéster y/o grupos fosforotioato, y son, por ejemplo, sales con bases adecuadas. Estas sales incluyen, por ejemplo, sales de metales no tóxicas que se derivan de metales de los grupos Ia, Ib, IIa y IIb del sistema periódico de los elementos, en particular sales de metales alcalinos adecuados, por ejemplo sales de litio, sodio o potasio o sales de metales alcalinotérreos, por ejemplo sales de magnesio o calcio. Además incluyen sales de zinc y amonio y también sales que se forman con aminas orgánicas adecuadas, tales como mono, di o tri-alquilaminas no sustituidas o sustituidas con hidroxilo, en particular mono, di o tri-alquilaminas o con compuestos de amonio cuaternario, por ejemplo con N-metil-N-etilamina, dietilamina, trietilamina, mono, bis o tris-(2-hidroxi-alquil inferior)aminas, tales como mono, bis o tris-(2-hidroxi)etilamina, 2- hidroxi-terc-butilamina o tris(hidroxi)etilmetilamina, N,N-di-alquil inferior-N-(hidroxi-alquil inferior)aminas, tales como N,N-dimetil-N-(2-hidroxi)etilamina o tri-(2-hidroxi)etilamina o N-metil-D-glucamina o compuestos de amonio cuaternario tales como sales de tetrabutilamonio. Se prefieren sales de litio, sales de sodio, sales de magnesio, sales de zinc o sales de potasio, prefiriéndose particularmente las sales de sodio.

Profármacos

En una realización, el oligonucleótido de ANB puede estar en forma de un profármaco. Los oligonucleótidos son por naturaleza iones cargados negativamente. Debido a la naturaleza lipófila de las membranas celulares, la captación celular de oligonucleótidos se reduce en comparación con equivalentes neutros o lipófilos. Este "impedimento" por polaridad puede evitarse usando el enfoque de profármacos (véase por ejemplo Crooke, R. M. (1998) en Crooke, S. T. Antisense research and Application. Springer-Verlag, Berlín, Alemania, vol. 131, págs. 103-140). En este enfoque, los compuestos oligoméricos se preparan de una manera protegida de modo que los compuestos oligoméricos son neutros cuando se administran. Estos grupos de protección se diseñan de tal manera que pueden eliminarse cuando las células captan el oligonucleótido de ANB. Ejemplos de tales grupos de protección son S-acetilthioetilo (SATO) o S-pivaloilthioetilo (t-butil-SATO). Estos grupos de protección son resistentes a la nucleasa y se eliminan selectivamente de manera intracelular.

Conjugados

En una realización de la invención, el oligonucleótido puede unirse a ligandos/conjugados, que pueden usarse, por ejemplo para aumentar la captación celular del oligonucleótido. Esta conjugación puede tener lugar en las posiciones terminales 5'/3'-OH pero los ligandos también pueden tener lugar en los azúcares y/o las bases. 3'-OH es el sitio preferido para la conjugación con colesterol.

En una realización preferida, el oligonucleótido de la invención se conjuga con un resto que mejora la captación *in vivo* del complejo de ARN, tal como colesterol.

La invención también proporciona un conjugado que comprende el oligonucleótido según la invención tal como se describe en el presente documento, y al menos un resto distinto de nucleótido o distinto de polinucleótido unido de manera covalente a dicho oligonucleótido.

Por tanto, el compuesto oligomérico puede, por ejemplo, conjugarse o formar una quimera con restos distintos de nucleótido o distintos de polinucleótido incluyendo ácidos nucleicos peptídicos (ANP), proteínas (por ejemplo

anticuerpos para una proteína diana), macromoléculas, principios activos de bajo peso molecular, cadenas de ácidos grasos, residuos de azúcares, glicoproteínas, polímeros (por ejemplo polietilenglicol), grupos formadores de micelas, anticuerpos, hidratos de carbono, grupos de unión a receptor, esteroides tales como colesterol, polipéptidos, agentes de intercalación tales como un derivado de acridina, un alcohol de cadena larga, un dendrímero, un fosfolípido y otros grupos lipófilos o combinaciones de los mismos, etc., al igual que puede disponerse el compuesto oligomérico en estructuras diméricas o dendríticas. El compuesto oligomérico o los conjugados también pueden conjugarse o conjugarse adicionalmente con principios activos, por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, un fármaco de sulfa, un antidiabético, un agente antibacteriano, un compuesto quimioterápico o un antibiótico.

10 Composición farmacéutica

Un aspecto particularmente interesante de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto tal como se define en el presente documento o un conjugado tal como se define en el presente documento, y un diluyente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En una realización particularmente interesante, la composición farmacéutica está adaptada para la administración oral.

Pueden encontrarse instrucciones para la preparación de composiciones farmacéuticas en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" de Alfonso R. Gennaro, y a continuación.

Debe entenderse que la presente invención también es particularmente relevante para una composición farmacéutica que comprende al menos un constructo de oligonucleótido antisentido de la invención como principio activo. Debe entenderse que la composición farmacéutica según la invención comprende opcionalmente un portador farmacéutico y que la composición farmacéutica comprende opcionalmente compuestos antisentido adicionales, agentes quimioterápicos, agentes hipocolesterolemiantes, compuestos antiinflamatorios, compuestos antivirales y/o compuestos inmunomoduladores.

Tal como se menciona, la composición farmacéutica de la invención puede comprender adicionalmente al menos un compuesto terapéutico/profiláctico. El compuesto se selecciona normalmente del grupo que consiste en resinas secuestradoras de sales biliares (por ejemplo, colestiramina, colestipol y clorhidrato de colesvelam), inhibidores de HMGCoA reductasa (por ejemplo, lovastatina, cerivastatina, prevastatina, atorvastatina, simvastatina y fluvastatina), ácido nicotínico, derivados de ácido fibrótico (por ejemplo, clofibrato, gemfibrozilo, fenofibrato, bezafibrato y ciprofibrato), probucol, neomicina, dextrotiroxina, ésteres de estanoles vegetales, inhibidores de la absorción de colesterol (por ejemplo, ezetimiba), implitapida, inhibidores de transportadores de ácidos biliares (transportadores de ácidos biliares dependientes de sodio apicales), reguladores de CYP7a hepática, agentes terapéuticos de sustitución de estrógeno (por ejemplo, tamoxifeno) y antiinflamatorios (por ejemplo, glucocorticoides).

El compuesto oligonucleotídico o el conjugado comprendido en esta invención puede emplearse en una variedad de sales farmacéuticamente aceptables. Tal como se usa en el presente documento, el término se refiere a sales que conservan la actividad biológica deseada de los compuestos identificados en el presente documento y muestran efectos toxicológicos no deseados mínimos, véase "Conjugados".

En una realización de la invención el compuesto oligonucleotídico o el conjugado puede estar en forma de un profármaco, véase "Profármacos".

La invención también incluye la formulación de uno o más compuestos oligonucleotídicos o conjugados tal como se da a conocer en el presente documento. Los agentes aglutinantes y adyuvantes farmacéuticamente aceptables pueden comprender parte del fármaco formulado. Cápsulas, comprimidos, pastillas, etc., pueden contener por ejemplo los siguientes compuestos: celulosa microcristalina, goma o gelatina como aglutinantes; almidón o lactosa como excipientes; estearatos como lubricantes; diversos agentes edulcorantes o aromatizantes. Para cápsulas la unidad de dosificación puede contener un portador líquido tal como aceites grasos. Asimismo, recubrimientos de azúcar o agentes entéricos pueden ser parte de la unidad de dosificación. Las formulaciones de oligonucleótidos también pueden ser emulsiones de los principios farmacéuticos activos y un lípido que forma una emulsión micelar. Tales formulaciones son particularmente útiles para la administración oral.

Puede mezclarse un oligonucleótido de la invención con cualquier material que no altera la acción deseada o con material que complementa la acción deseada. Estos pueden incluir otros fármacos incluyendo otros compuestos nucleotídicos.

Para la administración parenteral, subcutánea, intradérmica o tópica la formulación puede incluir un diluyente estéril, tampones, reguladores de la tonicidad y agentes antibacterianos. El compuesto activo puede prepararse con portadores que protegen frente a la degradación o eliminación inmediata del organismo, incluyendo implantes o microcápsulas con propiedades de liberación controlada. Para la administración intravenosa los portadores preferidos son solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de varias maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y de la zona a tratar. La administración puede ser (a) oral (b)

pulmonar, por ejemplo, mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador; intratraqueal, intranasal, (c) tópica incluyendo epidérmica, transdérmica, oftálmica y a membranas mucosas incluyendo administración vaginal y rectal; o (d) parenteral incluyendo inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular.

5 En una realización el oligonucleótido de ANB activo se administra i.v., i.p., por vía oral, tópica o como inyección en bolo o se administra directamente en el órgano diana.

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir disoluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero sin limitarse a, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

10

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una variedad de componentes que incluyen, pero no se limitan a, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes. El suministro de fármaco a tejido hepático puede potenciarse mediante suministro mediado por portador incluyendo, pero sin limitarse a, liposomas catiónicos, ciclodextrinas, derivados de porfirina, dendrímeros de cadena ramificada, polímeros de polietilenimina, nanopartículas y microesferas (Dass CR. J Pharm Pharmacol 2002; 54(1):3-27).

15

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma farmacéutica unitaria, pueden prepararse según técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el/los portador(es) o excipiente(es) farmacéutico(s). En general las formulaciones se preparan poniendo en asociación de manera uniforme e íntima los principios activos con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos y entonces, si es necesario, conformando el producto.

20

Las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de muchas formas farmacéuticas posibles tales como, pero sin limitarse a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos y supositorios. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

25

En una determinada realización, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más compuestos antisentido y (b) uno o más de otros agentes hipocolesterolemiantes que funcionan mediante un mecanismo distinto de antisentido. Cuando se usan con los compuestos de la invención, tales agentes hipocolesterolemiantes pueden usarse de manera individual (por ejemplo atorvastatina y oligonucleótido), secuencial (por ejemplo atorvastatina y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido por otro agente y oligonucleótido) o en combinación con uno o más de otros de tales agentes hipocolesterolemiantes.

30

También pueden combinarse fármacos antiinflamatorios, incluyendo, pero sin limitarse a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, fármacos antivirales y fármacos inmunomoduladores, en composiciones de la invención. Dos o más compuestos combinados pueden usarse juntos o secuencialmente.

35

En otra realización, las composiciones de la invención pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a una segunda diana de ácido nucleico. Dos o más compuestos combinados pueden usarse juntos o secuencialmente.

40

La dosificación depende de la intensidad y la receptividad del estado patológico que va a tratarse, y el ciclo de tratamiento dura desde varios días hasta varios meses o hasta que se obtiene una curación o se logra una disminución del estado patológico. Pueden calcularse calendarios de dosificación óptimos a partir de mediciones de acumulación de fármaco en el organismo del paciente.

45

Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de oligonucleótidos individuales. Generalmente pueden estimarse basándose en CE_{50} que se encuentra que son eficaces *in vitro* y en modelos animales *in vivo*. En general, la dosificación es de desde 0,01 µg hasta 1 g por kg de peso corporal y puede administrarse una o más veces al día, a la semana, al mes o al año o incluso una vez cada de 2 a 10 años o mediante infusión continua durante desde unas horas hasta varios meses. Las tasas de repetición para la dosificación pueden estimarse basándose en tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en tejidos o fluidos corporales. Tras un tratamiento satisfactorio, puede ser deseable hacer que el paciente se someta a una terapia de mantenimiento para prevenir la recidiva del estado patológico. La evaluación de un régimen de dosificación eficaz de un oligonucleótido particular es rutinaria para el experto en la técnica, usando conocimiento conocido en la técnica y la información facilitada en esta solicitud, y no requerirá experimentación excesiva.

50

Un experto en la técnica apreciará que pueden usarse inhibidores de ensamblaje de VLDL tales como inhibidores de apoB-100 o inhibidores de MTP junto con compuestos inhibidores de miR-122 en un método de tratamiento de VHC.

5. El oligonucleótido según una cualquiera de las realizaciones 1 a 4 o un conjugado del mismo, en el que al menos dos, tal como dos o tres, unidades de ADN desde las posiciones uno a seis, dos a siete o tres a ocho, contando desde el extremo 3', se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente y en el que las unidades de ANB están separadas por al menos una unidad de ADN.
6. El oligonucleótido según la realización 5 o un conjugado del mismo, en el que el número de unidades de ADN consecutivas desde las posiciones uno a seis, dos a siete o tres a ocho, contando desde el extremo 3', es como máximo de dos.
7. El oligonucleótido según la realización 6 o un conjugado del mismo, en el que un nucleótido sí y uno no desde las posiciones uno a seis, dos a siete o tres a ocho, contando desde el extremo 3', es una unidad de ANB.
8. El oligonucleótido según la realización 6 o un conjugado del mismo, en el que un nucleótido sí y dos no desde las posiciones uno a seis, dos a siete o tres a ocho, contando desde el extremo 3', es una unidad de ANB.
9. El oligonucleótido según la realización 6 o un conjugado del mismo, en el que el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones uno a seis, dos a siete o tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en: xxXxxX, xxXxXx, xXxxXx, xXxXxx, XxxXxx, xXxXxX, XxXxXx, XxxXxX y XxXxxX; en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad de ADN.
10. El oligonucleótido según la realización 9 o un conjugado del mismo, en el que el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones uno a seis, dos a siete o tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xxXxxX, xXxxXx, XxxXxx, xXxXxX y XxXxXx; en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad de ADN.
11. El oligonucleótido según la realización 1 o un conjugado del mismo que tiene una secuencia de ADN desde las posiciones uno a siete, dos a ocho o tres a nueve, contando desde el extremo 3': acgttta, en la que al menos una, tal como una, preferiblemente al menos dos, tal como dos, más preferiblemente al menos tres, tal como tres o cuatro, unidades de ADN en dicha secuencia se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente.
12. El oligonucleótido según la realización 2 o un conjugado del mismo que tiene una secuencia de ADN desde las posiciones uno a siete, dos a ocho o tres a nueve, contando desde el extremo 3': ctcacac, en la que al menos una, tal como una, preferiblemente al menos dos, tal como dos, más preferiblemente al menos tres, tal como tres o cuatro, unidades de ADN en dicha secuencia se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente.
13. El oligonucleótido según la realización 3 o un conjugado del mismo que tiene una secuencia de ADN desde las posiciones uno a siete, dos a ocho o tres a nueve, contando desde el extremo 3': ttacgat, en la que al menos una, tal como una, preferiblemente al menos dos, tal como dos, más preferiblemente al menos tres, tal como tres o cuatro, unidades de ADN en dicha secuencia se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente.
14. El oligonucleótido según la realización 4 o un conjugado del mismo que tiene una secuencia de ADN desde las posiciones uno a siete, dos a ocho o tres a nueve, contando desde el extremo 3': acaagca, en la que al menos una, tal como una, preferiblemente al menos dos, tal como dos, más preferiblemente al menos tres, tal como tres o cuatro, unidades de ADN en dicha secuencia se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente.
15. El oligonucleótido según una cualquiera de las realizaciones 11 a 14 o un conjugado del mismo, en el que al menos dos, tal como dos, tres o cuatro, unidades de ADN desde las posiciones uno a siete, dos a ocho o tres a nueve, contando desde el extremo 3', se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente y en el que las unidades de ANB están separadas por al menos una unidad de ADN.
16. El oligonucleótido según la realización 15 o un conjugado del mismo, en el que el número de unidades de ADN consecutivas desde las posiciones uno a siete, dos a ocho o tres a nueve, contando desde el extremo 3', es como máximo de dos.
17. El oligonucleótido según la realización 16 o un conjugado del mismo, en el que un nucleótido sí y uno no desde las posiciones uno a siete, dos a ocho o tres a nueve, contando desde el extremo 3', es una unidad de ANB.
18. El oligonucleótido según la realización 16 o un conjugado del mismo, en el que un nucleótido sí y dos no desde las posiciones uno a siete, dos a ocho o tres a nueve, contando desde el extremo 3', es una unidad de ANB.
19. El oligonucleótido según la realización 16 o un conjugado del mismo, en el que el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones uno a siete, dos a ocho o tres a nueve, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xxXxxXx, xxXxXxx, xXxxXxx, xxXxXxX, xXxxXxX, xXxXxxX, XxxXxxX, XxxXxXx,

XxXxxXx, XxXxXxx y XxXxXxX; en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad de ADN.

20. El oligonucleótido según la realización 19 o un conjugado del mismo, en el que el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones uno a siete, dos a ocho o tres a nueve, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xxXxxXx, xXxxXxx, XxxXxxX, xXxXxXx, XxXxXxX y XxXxXxx; en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad de ADN.
21. El oligonucleótido según la realización 11 o un conjugado del mismo que tiene una secuencia de ADN desde las posiciones uno a ocho, dos a nueve o tres a diez, contando desde el extremo 3': acgttttag, en la que al menos una, tal como una, preferiblemente al menos dos, tal como dos, más preferiblemente al menos tres, tal como tres o cuatro, unidades de ADN en dicha secuencia se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente.
22. El oligonucleótido según la realización 12 o un conjugado del mismo que tiene una secuencia de ADN desde las posiciones uno a ocho, dos a nueve o tres a diez, contando desde el extremo 3': ctacact, en la que al menos una, tal como una, preferiblemente al menos dos, tal como dos, más preferiblemente al menos tres, tal como tres o cuatro, unidades de ADN en dicha secuencia se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente.
23. El oligonucleótido según la realización 13 o un conjugado del mismo que tiene una secuencia de ADN desde las posiciones uno a ocho, dos a nueve o tres a diez, contando desde el extremo 3': ttacgatt, en la que al menos una, tal como una, preferiblemente al menos dos, tal como dos, más preferiblemente al menos tres, tal como tres o cuatro, unidades de ADN en dicha secuencia se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente.
24. El oligonucleótido según la realización 14 o un conjugado del mismo que tiene una secuencia de ADN desde las posiciones uno a ocho, dos a nueve o tres a diez, contando desde el extremo 3': acaagcaa, en la que al menos una, tal como una, preferiblemente al menos dos, tal como dos, más preferiblemente al menos tres, tal como tres o cuatro, unidades de ADN en dicha secuencia se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente.
25. El oligonucleótido según una cualquiera de las realizaciones 21 a 24 o un conjugado del mismo, en el que al menos dos, tal como dos, tres o cuatro, unidades de ADN desde las posiciones uno a ocho, dos a nueve o tres a diez, contando desde el extremo 3', se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente y en el que las unidades de ANB están separadas por al menos una unidad de ADN.
26. El oligonucleótido según la realización 25 o un conjugado del mismo, en el que el número de unidades de ADN consecutivas desde las posiciones uno a ocho, dos a nueve o tres a diez, contando desde el extremo 3', es como máximo de dos.
27. El oligonucleótido según la realización 26 o un conjugado del mismo, en el que un nucleótido sí y uno no desde las posiciones uno a ocho, dos a nueve o tres a diez, contando desde el extremo 3', es una unidad de ANB.
28. El oligonucleótido según la realización 26 o un conjugado del mismo, en el que un nucleótido sí y dos no desde las posiciones uno a ocho, dos a nueve o tres a diez, contando desde el extremo 3', es una unidad de ANB.
29. El oligonucleótido según la realización 26 o un conjugado del mismo, en el que el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones uno a ocho, dos a nueve o tres a diez, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xxXxxXxx, xXxxXxxX, xXxXxxXx, xXxXxxXx, xXxxXxxX, xXxxXxxX, xXxxXxxX, xXxxXxxX, XxxXxxXx, XxxXxxXx, XxxXxxXx, xXxxXxxX, XxxXxxXx, XxxXxxXx, XxxXxxXx y XxXxXxX; en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad de ADN.
30. El oligonucleótido según la realización 29 o un conjugado del mismo, en el que el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones uno a ocho, dos a nueve o tres a diez, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xxXxxXxx, xXxxXxxX, XxxXxxXx, xXxxXxxX, XxxXxxXx y XxXxXxxX; en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad de ADN.
31. El oligonucleótido según la realización 21 o un conjugado del mismo que tiene una secuencia de ADN desde las posiciones uno a nueve, dos a diez o tres a once, contando desde el extremo 3': acgttttagg, en la que al menos una, tal como una, preferiblemente al menos dos, tal como dos, más preferiblemente al menos tres, tal como tres, incluso más preferiblemente al menos cuatro, tal como cuatro o cinco, unidades de ADN en dicha secuencia se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente.
32. El oligonucleótido según la realización 22 o un conjugado del mismo que tiene una secuencia de ADN desde las posiciones uno a nueve, dos a diez o tres a once, contando desde el extremo 3': ctacactg, en la que al menos una, tal como una, preferiblemente al menos dos, tal como dos, más preferiblemente al menos tres, tal como tres, incluso más preferiblemente al menos cuatro, tal como cuatro o cinco, unidades de ADN en dicha secuencia se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente.
33. El oligonucleótido según la realización 23 o un conjugado del mismo que tiene una secuencia de ADN desde las

posiciones uno a nueve, dos a diez o tres a once, contando desde el extremo 3': ttacgatta, en la que al menos una, tal como una, preferiblemente al menos dos, tal como dos, más preferiblemente al menos tres, tal como tres, incluso más preferiblemente al menos cuatro, tal como cuatro o cinco, unidades de ADN en dicha secuencia se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente.

34. El oligonucleótido según la realización 24 o un conjugado del mismo que tiene una secuencia de ADN desde las posiciones uno a nueve, dos a diez o tres a once, contando desde el extremo 3': acaagcaag, en la que al menos una, tal como una, preferiblemente al menos dos, tal como dos, más preferiblemente al menos tres, tal como tres, incluso más preferiblemente al menos cuatro, tal como cuatro o cinco, unidades de ADN en dicha secuencia se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente.

35. El oligonucleótido según una cualquiera de las realizaciones 21 a 24 o un conjugado del mismo, en el que al menos dos, tal como dos, tres, cuatro o cinco, unidades de ADN desde las posiciones uno a nueve, dos a diez o tres a once, contando desde el extremo 3', se han sustituido por su unidad de ANB correspondiente y en el que las unidades de ANB están separadas por al menos una unidad de ADN.

36. El oligonucleótido según la realización 35 o un conjugado del mismo, en el que el número de unidades de ADN consecutivas desde las posiciones uno a nueve, dos a diez o tres a once, contando desde el extremo 3', es como máximo de dos.

37. El oligonucleótido según la realización 36 o un conjugado del mismo, en el que un nucleótido sí y uno no desde las posiciones uno a nueve, dos a diez o tres a once, contando desde el extremo 3', es una unidad de ANB.

38. El oligonucleótido según la realización 36 o un conjugado del mismo, en el que un nucleótido sí y dos no desde las posiciones uno a nueve, dos a diez o tres a once, contando desde el extremo 3', es una unidad de ANB.

39. El oligonucleótido según la realización 36 o un conjugado del mismo, en el que el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones uno a nueve, dos a diez o tres a once, contando desde el extremo 3', se selecciona del grupo que consiste en xxXxxXxxX, xxXxxXxxX, xxXxxXxxX, xxXxxXxxX, xXxxXxxXx, xXxxXxxXxx, xXxxXxxXxx, XxxXxxXxx, xxXxxXxxX, xXxxXxxXx, xXxxXxxXx, xXxxXxxXx, XxxXxxXxx, XxxXxxXxx, XxxXxxXxx, XxxXxxXxx, XxxXxxXxx y XxxXxxXxx; en el que "X" indica una unidad de ANB y "x" indica una unidad de ADN.

40. El oligonucleótido según cualquiera de las realizaciones anteriores o un conjugado del mismo, en el que dicho nucleótido tiene una longitud de desde 12 hasta 24 nucleótidos, tal como una longitud de desde 12 hasta 22 nucleótidos, preferiblemente una longitud de desde 12 hasta 20 nucleótidos, tal como una longitud de desde 12 hasta 19 nucleótidos, más preferiblemente una longitud de desde 12 hasta 18 nucleótidos, tal como una longitud de desde 12 hasta 17 nucleótidos, incluso más preferiblemente una longitud de desde 12 hasta 16 nucleótidos.

41. El oligonucleótido según la realización 1 que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en $tg^{Me}CatGgaTttGca^{Me}Ca$, $tg^{Me}CatGgaTttGca^{Me}C$, $^{Me}CatGgaTttGca^{Me}C$, $tGcAtGgAtTtGcAc$, $cAtGgAtTtGcAc$, $^{Me}CatGGatTtGcA^{Me}C$, $Tg^{Me}CatGGatTtGcA^{Me}C$ y $Tg^{Me}CaTgGaTtTtGcAcA$; en el que una letra minúscula identifica la base nitrogenada de una unidad de ADN y una letra mayúscula identifica la base nitrogenada de una unidad de ANB; o un conjugado del mismo. (SEQ ID NO: 75-82)

42. El oligonucleótido según la realización 2 que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en $c^{Me}CatTgtCacAct^{Me}Cca$, $c^{Me}CatTgtAacTct^{Me}Cca$, $ccAttGtcAca^{Me}Ctc^{Me}Ca$, $c^{Me}CatTgt^{Me}CacAct^{Me}Cc$, $atTgt^{Me}CacAct^{Me}Cc$, $ccAttGtcAca^{Me}Ctc^{Me}C$, $AttGtcAca^{Me}Ctc^{Me}C$, $aTtGt^{Me}CaCa^{Me}Ct^{Me}Cc$, $AttGTca^{Me}Ca^{Me}Ct^{Me}C^{Me}C$, $^{Me}CcAttGTca^{Me}Ca^{Me}Ct^{Me}C^{Me}C$, $^{Me}CcaTgtTcacActc^{Me}Ca$ y $^{Me}C^{Me}CATTgtcacact^{Me}C^{Me}Ca$; en el que una letra minúscula identifica la base nitrogenada de una unidad de ADN y una letra mayúscula identifica la base nitrogenada de una unidad de ANB; o un conjugado del mismo. (SEQ ID NO: 83-94)

43. El oligonucleótido según la realización 3 que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en $t^{Me}CacGatTag^{Me}CatTaa$, $aTca^{Me}CgaTtaGcaTta$, $TcAcGaTtAg^{Me}CaTta$, $AtcAcGaTtAg^{Me}CaTta$; en el que una letra minúscula identifica la base nitrogenada de una unidad de ADN y una letra mayúscula identifica la base nitrogenada de una unidad de ANB; o un conjugado del mismo. (SEQ ID NO 95-98).

44. El oligonucleótido según la realización 4 que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en $gAgc^{Me}CgaAcgAacAa$, $gc^{Me}CgaAcgAacAa$, $GaGc^{Me}CgAa^{Me}CgAa^{Me}Ca$, y $Gc^{Me}CgAaMBCgAa^{Me}Ca$; en el que una letra minúscula identifica la base nitrogenada de una unidad de ADN y una letra mayúscula identifica la base nitrogenada de una unidad de ANB; o un conjugado del mismo. (SEQ ID NO: 99-102).

45. El oligonucleótido según cualquiera de las realizaciones anteriores o un conjugado del mismo, en el que el oligonucleótido comprende al menos un grupo de enlace internucleosídico diferente de fosfodiéster.

46. El oligonucleótido según la realización 45 o un conjugado del mismo, en el que dicho grupo de enlace

internucleosídico, diferente de fosfodiéster, es fosforotioato.

47. El oligonucleótido según la realización 46 o un conjugado del mismo, en el que todos los grupos de enlace internucleosídico son fosforotioato.

5 48. El oligonucleótido según cualquiera de las realizaciones anteriores o un conjugado del mismo, en el que dichas unidades de ANB se seleccionan independientemente del grupo que consiste en tio-unidades de ANB, amino-unidades de ANB y oxi-unidades de ANB.

10 49. El oligonucleótido según la realización 48 o un conjugado del mismo, en el que dichas unidades de ANB están en la forma beta-D.

Realizaciones específicas referentes al uso de una combinación de compuestos para el tratamiento de VHC:

15 1. Un medicamento para el tratamiento de infección por VHC, que comprende el inhibidor de miR-122 y el inhibidor de ensamblaje de VLDL.

20 2. El inhibidor de miR122 como medicamento para el tratamiento de infección por VHC en pacientes tratados con el inhibidor de ensamblaje de VLDL.

3. El inhibidor de ensamblaje de VLDL como medicamento para el tratamiento de infección por VHC en pacientes tratados con el inhibidor de miR-122.

25 4. El inhibidor de ensamblaje de VLDL según una cualquiera de las realizaciones 1-3, en el que el inhibidor de ensamblaje de VLDL, que va a usarse en combinación con un inhibidor de miR-122, es un inhibidor de una molécula importante para el ensamblaje de VLDL, tal como, en un ejemplo no limitativo, apoB-48, apoB-100, apoC, apoE, MTP (proteína de transferencia microsomial), TGH (triacilglicerol hidrolasa), ACAT2 (acil-COA:colesterol acil transferasa del hígado y del intestino), fosfolipasa D, iPLA2 (fosfolipasa citosólica independiente de calcio A2).

30 5. Un inhibidor de ensamblaje de VLDL según la realización 4, en el que el inhibidor es un inhibidor de ApoB-100, y el compuesto es uno cualquiera de SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 103 o uno cualquiera de los compuestos dados a conocer en la tabla 1.

35 6. El inhibidor de miR-122 tiene SEQ ID NO: 63.

7. El uso según una cualquiera de las realizaciones 1-6, en el que el medicamento es para la prevención de reinfección postrasplante.

40 8. El uso según una cualquiera de las realizaciones 1-6, en el que el medicamento es para el tratamiento profiláctico.

9. El uso según una cualquiera de las realizaciones 1-6, en el que el medicamento es para el tratamiento de pacientes infectados por VHC (en el que no 4 ó 5).

45 10. El uso según una cualquiera de las realizaciones 1-9, en el que el medicamento se prepara para el tratamiento de pacientes que son resistentes a otro tratamiento existente, tal como tratamiento con interferón y/o ribavirina.

50 11. El uso según una cualquiera de las realizaciones 1-10, en el que el antagonista de APOB-100 o MTP es un oligonucleótido complementario a la totalidad o parte de la secuencia de ARNm de APOB-100 o a la secuencia de ARNm de MTP.

12. El uso según la realización 11, en el que el oligonucleótido contiene uno o más residuos de ANB.

55 13. El uso según una cualquiera de las realizaciones 1-12, en el que el inhibidor de miR-122 es un oligonucleótido que es complementario a la totalidad o parte de la secuencia de ARNm de miR-122.

14. El uso según la realización 13, en el que el oligonucleótido contiene uno o más residuos de ANB.

15. El uso según una cualquiera de las realizaciones 1-13, en el que el medicamento se administra por vía parental.

60 15. El uso según una cualquiera de las realizaciones 1-14, en el que el medicamento se administra por vía intravenosa o intramuscular o intraperitoneal.

65 16. El uso según una cualquiera de las realizaciones 1-15, en el que el inhibidor de miR-122 y el inhibidor de APOB-100 se administran simultáneamente en un régimen de dosificación combinado.

17. El uso según una cualquiera de las realizaciones 1-15, en el que el inhibidor de miR-122 y el inhibidor de APOB-

100 se administran simultáneamente en regímenes de dosificación separados.

18. El uso según una cualquiera de las realizaciones 1-17, en el que el inhibidor de miR-122 y el inhibidor de ApoB-100 deben administrarse por separado en dos formas farmacéuticas diferentes.

19. El uso según una cualquiera de las realizaciones 1-18, en el que se proporcionan dosificaciones eficaces de los compuestos al paciente con el fin de obtener el desenlace clínico deseado.

20. Un método de tratamiento en el que se proporciona una dosificación eficaz de un medicamento según una cualquiera de las realizaciones 1-6 a un paciente que tiene infección o corre el riesgo de tener infección por VHC, con el fin de obtener un desenlace clínico deseado o prevenir una infección o reinfección.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de monómeros

Los elementos estructurales de monómeros de ANB y derivados de los mismos se prepararon siguiendo procedimientos publicados y referencias citadas en los mismos, véase:

el documento WO 03/095467 A1

D. S. Pedersen, C. Rosenbohm, T. Koch (2002) Preparation of LNA Phosphoramidites, Synthesis 6, 802-808.

M. D. Sørensen, L. Kværnø, T. Brild, A. E. Håkansson, B. Verbeure, G. Gaubert, P. Herdewijn, J. Wengel (2002) □-L-ribo-configured Locked Nucleic Acid (□-L-LNA): Synthesis and Properties, J. Am. Chem. Soc., 124, 2164-2176.

S. K. Singh, R. Kumar, J. Wengel (1998) Synthesis of Novel Bicyclo[2.2.1] Ribonucleosides: 2'-Amino- and 2'-Thio-LNA Monomeric Nucleosides, J. Org. Chem. 1998, 63, 6078-6079.

C. Rosenbohm, S. M. Christensen, M. D. Sørensen, D. S. Pedersen, L. E. Larsen, J. Wengel, T. Koch (2003) Synthesis of 2'-amino-LNA: a new strategy, Org. Biomol. Chem. 1, 655-663.

D. S. Pedersen, T. Koch (2003) Analogues of LNA (Locked Nucleic Acid). Synthesis of the 2'-Thio-LNA Thymine and 5-Methyl Cytosine Phosphoramidites, Synthesis 4, 578-582.

Ejemplo 2: Síntesis de oligonucleótidos

Se sintetizaron oligonucleótidos según el método descrito en el documento WO 07/031081.

Tabla 1: compuestos oligonucleotídicos de apoB-100 de la invención

En SEQ ID NO: 1-57, las regiones A y C están en negrita, las regiones B y cuando está presente la D, no están en negrita. Un superíndice ^m antes de la letra de base C se refiere a metil-citosina; un subíndice _s tras la letra de base se refiere a un enlace fosforotioato; un superíndice ^o tras la letra de base se refiere a oxi-ANB, particularmente beta-D-oxi-ANB.

Tabla 1

Sustancia de prueba	Secuencia	Tamaño	
SEQ ID NO: 1	5'-CAGC ATTG GTAT TCAG-3'	16	Motivo antisentido
SEQ.ID NO: 2	5'-CAGC ATTG GTAT TCA-3'	15	Motivo antisentido
SEQ ID NO: 3	5'-AGCA TTGG TATT CAG-3'	15	Motivo antisentido
SEQ ID NO: 4	5'-CAGC ATTG GTAT TC-3'	14	Motivo antisentido
SEQ ID NO: 5	5'-AGCA TTGG TATT CA-3'	14	Motivo antisentido
SEQ ID NO: 6	5'-GCAT TGGT ATTC AG-3'	14	Motivo antisentido
SEQ ID NO: 7	5'-CAGC ATTG GTAT T-3'	13	Motivo antisentido
SEQ ID NO: 8	5'-AGCA TTGG TATT C-3'	13	Motivo antisentido
SEQ ID NO: 9	5'-GCAT TGGT ATTC A-3'	13	Motivo antisentido
SEQ ID NO: 10	5'-CATT GGTA TTCA G-3'	13	Motivo antisentido
SEQ ID NO: 11	5'-CAGC ATTG GTAT-3'	12	Motivo antisentido

ES 2 463 665 T3

SEQ ID NO: 12	5'-AGCA TTGG TATT-3'	12	Motivo antisentido
SEQ ID NO: 13	5'-GCAT TGGT ATTC-3'	12	Motivo antisentido
SEQ ID NO: 14	5'-CATT GGTA TTCA-3'	12	Motivo antisentido
SEQ ID NO: 15	5'-ATTG GTAT TCAG-3'	12	Motivo antisentido
SEQ ID NO: 96	5'- A _s G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C _s A _s g-3'	16	Motivo n.º 1
SEQ ID NO: 17	5'-A _s G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C _s A-3'	14	Motivo n.º 5
SEQ ID NO: 18	5'-AG _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C _s A-3'	14	Motivo n.º 5
SEQ ID NO: 19	5'-A _s G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C _s A-3'	14	Motivo n.º 5
SEQ ID NO: 20	5'-A _s G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C _s A-3'	14	Motivo n.º 5
SEQ ID NO: 21	5'-A _s G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C _s A-3'	14	Motivo n.º 5
SEQ ID NO: 22	5'-A _s G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C _s A-3'	14	Motivo n.º 5
SEQ ID NO: 23	5'-A _s G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C _s A-3'	14	Motivo n.º 5
SEQ ID NO: 24	5'-AG _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} CA-3'	14	Motivo n.º 5
SEQ ID NO: 25	5'-AG _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} CA-3'	14	Motivo n.º 5
SEQ ID NO: 26	5'-G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C _s A-3'	13	Motivo n.º 9
SEQ ID NO: 27	5'-G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C _s A-3'	13	Motivo n.º 9
SEQ ID NO: 28	5'-G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C _s A-3'	13	Motivo n.º 9
SEQ ID NO: 29	5'-G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C _s A-3'	13	Motivo n.º 9
SEQ ID NO: 30	5'-G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C _s A-3'	13	Motivo n.º 9
SEQ ID NO: 31	5'-G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C _s A-3'	13	Motivo n.º 9
SEQ ID NO: 32	5'-G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} CA-3'	13	Motivo n.º 9
SEQ ID NO: 33	5'-G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} CA-3'	13	Motivo n.º 9
SEQ ID NO: 34	5'-G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C-3'	12	Motivo n.º 13
SEQ ID NO: 35	5'-G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C-3'	12	Motivo n.º 13
SEQ ID NO: 36	5'-G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C-3'	12	Motivo n.º 13
SEQ ID NO: 37	5'-G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C-3'	12	Motivo n.º 13
SEQ ID NO: 38	5'-G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C-3'	12	Motivo n.º 13
SEQ ID NO: 39	5'-G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C-3'	12	Motivo n.º 13
SEQ ID NO: 40	5'-G _s ^{Me} C _s a _s t _s t _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{Me} C-3'	12	Motivo n.º 13
SEQ ID NO: 41	5'- mCso Aso Gso cs as ts ts gs gs ts as ts Tso mCso Ao -3'	15	Motivo n.º 2
SEQ ID NO: 42	5'- Aso Gso cs as ts ts gs gs ts as ts Tso mCso a -3'	14	Motivo n.º 5
SEQ ID NO: 43	5'- Aso Gso cs as ts ts gs gs ts as Tso Tso mCso a -3'	14	Motivo n.º 5
SEQ ID NO: 44	5'- Aso Gso mCso as ts ts gs gs ts as Tso Tso mCso a -3'	14	Motivo n.º 5
SEQ ID NO: 45	5'- Gso cs as ts ts gs gs ts as ts Tso mCo -3'	12	Motivo n.º 13
SEQ ID NO: 46	5'- Gso mCso as ts ts gs gs ts as Tso Tso mCo -3'	12	Motivo n.º 13
SEQ ID NO: 47	5'- Gso cs as ts ts gs gs ts as To -3'	10	
SEQ ID NO: 48	5'- Gso mCso as ts ts gs gs ts Aso To -3'	10	
SEQ ID NO: 49	5'- Gso mCso as ts ts gs gs Tso Aso To -3'	10	
SEQ ID NO: 50	5'-AGcattggtatTCa-3'	14	
SEQ ID NO: 51	5'-AGcattggtatTTCa-3'	14	
SEQ ID NO: 52	5'-AGCattggtatTTCa-3'	14	

SEQ ID NO: 53	5'-AGCattggtatTCA-3'	14	
SEQ ID NO: 54	5'-GcattggtatTC-3'	12	
SEQ ID NO: 55	5'-GCattggtatTC-3'	12	
SEQ ID NO: 56	5'-GCattggtatTTC-3'	12	
SEQ ID NO: 57	5'-GcattggtatT-3'	10	

Ejemplo 3: Diseño de los oligonucleótidos anti-miR de ANB y temperaturas de fusión

microARN diana:

5 miR-122a: 5'-uggagugugacaaugguguuugu-3' SEQ ID NO: 58

miR-122a de 3' a 5': 3'-uguuugugguaacagugugaggu-5' SEQ ID NO: 59

10 Tabla 2: secuencias de oligonucleótidos anti-miR-122 de ANB y Tf:

Tabla 2				
SEQ ID		Secuencia:		Tf (°C)
SEQ ID 60	Diseño XxxX	5'-cCatTgtCacActCca-3'	Estructura principal de PS	75
SEQ ID 61	Diseño XxxX	5'-ccAttGtcAcaCtcCa-3'	Estructura principal de PS	69
SEQ ID 62	Gápmo	5'-CCAttgtcacacTCCa-3'	Estructura principal de PS	69
SEQ ID 63	15 meros	5'-CcAttGTcaCaCtCC-3'	Estructura principal de PS	78
SEQ ID 64	control de apareamiento erróneo	5'-CcAttCTgaCcCtAC-3'	Estructura principal de PS	32
SEQ ID 65	control de apareamiento erróneo	5'-ccAttGtc <u>T</u> ca <u>A</u> tcCa-3'	Estructura principal de PS	46
SEQ ID 66	13 meros	5'-AttGTcaCaCtCC-3'	Estructura principal de PS	

minúsculas: ADN, mayúsculas: ANB (todas las C de ANB estaban metiladas), subrayado: apareamiento erróneo

15 Se evaluaron las temperaturas de fusión frente a la secuencia de miR-122a maduro, usando un oligonucleótido de ARN de miR-122a sintético con enlaces fosforotioato.

20 Se diluyó el dúplex compuesto anti-miR de ANB/oligo de miR-122a hasta 3 µM en 500 µl de H₂O libre de ARNasa, que entonces se mezcló con 500 µl de 2x tampón de dimerización (conc. final de oligo/dúplex de 1,5 µM, 2x tampón Tf: NaCl 200 mM, EDTA 0,2 mM, NaP 20 mM, pH 7,0, tratado con DEP C para eliminar ARNasas). En primer lugar se calentó la mezcla hasta 95°C durante 3 minutos, después se dejó enfriar a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos.

25 Tras la incubación a TA, se midió la Tf en un espectrofotómetro 40 UV/VIS con un programador de temperatura de Peltier PTP6 usando el software PE Templab (Perkin Elmer). Se aumentó la temperatura desde 20°C hasta 95°C y después se redujo de nuevo hasta 20°C, registrando de manera continua la absorción a 260 nm. Se usaron la primera derivada y los máximos locales tanto de la fusión como de la hibridación para evaluar el punto de fusión/hibridación (Tf), ambos deben dar valores de Tf similares/iguales. Para la primera derivada se usaron 91

30 puntos para calcular la pendiente.
Sustituyendo el oligonucleótido anti-miR y la molécula de ARN complementaria, puede usarse el ensayo anterior para determinar la Tf de otros oligonucleótidos tales como los oligonucleótidos según la invención.

35 Sin embargo, en una realización puede obtenerse la Tf con una molécula de ADN complementaria (enlaces fosforotioato). Normalmente la Tf medida frente a una molécula complementaria de ADN es aproximadamente 10°C inferior a la Tf con un complemento de ARN equivalente. Por tanto, puede usarse la Tf medida usando el complemento de ADN en casos en los que el dúplex tiene una Tf muy alta.

40 Mediciones de la temperatura de fusión (Tf):

oligo frente a complemento de ARN de miR-122	Tf
SEQ ID NO: 61 + miR-122a, ARN	69°C

SEQ ID NO: 66 + miR-122a, ARN	74°C
SEQ ID NO: 63 + miR-122a, ARN	79°C
oligo frente a complemento de ADN	Tf
SEQ ID NO: 61 + 122R, ADN	57°C
SEQ ID NO: 63 + 122R, ADN	66°C

Se reconoce que para oligonucleótidos con Tf muy alta, los ensayos anteriores de Tf pueden ser insuficientes para determinar la Tf. En tal caso el uso de una molécula complementaria de ADN con fosforotioato puede reducir adicionalmente la Tf.

5 El uso de formamida es rutinario en el análisis de la hibridación de oligonucleótidos (véase Hutton 1977, NAR 4 (10) 3537-3555). En el ensayo anterior la inclusión de formamida al 15% reduce normalmente la Tf en aproximadamente 9°C, y la inclusión de formamida al 50% reduce normalmente la Tf en aproximadamente 30°C. Por tanto, usando estas razones, es posible determinar la Tf comparativa de un oligonucleótido frente a su molécula de ARN
10 complementaria (fosfodiéster), incluso cuando la Tf del dúplex es, por ejemplo, superior a 95°C (en ausencia de formamida).

Para oligonucleótidos con una Tf muy alta, un método alternativo de determinación de la Tf es realizar valoraciones y correrlas en un gel para ver compuestos monocatenarios frente a dúplex y mediante esas concentraciones y razones
15 determinar la Kd (la constante de disociación) que está relacionada con deltaG y también con Tf.

Ejemplo 4: Niveles de colesterol en plasma

Se mide el nivel de colesterol total en plasma usando un ensayo colorimétrico Cholesterol CP de ABX Pentra. Se
20 mide el colesterol tras la hidrólisis enzimática y la oxidación. Se añadieron 21,5 µl de agua a 1,5 µl de plasma. Se añaden 250 µl de reactivo y en el plazo de 5 min se mide el contenido en colesterol a una longitud de onda de 540 nM. Se realizaron mediciones en cada animal por duplicado. Se sometió a prueba la sensibilidad y la linealidad con compuesto de control diluido 2 veces (control N de ABX Pentra). Se determinó el nivel de colesterol relativo mediante resta del fondo y se presentó con respecto a los niveles de colesterol en plasma de ratones tratados con
25 solución salina.

Ejemplo 5: Mediciones de los niveles de ARNm

Puede someterse a ensayo la modulación antisentido de la expresión de Apo-B100 de una variedad de maneras
30 conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden cuantificarse los niveles de ARNm de Apo-B100 mediante, por ejemplo, análisis por transferencia de tipo Northern, reacción en cadena de la polimerasa competitiva (PCR) o PCR en tiempo real. Actualmente se prefiere la PCR cuantitativa en tiempo real. Puede realizarse un análisis de ARN con ARNm o ARN celular total. Los métodos de aislamiento de ARN y análisis de ARN tales como análisis por
35 transferencia de tipo Northern son rutinarios en la técnica y se enseñan, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons.

La PCR cuantitativa en tiempo real puede lograrse de manera conveniente usando el sistema de detección de PCR
en tiempo real iQ Multi-Color comercialmente disponible de BioRAD. La PCR cuantitativa en tiempo real es una
40 técnica bien conocida en la técnica y se enseña, por ejemplo, en Heid *et al.* Real time quantitative PCR, Genome Research (1996), 6: 986-994.

Ejemplo 6: Modelo in vitro: cultivo celular

Puede someterse a prueba el efecto de oligonucleótidos de ANB sobre la expresión (cantidad) de ácido nucleico
45 diana en cualquiera de una variedad de tipos de célula siempre que el ácido nucleico diana esté presente a niveles medibles. La diana puede expresarse de manera endógena o mediante transfección transitoria o estable de un ácido nucleico que codifica para dicho ácido nucleico.

El nivel de expresión de ácido nucleico diana puede determinarse de manera rutinaria usando, por ejemplo, análisis
50 por transferencia de tipo Northern (incluyendo transferencia tipo Northern para microARN), PCR cuantitativa (incluyendo qPCR para microARN), ensayos de protección frente a ribonucleasa. Los siguientes tipos de células se proporcionan para fines ilustrativos, pero pueden usarse de manera rutinaria otros tipos de células, siempre que la diana se exprese en el tipo de célula elegido.

55 Se cultivaron células en el medio apropiado tal como se describe a continuación y se mantuvieron a 37°C a una humedad del 95-98% y CO₂ al 5%. Se sometieron las células a pases 2-3 veces por semana.

15PC3: La línea celular de cáncer de próstata humano 15PC3 fue una amable donación del Dr. F. Baas,

Neurozintuigen Laboratory, AMC, Países Bajos y se cultivó en DMEM (Sigma) + suero bovino fetal (FBS) al 10% + Glutamax I + gentamicina.

PC3: La línea celular de cáncer de próstata humano PC3 se adquirió de ATCC y se cultivó en medio F12 de Coon con glutamina (Gibco) + FBS al 10% + gentamicina.

518A2: La línea celular de cáncer de melanoma humano 518A2 fue una amable donación del Dr. B. Jansen, Section of experimental Oncology, Molecular Pharmacology, Department of Clinical Pharmacology, University of Vienna y se cultivó en DMEM (Sigma) + suero bovino fetal (FBS) al 10% + Glutamax I + gentamicina.

HeLa: La línea celular de carcinoma de cuello uterino HeLa se cultivó en MEM (Sigma) que contenía suero bovino fetal al 10%, gentamicina a 37°C, humedad del 95% y CO₂ al 5%.

MPC-11: La línea celular de mieloma múltiple murino MPC-11 se adquirió de ATCC y se mantuvo en DMEM con Glutamax 4 mM + suero de caballo al 10%.

DU-145: La línea celular de cáncer de próstata humano DU-145 se adquirió de ATCC y se mantuvo en RPMI con Glutamax + FBS al 10%.

RCC-4 +/- VHL: LA línea celular de cáncer renal humano RCC4 transfectada de manera estable con plásmido que expresa VHL o plásmido vacío se adquirió de ECACC y se mantuvo según las instrucciones del fabricante.

786-0: La línea celular de carcinoma de células renales humano 786-0 se adquirió de ATCC y se mantuvo según las instrucciones del fabricante.

HUVEC: La línea de células endoteliales de la vena umbilical humana HUVEC se adquirió de Camcrex y se mantuvo en medio EGM-2.

K562: La línea celular de leucemia mielógena crónica humana K562 se adquirió de ECACC y se mantuvo en RPMI con Glutamax + FBS al 10%.

U87MG: La línea celular de glioblastoma humano U87MG se adquirió de ATCC y se mantuvo según las instrucciones del fabricante.

B16: La línea celular de melanoma murino B16 se adquirió de ATCC y se mantuvo según las instrucciones del fabricante.

LNCap: La línea celular de cáncer de próstata humano LNCap se adquirió de ATCC y se mantuvo en RPMI con Glutamax + FBS al 10%.

Huh-7: Hígado humano, de tipo epitelial, cultivado en MEM de Eagle con FBS al 10%, Glutamax I 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales, gentamicina 25 µg/ml.

L428: (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (DSM, Braunschweig, Alemania)): Linfoma de células B humano mantenido en RPMI 1640 complementado con FCS al 10%, L-glutamina y antibióticos.

L1236: (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (DSM, Braunschweig, Alemania)): Linfoma de células B humano mantenido en RPMI 1640 complementado con FCS al 10%, L-glutamina y antibióticos.

Ejemplo 7: Estabilidad de oligonucleótidos de ANB en plasma humano o de rata

Se sometió a prueba la estabilidad de oligonucleótido de ANB en plasma de ser humano o de ratas (también podía ser plasma de ratón, mono o perro). En 45 µl de plasma, se añaden 5 µl de oligonucleótido de ANB (a una concentración final de 20 µM). Se incuban los oligonucleótidos de ANB en plasma durante tiempos que oscilan entre 0 y 96 horas a 37°C (se somete a prueba el plasma para determinar la actividad nucleasa hasta 96 horas y no muestra ninguna diferencia en el patrón de escisión por nucleasa).

En el momento indicado se congelaron las muestras instantáneamente en nitrógeno líquido. Se diluyeron 2 µl (igual a 40 pmol) de oligonucleótido de ANB en plasma añadiendo 15 µl de agua y 3 µl de 6x tinte de carga (Invitrogen). Como marcador se usa un marcador de peso molecular de 10 pb (Invitrogen, US A 10821-015). A 1 µl de marcador de peso molecular, se le añaden 1 µl de 6x carga y 4 µl de agua. Se mezclan las muestras, se calientan hasta 65°C durante 10 min y se cargan en un gel previamente corrido (acrilamida al 16%, UREA 7 M, 1x TBE, previamente corrido a 50 vatios durante 1 h) y se corre a 50-60 vatios durante 2½ horas. Posteriormente, se tiñe el gel con 1x SyBR gold (Molecular Probes) en 1x TBE durante 15 min. Se visualizaron las bandas usando un sistema de detección y cuantificación de la radiactividad de BioRad.

*Ejemplo 8: Selección de oligonucleótidos que seleccionan como diana ARNm de ApoB-100 (dosis de 3*5 mg/kg)*

En este estudio se administraron 5 mg/kg/dosis en 3 días consecutivos (una dosis/día, i.v.) y se sacrificaron los animales 24 horas tras la última dosis. En el sacrificio, se extrajeron muestras de sangre de seno retro-orbital y de hígado. Se preparó suero a partir de la sangre para el análisis del colesterol. Se aisló ARN del hígado y se midió la expresión de ARNm de ApoB-100.

En la figura 1 se muestra el efecto de la administración de tres dosis a 5 mg/kg/dosis de oligos de diferente longitud sobre la expresión de ARNm de ApoB-100. SEQ ID NO: 16 (tabla 1) reguló por disminución el ARNm de ApoB-100 con aproximadamente el 25-30%, mientras que el 14-mero SEQ ID NO: 17 (tabla 1) y 12-mero SEQ ID NO: 34 (tabla 1) fueron mucho más potentes y regularon por disminución de manera igual de potente el ARNm de ApoB-100 con aproximadamente el 75% tras la administración 3 veces con 5 mg/kg.

Se midió el colesterol total en suero en el sacrificio, día 3 (figura 2). De manera similar a los resultados de la qPCR el mejor efecto, o el más potente, se obtuvo con el 12-mero SEQ ID NO: 34 seguido por el 14-mero SEQ ID NO: 17 (tabla 1). El 16-mero (SEQ ID NO: 16) (tabla 1) redujo el colesterol total con aproximadamente el 18%.

Ejemplo 9: Respuesta a la dosis y duración de la acción de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 34 en ratones hembra C57BL/6.

En este estudio se examinaron tres concentraciones diferentes (10, 15 y 25 mg/kg) de SEQ ID NO: 17 (tabla 1) y SEQ ID NO: 34 (tabla 1) para determinar la duración de la acción sobre la expresión de ARNm de ApoB-100 y el nivel de colesterol en suero. Se administraron SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 34 como una única dosis de 10, 15 ó 25 mg/kg a ratones hembra C57BL/6. Se sacrificaron los ratones en diferentes puntos de tiempo (1, 3, 5 y 8 días) tras la administración; se examinaron el hígado y el suero para determinar la expresión de ARNm de ApoB-100, la concentración de oligonucleótidos en el hígado y el colesterol y ALT, respectivamente.

Análisis de la regulación por disminución de ARNm diana

Se analizaron muestras de hígado tomadas en el sacrificio para determinar la expresión de ARNm de ApoB-100 mediante qPCR. Se normalizaron los datos frente a GAPDH y se presentan con respecto a los datos obtenidos administrando solución salina. Una dosis de 10, 15 ó 25 mg/kg de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 34 fue muy eficaz para regular por disminución el ARNm de ApoB-100 en el hígado (figura 3). Veinticuatro horas tras la administración, se obtuvo una regulación por disminución del 90-95% con SEQ ID NO: 34, mientras que la administración de SEQ ID NO: 17 dio como resultado niveles de ARNm de ApoB un 70-85% inferiores al grupo con control de solución salina.

Colesterol en suero

En el sacrificio se tomaron muestras de suero sanguíneo usado para medir el colesterol. Veinticuatro horas tras la administración de SEQ ID NO: 17 el colesterol total en suero se redujo en un 25-40%, y la administración de SEQ ID NO: 34 dio una reducción del 40-55% en el colesterol total. En el día 3, se redujo adicionalmente el nivel de colesterol total: SEQ ID NO: 17 dio una reducción del 70-90% de una manera dependiente de la dosis tras la administración de 10, 15 ó 25 mg/kg. SEQ ID NO: 34 redujo el colesterol total con un 90-95% con respecto al grupo con control de solución salina. En el día 5-8 el nivel de colesterol total aumentó en todos los grupos excepto en el grupo al que se le administró SEQ ID NO: 17 a 10 mg/kg (figura 4.).

Ejemplo 10: Respuesta a la dosis y duración de la acción de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 34 en ratones hembra C57BL/6

Se administró una única dosis de SEQ ID NO: 17 (tabla 1) y SEQ ID NO: 34 (tabla 1) a diferentes concentraciones a ratones C57BL/6J para hallar valores de DE₅₀ para el colesterol. También se incluyó la duración de la acción en este estudio, dado que anteriormente se había observado que el efecto máximo de una única dosis no siempre se lograba 24 horas tras la administración. En el ejemplo 6, se reguló por disminución completamente el ARNm de ApoB-100 tras la administración de 10, 15 ó 25 mg/kg de SEQ ID NO: 34 y 25 mg/kg de SEQ ID NO: 17. Por tanto, en este estudio se eligieron concentraciones inferiores (1, 2,5 y 5 mg/kg).

Análisis de la regulación por disminución del ARNm de ApoB-100

Se analizaron muestras de hígado tomadas en el sacrificio para determinar la expresión de ARNm de ApoB-100 mediante qPCR. Se normalizaron los datos frente a GAPDH y se presentan con respecto a los datos obtenidos administrando solución salina. Una dosis de 10, 15 ó 25 mg/kg de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 34 fue muy eficaz para regular por disminución el ARNm de ApoB-100 en el hígado (figura 5). Una única dosis de SEQ ID NO: 17 de 1, 2,5 ó 5 mg/kg dio como resultado una regulación por disminución dependiente de la dosis del ARNm de ApoB-100 con una duración de 5 días. Se obtuvieron resultados similares con SEQ ID NO: 34. En el día 8 ambos

oligonucleótidos dieron como resultado una expresión de ARNm de ApoB-100 que era similar tras la administración de 2,5 SEQ ID NO: 34 y 5 mg/kg de SEQ ID NO: 17, reducción del 75%. En el día 16 el nivel de ARNm había aumentado de nuevo en todos los grupos, excepto tras la administración de 5 mg/kg de SEQ ID NO: 34 con una regulación por disminución del ARNm de ApoB-100 del 75% similar a la de los días 5 y 8.

5

Colesterol en suero

Se tomaron muestras de suero sanguíneo en el sacrificio y se usaron para medir el colesterol. El nivel de colesterol total en suero reflejó la expresión de ARNm de ApoB-100; reducción dependiente de la dosis con el mejor efecto a los 5 días tras la administración de SEQ ID NO: 17 a 1 y 2,5 mg/kg y efecto similar en los días 3, 5 y 8 tras la administración de 5 mg/kg (reducción del 50%). También se obtuvo un efecto dependiente de la dosis tras la administración de SEQ ID NO: 34 con el mejor efecto en el día 3 tras la administración de 5 mg/kg (reducción del 70%) con el siguiente aumento en el nivel de colesterol (reducción del 60% en el día 8 y del 45% en el día 16). Sin embargo, los niveles de colesterol en los grupos a los que se les administró SEQ ID NO: 34 no siguieron las reducciones de ARNm en los grupos a los que se les administraron 2,5 y 5 mg/kg, por ejemplo la administración de 5 mg/kg dio una regulación por disminución de aproximadamente el 75% de ARNm de ApoB-100 en los días 5-16 mientras que el nivel de colesterol tras la administración de 2,5 mg/kg y 5 mg/kg aumentó desde el día 3 hasta el día 16 desde una reducción del 70% hasta una reducción del 45%.

*Ejemplo 11: Selección de oligonucleótidos que seleccionan como diana ARNm de ApoB-100 (dosis de 3 * 1 ó 5 mg/kg, i. v., tres días consecutivos)*

Se examinó el efecto sobre ARNm de ApoB-100 en diferentes días tras la administración de 1,0 ó 5,0 mg/kg (una dosis el día 0) de los tres oligonucleótidos de ANB antisentido, 12-mero SEQ ID NO: 34 (tabla 1), SEQ ID NO: 26 (tabla 1) 13-mero y 14-mero SEQ ID NO: 17 (tabla 1), todos los cuales seleccionan como diana ARNm de ApoB.

Análisis de la regulación por disminución de ARNm diana

Se analizaron muestras de hígado tomadas en el sacrificio para determinar la expresión de ARNm de ApoB-100 mediante qPCR. Se normalizaron los datos frente a GAPDH y se presentaron con respecto a los datos obtenidos mediante administración de solución salina. La administración de 3* 1 ó 5 mg/kg de SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 26 fue muy eficaz para regular por disminución el ARNm de ApoB-100 en el hígado (figura 7). La administración de 1 mg/kg de SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 26 reguló por disminución el ARNm de ApoB-100 con el 60% y 5 mg/kg dieron como resultado una regulación por disminución del 90% similar para ambos compuestos. SEQ ID NO: 17 administrado a 3* 1 mg/kg/dosis o 5 mg/kg/dosis reguló por disminución el ARNm diana con el 50% y el 70% respectivamente.

Colesterol en suero

En el sacrificio se tomaron muestras de sangre para suero y se usaron para medir el colesterol. De manera similar a los resultados para la expresión de ARNm, SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 26 dieron resultados similares: reducción del 60% tras la administración de 3*1 mg/kg y de aproximadamente el 85-90% tras 3*5 mg/kg/dosis. SEQ ID NO: 17 fue un poco menos potente y redujo el colesterol en suero con el 40% y el 70% tras la administración de 3* 1 ó 5 mg/kg/dosis, respectivamente.

45

Ejemplo 12: Modelo in vitro: Tratamiento con oligonucleótido antisentido anti-miR de ANB

Se transfectó la línea celular Huh-7 que expresa miR-122a con compuestos anti-miR de ANB a concentraciones de 1 y 100 nM según el protocolo de Lipofectamine 2000 (LF2000, Invitrogen) optimizado (de la siguiente manera).

50

Se cultivaron células Huh-7 en MEM de Eaglecon FBS al 10%, Glutamax I 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales, gentamicina 25 µg/ml. Se sembraron las células en placas de 6 pocillos (300000 células por pocillo), en un vol. total de 2,5 ml el día antes de la transfección. En el día de la transfección se preparó una disolución que contenía LF2000 diluido en Optimem (Invitrogen) (1,2 ml de Optimem + 3,75 µl de LF2000 por pocillo, al final 2,5 µg de LF2000/ml, vol. tot. final de 1,5 ml).

55

También se diluyeron oligonucleótidos de ANB (compuestos anti-miR de ANB) en Optimem. 285 µl de Optimem + 15 µl de oligonucleótido de ANB (disolución madre de oligonucleótido 10 µM para una concentración final de 100 nM y 0,1 µM para una concentración final de 1 nM). Se lavaron las células una vez en Optimem, después se añadieron los 1,2 ml de mezcla Optimem/LF2000 a cada pocillo. Se incubaron las células 7 min a temperatura ambiente en la mezcla de LF2000 tras lo cual se añadieron los 300 µl de disolución de Optimem y oligonucleótidos.

60

Se incubaron adicionalmente las células durante cuatro horas con oligonucleótido y Lipofectamine 2000 (en incubador celular regular a 37°C, CO₂ al 5%). Tras estas cuatro horas se retiró el medio/mezcla y se añadió medio completo regular. Se dejaron crecer las células durante otras 20 horas. Se recogieron las células en Trizol

65

(Invitrogen) 24 horas tras la transfección. Se extrajo el ARN según un protocolo de Trizol convencional según las instrucciones del fabricante (Invitrogen), especialmente para conservar el microARN en la extracción de ARN total.

Ejemplo 13: Modelo in vitro e in vivo: Análisis de la inhibición mediante oligonucleótidos de la expresión de miR mediante PCR cuantitativa específica para microARN

Se evaluaron los niveles de miR-122a en las muestras de ARN en un instrumento de PCR en tiempo real ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, EE.UU.) usando un kit de qRT-PCR específico para miR-122a, miRvana (Ambion, EE.UU.) y cebadores de miR-122a (Ambion, EE.UU.). Se realizó el procedimiento según el protocolo del fabricante.

Resultados:

El nuevo diseño de oligonucleótido anti-miR de ANB específico para miR-122a (es decir, SEQ ID NO: 63 (también denominado SEQ ID NO: 63)), fue más eficaz en inhibir miR-122a a 1 nM en comparación con modelos de diseños anteriores, incluyendo motivos "uno sí y dos no" y "gápmo" (SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62) a 100 nM. No se encontró que este control de apareamiento erróneo inhibiera miR-122a (SEQ ID NO: 64). En la figura 1 se muestran los resultados.

Ejemplo 14: Evaluación de especificidad del silenciamiento con compuesto antago-mir de ANB usando obtención de perfiles de expresión con micromatriz de miARN.

A) Marcaje de ARN para la obtención de perfiles de expresión con micromatriz de miARN

Se extrajo ARN total usando reactivo Trizol (Invitrogen) y se marcó en el extremo 3' usando ARN ligasa de T4 y ligador de ARN marcado con Cy3 o Cy5 (5'-PO4-rUrUrU-Cy3/dT-3' o 5'-PO4-rUrUrU-Cy5/dT-3'). Las reacciones de marcaje contenían 2-5 µg de ARN total, ligador de ARN 15 µM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,8), MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM, polietilenglicol al 16% y 5 unidades de ARN ligasa de T4 (Ambion, EE.UU.) y se incubó a 30°C durante 2 horas seguido por inactivación por calor de la ARN ligasa T4 a 80°C durante 5 minutos.

B) Hibridación con micromatriz y lavados tras la hibridación

Se adquirieron de Exiqon (Exiqon, Dinamarca) sondas de captura de oligonucleótidos modificados con ANB que comprendían sondas para todos los miARN indicados de ratón (*Mus musculus*) y ser humano (*Homo sapiens*) en la base de datos de miRBase MicroRNA, versión 7.1, incluyendo un conjunto de sondas de control positivo y negativo, y se usaron para imprimir micromatrices para la obtención de perfiles de miARN. Las sondas de captura contienen un ligador modificado con C6-amino 5'-terminal y se diseñaron para tener una T_f de 72°C frente a miARN diana complementarios mediante ajuste del contenido de ANB y la longitud de las sondas de captura. Se diluyeron las sondas de captura hasta una concentración final de 10 µM en tampón fosfato de sodio 150 mM (pH 8,5) y se depositaron en puntos por cuadruplicado sobre portaobjetos Codelink (Amersham Biosciences) usando el dispositivo para matrices MicroGrid II de BioRobotics a una humedad del 45% y a temperatura ambiente. Se procesaron posteriormente los portaobjetos con puntos depositados según recomendaciones del fabricante.

Se hibridó ARN marcado con las micromatrices de ANB durante la noche a 65°C en una mezcla de hibridación que contenía 4x SSC, SDS al 0,1%, ADN de esperma de arenque 1 µg/µl y formamida al 38%. Se lavaron los portaobjetos hibridados tres veces en 2x SSC, SDS al 0,025% a 65°C, seguido por tres veces en 0,08x SSC y finalmente tres veces en 0,4x SSC a temperatura ambiente.

C) Escaneado de matrices, análisis de imágenes y procesamiento de datos

Se escanearon las micromatrices usando el escáner ArrayWO rx (Applied Precision, EE.UU.) según las recomendaciones del fabricante. Se importaron las imágenes escaneadas al software TIGR Spotfinder versión 3.1 (Saeed *et al.*, 2003) para la extracción de intensidades de puntos medias y medianas de intensidades de fondo local, excluyendo puntos con intensidades inferiores a la mediana del fondo local + 4 x desviaciones estándar. Se normalizaron las intensidades correlacionadas con el fondo usando el paquete de normalización de la estabilización de la varianza, versión 1.8.0 (Huber *et al.*, 2002) para R (www.r-project.org). Se calculó el promedio de las intensidades de puntos repetidos usando Microsoft Excel. Se excluyeron de un análisis de datos adicional sondas que presentaban un coeficiente de varianza > 100%.

Ejemplo 15: Detección de microARN mediante hibridación in situ. Detección de microARN en secciones de tejido incrustadas en parafina, fijadas con formalina, mediante hibridación in situ.

A) Preparación de las secciones incrustadas en parafina, fijadas con formalina, para la hibridación *in situ*

Se recuperan muestras incrustadas en parafina archivadas y se cortan en secciones de 5 a 10 mm y se montan en portaobjetos cargados positivamente usando la técnica de flotación. Se almacenan los portaobjetos a 4°C hasta que se realizan los experimentos *in situ*.

B) Hibridación *in situ*

Se desparafinizan en xileno secciones sobre portaobjetos y después se rehidratan mediante una serie de diluciones en etanol (desde el 100% hasta el 25%). Se sumergen los portaobjetos en agua tratada con DEP C y se someten a tratamiento con HCl y glicina al 0,2%, vuelven a fijarse en paraformaldehído al 4% y se tratan con anhídrido acético/trietanolamina; se aclaran los portaobjetos en varios lavados de 1X PBS entre los tratamientos. Se hibridan previamente los portaobjetos en disolución de hibridación (formamida al 50%, 5X SSC, ARNt de levadura 500 mg/ml, 1X Denhardt) a 50°C durante 30 min. Después se añaden 3 pmol de una sonda de ANB marcada con FITC (Exiqon, Dinamarca) complementaria a cada miARN seleccionado a la disolución de hibridación y se hibridan durante una hora a una temperatura 20-25°C por debajo de la T_f predicha de la sonda (normalmente entre 45-55°C dependiendo de la secuencia de miARN). Tras lavados en 0,1X y 0,5X SCC a 65°C, se llevó a cabo una reacción de amplificación de la señal de tiramida usando el kit de fluoresceína Genpoint (FITC) kit (DakoCytomation, Dinamarca) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Finalmente, se montan los portaobjetos con disolución Prolong Gold. Se deja que se desarrolle la reacción de fluorescencia durante 16-24 h antes de documentar la expresión del miARN seleccionado usando un microscopio de epifluorescencia.

Detección de microARN mediante hibridación *in situ* de montaje completo de embriones de pez cebra, *Xenopus* y ratón.

Todas las etapas de lavado y de incubación se realizan en tubos Eppendorf de 2 ml. Se fijan embriones durante la noche a 4°C en paraformaldehído al 4% en PBS y posteriormente se transfieren a través de una serie graduada (MeOH al 25% en PBST (PBS que contiene Tween-20 al 0,1%), MeOH al 50% en PBST, MeOH al 75% en PBST) a metanol al 100% y se almacenan a -20°C durante hasta varios meses. En el primer día de la hibridación *in situ* se rehidratan los embriones mediante incubaciones sucesivas durante 5 min en MeOH al 75% en PBST, MeOH al 50% en PBST, MeOH al 25% en PBST y PBST al 100% (4 x 5 min).

Se tratan los embriones de pez, ratón y *Xenopus* con proteinasa K (10 µg/ml en PBST) durante 45 min a 37°C, vuelven a fijarse durante 20 min en paraformaldehído al 4% en PBS y se lavan 3 x 5 min con PBST. Tras un corto lavado en agua, se bloquea la actividad fosfatasa alcalina endógena mediante incubación de los embriones en trietanolamina 0,1 M y anhídrido acético al 2,5% durante 10 min, seguido por un corto lavado en agua y 5 lavados de 5 min en PBST. A continuación se transfieren los embriones a tampón de hibridación (formamida al 50%, 5x SSC, Tween al 0,1%, ácido cítrico 9,2 mM, heparina 50 µg/ml, ARN de levadura 500 µg/ml) durante 2-3 horas a la temperatura de hibridación. Se realiza la hibridación en tampón de hibridación previamente calentado, reciente, que contiene 10 nM de sonda de ANB marcada con 3'-DIG (Roche Diagnostics) complementaria a cada miARN seleccionado. Se realizan lavados tras la hibridación a la temperatura de hibridación mediante incubaciones sucesivas durante 15 min en HM- (tampón de hibridación sin heparina ni ARN de levadura), HM- al 75%/2x SSCT al 25% (SSC que contiene Tween-20 al 0,1%), HM- al 50% /2x SSCT al 50%, HM- al 25%/2x SSCT al 75%, 2x SSCT al 100% y 2 x 30 min en 0,2x SSCT.

Posteriormente, se transfieren los embriones a PBST mediante incubaciones sucesivas durante 10 min en 0,2x SSCT al 75%/PBST al 25%, 0,2x SSCT al 50%/PBST al 50%, 0,2x SSCT al 25%/PBST al 75% y PBST al 100%. Tras bloquear durante 1 hora en tampón de bloqueo (suero de oveja al 2%/BSA 2 mg/ml en PBST), se incuban los embriones durante la noche a 4°C en tampón de bloqueo que contiene fragmentos FAB anti-DIG-AP (Roche, 1/2000). Al día siguiente, se lavan los embriones de pez cebra 6 x 15 min en PBST, se lavan los embriones de ratón y *X. tropicalis* 6 x 1 hora en TBST que contiene levamisol 2 mM y después durante 2 días a 4°C con renovación regular del tampón de lavado.

Tras los lavados tras el anticuerpo, se lavan los embriones 3 x 5 min en tampón de tinción (tris HCl 100 mM pH 9,5, MgCl₂ 50 mM, NaCl 100 mM, tween 20 al 0,1%). Se realizó la tinción en tampón complementado con NBT 4,5 µl/ml (Roche, disolución madre 50 mg/ml) y BCIP 3,5 µl/ml (Roche, disolución madre 50 mg/ml). Se detiene la reacción con EDTA 1 mM en PBST y se almacenan los embriones a 4°C. Se montan los embriones en solución de Murray (2:1 benzoato de bencilo:alcohol bencílico) mediante una serie de metanol creciente (MeOH al 25% en PBST, MeOH al 50% en PBST, MeOH al 75% en PBST, MeOH al 100%) antes de la obtención de imágenes.

Ejemplo 16: Modelo in vitro: Aislamiento y análisis de la expresión de ARNm (aislamiento de ARN total y síntesis de ADNc para el análisis de ARNm)

Se aisló ARN total o bien usando un kit RNeasy mini (Qiagen) o bien usando el reactivo Trizol (Invitrogen). Para el aislamiento de ARN total usando el kit RNeasy mini (Qiagen), se lavaron las células con PBS, y se añadió tampón de lisis celular (RTL, Qiagen) complementado con mercaptoetanol al 1% directamente a los pocillos. Tras unos pocos minutos, se procesaron las muestras según las instrucciones del fabricante.

Para el análisis *in vivo* de la expresión de ARNm, en primer lugar se homogeneizaron muestras tisulares usando un homogeneizador Retsch 300MM y se aisló ARN total usando el reactivo Trizol o el kit RNeasy mini tal como se describe por el fabricante.

- Se realizó la síntesis de primera cadena (ADNc a partir de ARNm) usando o bien el kit de transcriptasa inversa OmniScript o bien la transcriptasa inversa M-MLV (esencialmente descrita por el fabricante (Ambion)) según las instrucciones del fabricante (Qiagen). Cuando se usó la transcriptasa inversa OmniScript, se ajustaron 0,5 µg de ARN total de cada muestra hasta 12 µl y se mezclaron con 0,2 µl de poli (dT)₁₂₋₁₈ (0,5 µg/ml) (Life Technologies), 2 µl de mezcla de dNTP (5 mM cada uno), 2 µl de 10x tampón RT, 0,5 µl de inhibidor de ARNasa RNAGuard™ (33 unidades/ml, Amersham) y 1 µl de transcriptasa inversa OmniScript seguido por incubación a 37°C durante 60 min e inactivación por calor a 93°C durante 5 min.
- 10 Cuando se realizó la síntesis de primera cadena usando decámeros al azar y transcriptasa inversa M-MLV (esencialmente tal como se describe por el fabricante (Ambion)) se ajustaron 0,25 µg de ARN total de cada muestra hasta 10,8 µl en H₂O. Se añadieron 2 µl de decámeros y 2 µl de mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno). Se calentaron las muestras hasta 70°C durante 3 min y se enfriaron inmediatamente en agua con hielo y se añadieron 3,25 µl de una mezcla que contenía (2 µl de 10x tampón RT; 1 µl de transcriptasa inversa M-MLV; 0,25 µl de inhibidor de ARNasa). Se sintetiza ADNc a 42°C durante 60 min seguido por una etapa de inactivación por calor a 95°C durante 10 min y finalmente se enfría hasta 4°C. El ADNc puede usarse además para la cuantificación de ARNm mediante, por ejemplo, PCR cuantitativa en tiempo real.
- 20 Puede someterse a ensayo la expresión de ARNm de una variedad de maneras conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden cuantificarse los niveles de ARNm, por ejemplo, mediante análisis por transferencia de tipo Northern, reacción en cadena de la polimerasa competitiva (PCR), ensayo de protección frente a ribonucleasa (RPA) o PCR en tiempo real. Actualmente se prefiere la PCR cuantitativa en tiempo real. Pueden realizarse análisis de ARN con ARNm o ARN celular total
- 25 Los métodos de aislamiento de ARN y análisis de ARN tales como análisis por transferencia de tipo Northern son rutinarios en la técnica y se enseñan, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons.

La PCR cuantitativa en tiempo real puede lograrse convenientemente usando el sistema de detección de PCR en tiempo real iQ Multi-Color comercialmente disponible de BioRAD. La PCR cuantitativa en tiempo real es una técnica bien conocida en la técnica y se enseña, por ejemplo, en Heid *et al.* Real time quantitative PCR, Genome Research (1996), 6: 986-994.

Ejemplo 17: Captación de oligonucleótido de ANB y eficacia in vivo.

- 35 Estudio *in vivo*: Se trataron seis grupos de animales (5 ratones por grupo) de la siguiente manera. A los animales del grupo 1 se les inyectaron 0,2 ml de solución salina i.v. en 3 días sucesivos, el grupo 2 recibió 2,5 mg/kg de SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 61, el grupo 3 recibió 6,25 mg/kg, el grupo 4 recibió 12,5 mg/kg y el grupo 5 recibió 25 mg/kg, mientras que el grupo 6 recibió 25 mg/kg de SEQ ID NO: 65 (oligonucleótido anti-miR™ de ANB con apareamiento erróneo), todos de la misma manera. Todas las dosis se calcularon a partir de los pesos corporales de cada animal en el día 0.

45 Antes de la administración (día 0) y 24 horas tras la última dosis (día 3), se extrajo sangre retro-orbital en tubos que contenían EDTA y se recogió la fracción de plasma y se almacenó congelada a -80°C para el análisis del colesterol. En el sacrificio, se disecaron los hígados y se cortó una parte en cubos de 5 mm y se sumergió en 5 volúmenes de RNAlater helado. Se congeló inmediatamente una segunda parte en nitrógeno líquido y se almacenó para la obtención de criosecciones.

50 Se extrajo ARN total a partir de muestras de hígado tal como se describió anteriormente y se analizó para determinar los niveles de miR-122a mediante qPCR específica para microARN. La figura 5 demuestra una clara respuesta a la dosis obtenida con SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 61 con una Cl₅₀ a aproximadamente 3-5 mg/kg, mientras que no se detectó inhibición de miR-122a usando la SEQ ID NO: 65 antago-mir de ANB con apareamiento erróneo para miR-122a.

Ejemplo 18: Respuesta a la dosis de compuesto anti-miR-122a de ANB in vivo en ratones hembra C57/BL/J.

- 55 Estudio *in vivo*: Se trataron diez grupos de animales (C57/BL6 hembra; 3 ratones por grupo) de la siguiente manera. A los animales del grupo 1 se les inyectaron 0,2 ml de solución salina i.p. en el día 0, día 2 y día 4. A los grupos 2-10 se les administraron i.p. tres conc. diferentes (25 mg/kg, 5 mg/kg y 1 mg/kg) de compuesto anti-miR-122a de ANB/SEQ ID NO: 61 (grupo 2-4), compuesto antimir-122a de ANB/SEQ ID NO: 66 (grupo 5-7) o compuesto antimir-122a de ANB/SEQ ID NO: 63 (grupo 8-10); las secuencias de compuestos antimir-122a de ANB se facilitan en la tabla 1. Los tres oligonucleótidos anti-miR-122a de ANB seleccionan como diana el miR-122a específico del hígado. Las dosis se calcularon a partir de los pesos corporales de cada animal en el día 0.

65 Se sacrificaron los animales 48 horas tras la última dosis (día 6), se extrajo sangre retro-orbital en tubos que contenían EDTA y se recogió la fracción de plasma y se almacenó congelada a -80°C para el análisis del colesterol.

En el sacrificio se disecaron los hígados y se cortó una parte en cubos de 5 mm y se sumergió en 5 volúmenes de RNAlater helado. Se congeló inmediatamente una segunda parte en nitrógeno líquido y se almacenó para la obtención de criosecciones.

- 5 Se extrajo ARN total a partir de muestras de hígado usando reactivo Trizol según las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, EE.UU.) y se analizó para determinar los niveles de miR-122a mediante qPCR específica para microARN según las recomendaciones del fabricante (Ambion, EE.UU.). La figura 2 demuestra una clara respuesta a la dosis obtenida con las tres moléculas anti-miR-122a de ANB (SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 63). Tanto SEQ ID NO: 66 como SEQ ID NO: 63 muestran una eficacia significativamente mejorada *in vivo* en el silenciamiento de miR-122a (tal como se observa a partir de los niveles de miR-122a reducidos) en comparación con SEQ ID NO: 61, siendo SEQ ID NO: 63 la más potente (CI₅₀ de aproximadamente 1 mg/kg).

Se repitió el ejemplo anterior usando SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 63 usando 5 ratones por grupo y en la figura 2b se muestran los datos combinados (total de ocho ratones por grupo).

Ejemplo 19: Transferencia de tipo Northern.

La transferencia de tipo Northern específica para microARN muestra un bloqueo de miR-122 potenciado mediante SEQ ID NO: 63 en comparación con SEQ ID NO: 61 en hígados de ratones tratados con compuesto anti-miR de ANB.

Oligos usados en este ejemplo:

SEQ ID NO:		
63	5'-CcAttGTcaCaCtCC-3'	Nuevo diseño
61	5'-CcAttGtcAcaCtcCa-3'	Diseño antiguo

- 25 Se decidió evaluar el efecto de SEQ ID NO: 63 sobre los niveles de miARN de miR-122 en los hígados de ratones tratados con SEQ ID NO: 63. Se administraron los compuestos anti-miR de ANB, SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 61, a ratones mediante tres inyecciones i.p. cada dos días a lo largo de un periodo de seis días a las dosis indicadas seguido por el sacrificio de los animales 48 horas tras la última dosis. Se extrajo ARN total a partir de los hígados. Se evaluaron los niveles de miR-122 mediante transferencia de tipo Northern específica para microARN (figura 6).

- 30 El tratamiento de ratones normales con SEQ ID NO: 63 dio como resultado una reducción de miR-122 dependiente de la dosis, drásticamente mejorada. Se realizó una transferencia de tipo Northern específica para microARN que comparó SEQ ID NO: 63 con SEQ ID NO: 61 (figura 6). SEQ ID NO: 63 bloqueó completamente miR-122 tanto a 5 como a 25 mg/kg tal como se observa por la ausencia de miR-122 monocatenario maduro y sólo la presencia de la banda de dúplex entre el compuesto anti-miR de ANB y miR-122. Comparando la banda de dúplex frente a la madura en la transferencia de tipo Northern, SEQ ID NO: 63 parece ser igual de eficaz a 1 mg/kg que SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 61 a 25 mg/kg.

Ejemplo 20: Evaluación de los niveles de colesterol en plasma en ratones tratados con compuesto anti-miR122 de ANB

- Se midió el nivel de colesterol total en plasma usando un ensayo colorimétrico Cholesterol CP de ABX Pentra. Se midió el colesterol tras la hidrólisis enzimática y la oxidación (2,3). Se añadieron 21,5 µl de agua a 1,5 µl de plasma. Se añadieron 250 µl de reactivo y en el plazo de 5 min se midió el contenido en colesterol a una longitud de onda de 540 nM. Se realizaron mediciones con cada animal por duplicado. Se sometió a prueba la sensibilidad y la linealidad con compuesto de control diluido 2 veces (control N de ABX Pentra). Se determinó el nivel de colesterol mediante resta del fondo y se presentó con respecto a los niveles de colesterol en plasma de ratones tratados con solución salina.

- 50 La figura 3 demuestra un nivel notablemente reducido de colesterol en plasma en los ratones que recibieron SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 63 en comparación con el control de solución salina en el día 6.

Ejemplo 21: Evaluación de los niveles de ARNm diana de miR-122a en ratones tratados con compuesto anti-miR-122a de ANB

- 55 Se sacrificaron los animales tratados con control de solución salina y diferentes compuestos anti-miR-122a de ANB 48 horas tras la última dosis (día 6), y se extrajo ARN total a partir de muestras de hígado usando reactivo Trizol según las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, EE.UU.). Se evaluaron los niveles de ARNm mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real para dos genes diana de miR-122a, Bckdk (cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa cinasa, ENSMUS G00000030802) y aldolasa A (aldoA, ENSMUS G00000030695), respectivamente, así como para GAPDH como control, usando ensayos Taqman según las instrucciones del

fabricante (Applied biosystems, EE.UU.). Las figuras 4a y 4b demuestran una clara regulación por incremento dependiente de la dosis de los dos genes diana de miR-122a, Bckdk y AldoA, respectivamente, como respuesta al tratamiento con las tres moléculas anti-miR-122a de ANB (SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 63). En cambio, los ensayos de qPCR para el control de GAPDH no revelaron ninguna diferencia en los niveles de ARNm de GAPD en los ratones tratados con compuesto anti-miR-122a de ANB en comparación con los animales con control de solución salina (figura 4c). Los niveles de ARNm de Bckdk y AldoA fueron significativamente superiores en los ratones tratados con SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 63 en comparación con los ratones tratados con SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 61 (figura 4a y 4b), demostrando así su eficacia *in vivo* mejorada.

Ejemplo 22: Duración de la acción in vivo de oligonucleótido de ANB.

Estudio *in vivo*: Se trataron dos grupos de animales (21 ratones por grupo) de la siguiente manera. A los animales del grupo 1 se les inyectaron 0,2 ml de solución salina i.v. en 3 días sucesivos, el grupo 2 recibió 25 mg/kg de SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 61 de la misma manera. Todas las dosis se calcularon a partir de los pesos corporales de cada animal en el día 0.

Tras la última dosis (día 3), se sacrificaron 7 animales de cada grupo en el día 9, día 16 y día 23, respectivamente. Antes de esto, en cada día, se extrajo sangre retro-orbital en tubos que contenían EDTA y se recogió la fracción de plasma y se almacenó congelada a -80°C para el análisis del colesterol de cada día. En el sacrificio se disecaron los hígados y se cortó una parte en cubos de 5 mm y se sumergió en 5 volúmenes de RNAlater helado. Se congeló inmediatamente una segunda parte en nitrógeno líquido y se almacenó para la obtención de criosecciones.

Se extrajo ARN total a partir de muestras de hígado tal como se describió anteriormente y se analizó para determinar los niveles de miR-122a mediante qPCR específica para microARN. La figura 7 (el sacrificio en el día 9, 16 ó 23 corresponde al sacrificio 1, 2 ó 3 semanas tras la última dosis) demuestra una inhibición del doble en los ratones que recibieron SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 61 en comparación con el control de solución salina, y esta inhibición todavía podía detectarse en el día 16, mientras que en el día 23 los niveles de mi122a se aproximaban a los del grupo de solución salina.

Ejemplo 22: Duración de la acción in vivo de oligonucleótido de ANB.

Estudio *in vivo*: Se trataron dos grupos de animales (21 ratones por grupo) de la siguiente manera. A los animales del grupo 1 se les inyectaron 0,2 ml de solución salina i.v. en 3 días sucesivos, el grupo 2 recibió 25 mg/kg de SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 61 de la misma manera. Todas las dosis se calcularon a partir de los pesos corporales de cada animal en el día 0.

Tras la última dosis (día 3), se sacrificaron 7 animales de cada grupo en el día 9, día 16 y día 23, respectivamente. Antes de esto, en cada día, se extrajo sangre retro-orbital en tubos que contenían EDTA y se recogió la fracción de plasma y se almacenó congelada a -80°C para el análisis del colesterol de cada día. En el sacrificio se disecaron los hígados y se cortó una parte en cubos de 5 mm y se sumergió en 5 volúmenes de RNAlater helado. Se congeló inmediatamente una segunda parte en nitrógeno líquido y se almacenó para la obtención de criosecciones.

Se extrajo ARN total a partir de muestras de hígado tal como se describió anteriormente y se analizó para determinar los niveles de miR-122a mediante qPCR específica para microARN. La figura 8 demuestra una inhibición del doble en los ratones que recibieron SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 61 en comparación con el control de solución salina y esta inhibición todavía pudo detectarse en el día 16, mientras que en el día 23 los niveles de miR-122a se aproximaron a los del grupo de solución salina.

En cuanto a los ejemplos 17-22, se aplican los siguientes procedimientos:

A ratones NMRI se les administró por vía intravenosa SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 61 usando dosis diarias que oscilaron entre 2,5 y 25 mg/kg durante tres días consecutivos. Se sacrificaron los animales 24 horas, 1, 2 ó 3 semanas tras la última dosis. Se recogieron los hígados, se dividieron en fragmentos y se sumergieron en RNAlater (Ambion) o se congelaron inmediatamente. Se extrajo el ARN con reactivo Trizol según las instrucciones del fabricante (Invitrogen) a partir del tejido RNAlater, excepto porque se lavó el ARN precipitado en etanol al 80% y no se agitó con vórtex. Se usó el ARN para qPCR TaqMan de ARNm según el fabricante (Applied biosystems) o transferencia de tipo Northern (véase a continuación). Se obtuvieron criosecciones de los fragmentos congelados inmediatamente para hibridaciones *in situ*.

Además, en cuanto a las figuras 9-14, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 61 se denomina compuesto anti-miR de ANB y SEQ ID NO: 65 (el control de apareamiento erróneo) se denomina "mm".

Ejemplo 23: Inducción de ARNm diana de miR-122a dependiente de la dosis mediante inhibición por SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 61 de miR-122a

Se trataron ratones con diferentes dosis de SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 61 durante tres días consecutivos, tal como

se describió anteriormente y se sacrificaron 24 horas tras la última dosis. Se sometió a qPCR ARN total extraído a partir del hígado. Se investigaron genes con sitio diana de miR-122 predicho y que se observó que se regulaban por incremento mediante análisis con micromatriz para determinar la inducción dependiente de la dosis aumentando las dosis de SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 61 usando qPCR. Se sometió a qPCR para los genes indicados ARN de hígado total de 2 a 3 ratones por grupo sacrificados 24 horas tras la última dosis. En la figura 9 se muestran los niveles de ARNm con respecto al grupo de solución salina, n=2-3 (2,5 - 12,5 mg/kg/día: n=2, sin D.E.). También se muestra el control de apareamiento erróneo (mm, SEQ ID NO: 65).

Genes sometidos a ensayo: Nrdg3 Aldo A, Bckdk, CD320 con sitio diana de miR-122 predicho. Aldo B y GAPDH no tienen un sitio diana de miR-122a predicho.

Se observó una clara inducción dependiente de la dosis de los genes diana de miR-122a tras el tratamiento con diferentes dosis de SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 61.

Ejemplo 24: Inducción transitoria de ARNm diana de miR-122a tras el tratamiento con SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 61

Se trataron ratones hembra NMRI con 25 mg/kg/día de SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 61 junto con control de solución salina durante tres días consecutivos y se sacrificaron 1, 2 ó 3 semanas tras la última dosis, respectivamente. Se extrajo ARN a partir de hígados y se investigaron mediante qPCR los niveles de ARNm de ARNm diana de miR-122a predichos, seleccionados mediante datos de micromatriz. Se analizaron tres animales de cada grupo.

Genes sometidos a ensayo: Nrdg3 Aldo A, Bckdk, CD320 con sitio diana de miR-122 predicho. GAPDH no tiene un sitio diana de miR-122a predicho.

Se observó una inducción transitoria seguida por una restauración de los niveles de expresión normales en analogía con la restauración de niveles de miR-122a normales (figura 10).

Los niveles de ARNm se normalizan con respecto a los niveles de GAPDH individuales y con respecto a la media del grupo tratado con solución salina en cada punto de tiempo individual. También se incluyen los valores de los animales sacrificados 24 horas tras la última dosis. Se muestran la media y la desviación estándar, n=3 (24 h, n=3).

Ejemplo 25: Inducción de Vldlr en hígado mediante tratamiento con SEQ ID NO: 61

Se investigaron las mismas muestras de ARN de hígado que en el ejemplo anterior para determinar la inducción de Vldlr.

Se observó una regulación por incremento transitoria tras el tratamiento con SEQ ID NO: 61, como con los otros ARNm diana de miR-122a predichos (figura 11).

Ejemplo 26: Estabilidad del dúplex miR-122a/SEQ ID NO: 61 en plasma de ratón

Se sometió a prueba la estabilidad de SEQ ID NO: 61 y del dúplex SEQ ID NO: 61/miR-122a en plasma de ratón a 37°C a lo largo de 96 horas. En la figura 12 se muestra una PAGE teñida con SYBR-Gold.

SEQ ID NO: 61 era completamente estable a lo largo de 96 horas. El dúplex SEQ ID NO: 61/miR-122a se truncó inmediatamente (degradación de la región de miR-122a monocatenario no cubierta por SEQ ID NO: 61) pero después de eso fue casi completamente estable a lo largo de 96 horas.

El hecho de que un dúplex SEQ ID NO: 61/miR-122 previamente formado mostró estabilidad en suero a lo largo de 96 horas junto con la alta estabilidad térmica del dúplex de la molécula de SEQ ID NO: 61 respaldó la noción de que la inhibición de miR-122a mediante SEQ ID NO: 61 se debía a la formación de dúplex estable entre las dos moléculas, lo que también se ha notificado en cultivo celular (Naguibneva *et al.* 2006).

Ejemplo 27: El secuestro de miR-122a maduro mediante SEQ ID NO: 61 conduce a la formación de dúplex

También se sometió el ARN de hígado a transferencia de tipo Northern de microARN. En la figura 13 se muestra una membrana analizada con sonda con una sonda específica para miR-122a (panel superior) y que se volvió a analizar con sonda con una sonda específica para Let-7 (panel inferior). Con la sonda para miR-122, pudieron detectarse dos bandas, una correspondiente a miR-122 maduro y una correspondiente a un dúplex entre SEQ ID NO: 61 y miR-122.

Para confirmar el silenciamiento de miR-122, se sometieron las muestras de ARN de hígado a un análisis por transferencia de tipo Northern de ARN pequeño, lo que mostró niveles significativamente reducidos de miR-122 maduro detectable, según los resultados de RT-PCR en tiempo real. En comparación, los niveles del control de let-7a no se vieron alterados. Resulta interesante que se observó una acumulación dependiente de la dosis de una banda de heterodúplex miR-122/SEQ ID NO: 61 desplazada, lo que sugiere que SEQ ID NO: 61 no selecciona como

diana miR-122 para la degradación, sino que en vez de eso se une al microARN, impidiendo así estéricamente su función. Se realizó el análisis por transferencia de tipo Northern de la siguiente manera:

Se realizó la preparación de membranas para transferencia de tipo Northern tal como se describe en Sempere *et al.* 2002, excepto por los siguientes cambios: Se cargó ARN total, 10 µg por carril, en tampón de carga de formamida (formamida al 47,5%, EDTA 9 mM, azul de bromofenol al 0,0125%, xileno-cianol al 0,0125%, SDS al 0,0125%) sobre un gel de poliacrilamida con TBE-urea Novex desnaturalizante al 15% (Invitrogen) sin calentamiento previo del ARN. Se transfirió por electroforesis el ARN a una membrana de transferencia de hibridación GeneScreen plus (PerkinElmer) a 200 mA durante 35 min. Se analizaron con sonda las membranas con oligonucleótidos modificados con ANB, marcados con 32P, complementarios para los microARN maduros*. Se marcaron los oligonucleótidos de ANB y se hibridaron con la membrana tal como se describe en Válczi *et al.* 2004, excepto por los siguientes cambios: Las disoluciones de prehibridación y de hibridación contenían formamida al 50%, SDS al 0,5%, 5x SSC, 5x solución de Denhardt y ADN de esperma de arenque desnaturalizado y cortado 20 µg/ml. Se realizaron hibridaciones a 45°C. Se visualizaron las transferencias escaneando en un escáner Storm 860. Se restó la señal del fondo de las señales radiactivas que se originaban de las bandas de miARN. Se corrigieron los valores de las señales de miR-122 para las diferencias de carga basándose en la señal de let-7a. Para determinar el tamaño de las señales radiactivas se usó el sistema de marcador Decade (Ambion) según las recomendaciones del proveedor.

Ejemplo 28: Secuestro de miR-122a mediante SEQ ID NO: 61 junto con distribución de SEQ ID NO: 61 evaluado mediante hibridación in situ de secciones de hígado

Se sometieron crio secciones de hígado de animales tratados a hibridaciones *in situ* para la detección y localización de miR-122 y SEQ ID NO: 61 (figura 14). Una sonda complementaria a miR-122 pudo detectar miR-122a. Una segunda sonda era complementaria a SEQ ID NO: 61. En la figura 14 se muestra un solapamiento, en verde está la distribución y las cantidades aparentes de miR-122a y SEQ ID NO: 61 y en azul está la tinción con DAPI nuclear, a un aumento de 10x. Los aumentos de 100x revelan la distribución intracelular de miR-122a y SEQ ID NO: 61 dentro de las células de hígado de ratón.

Las secciones de hígado de animales con control de solución salina mostraron un fuerte patrón de tinción de miR-122 a lo largo de toda la sección de hígado, mientras que las secciones de ratones tratados con SEQ ID NO: 61 mostraron un patrón de tinción irregular significativamente reducido. En cambio, la molécula de SEQ ID NO: 61 se detectó fácilmente en el hígado tratado con SEQ ID NO: 61, pero no en el hígado no tratado, con control de solución salina. Un aumento mayor localizó miR-122a en el citoplasma en los hepatocitos, mientras que el patrón *in situ* de miR-122 estaba claramente compartimentalizado, mientras que la molécula de SEQ ID NO: 61 estaba uniformemente distribuida en todo el citoplasma.

Ejemplo 29: Análisis con micromatriz

Se llevó a cabo una obtención de perfiles de expresión de todo el genoma de muestras de ARN total de hígados de ratones tratados con compuesto anti-miR-122 de ANB en solución salina y tratados con control de apareamiento erróneo de ANB 24 horas tras la última dosis usando matrices Affymetrix Mouse Genome 430 2.0. El análisis de los datos de matriz reveló 455 transcritos que estaban regulados por incremento en los hígados de ratones tratados con compuesto anti-miR de ANB en comparación con controles de solución salina y de apareamiento erróneo de ANB, mientras que 54 transcritos estaban regulados por disminución (figura 15a). Pudieron identificarse un total de 415 de los transcritos regulados por incremento y 53 de los regulados por disminución en la base de datos Ensembl. Posteriormente se examinaron las regiones no traducidas en 3' (UTR) de los ARNm expresados de manera diferencial para determinar la presencia de la secuencia de 6 nt CACTCC, correspondiente al complemento inverso de la región de semilla de los nucleótidos 2-7 en miR-122 maduro. El número de transcritos que tenían al menos una secuencia de reconocimiento de miR-122 fue de 213 (51%) entre los transcritos regulados por incremento y de 10 (19%) dentro de los transcritos regulados por disminución, mientras que la frecuencia en una población de secuencias al azar fue del 25%, lo que implica que una combinación significativa de los ARNm regulados por incremento representan dianas de miR-122 directas en el hígado (figura 15b).

El tratamiento con compuesto anti-miR de ANB mostró una reducción máxima de los niveles de miR-122 a las 24 horas, una reducción del 50% a una semana y correspondió a los controles de solución salina a las tres semanas tras la última dosis de ANB (ejemplo 12, "diseño antiguo"). Esto coincidió con un número notablemente reducido de genes expresados de manera diferencial entre los dos grupos de ratones en los últimos puntos de tiempo. En comparación con los 509 ARNm 24 horas tras la última dosis de ANB, se identificaron 251 genes expresados de manera diferencial tras una semana, pero sólo 18 genes tras tres semanas tras el tratamiento (figuras 15c y 15d). En general, los genes regulados por incremento 24 horas tras el tratamiento con compuesto anti-miR de ANB revierten después hacia niveles de control a lo largo de las dos semanas siguientes (figura 15d).

En conclusión, una gran porción de genes regulados por incremento/desreprimidos tras el tratamiento con compuesto anti-miR de ANB son dianas de miR-122, lo que indica un efecto muy específico para bloquear miR-122. Además, los genes regulados por incremento/desreprimidos se aproximan a los niveles normales 3 semanas tras el final del tratamiento, lo que sugiere un efecto terapéutico relativo largo, pero sin embargo no provoca una alteración

permanente, es decir, el efecto es reversible.

MÉTODOS:

- 5 Obtención de perfiles de expresión génica de ratones tratados con compuesto anti-miR de ANB.

Se compararon perfiles de expresión de hígados de ratones tratados con solución salina y con compuesto anti-miR de ANB. Se trataron ratones hembra NMRI con 25 mg/kg/día de compuesto anti-miR de ANB junto con control de solución salina durante tres días consecutivos y se sacrificaron 24 h, 1, 2 ó 3 semanas tras la última dosis. Adicionalmente, se obtuvieron perfiles de expresión de hígados de ratones tratados con el oligonucleótido de control de ANB de apareamiento erróneo 24 h tras la última dosis. Se analizaron tres ratones de cada grupo, proporcionando un total de 21 perfiles de expresión. Se midió la calidad y la concentración de ARN usando un bioanalizador Agilent 2100 y Nanodrop ND-1000, respectivamente. Se procesó ARN total siguiendo las instrucciones del kit de síntesis de ADNC en un ciclo con reactivos de amplificación en 3' para la expresión de GeneChip (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA, EE.UU.) para producir ADNC bicatenario. Esto se usó como molde para generar ARNC marcado con biotina siguiendo las especificaciones del fabricante. Se fragmentaron quince microgramos de ARNC marcado con biotina para obtener cadenas de entre 35 y 200 bases de longitud, de los cuales 10 microgramos se hibridaron en matrices de Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 durante la noche en el horno de hibridación 6400 de GeneChip usando procedimientos convencionales. Se lavaron las matrices y se tiñeron en una estación de fluidos 450 de GeneChip. Se llevó a cabo el escaneado usando el escáner 3000 de GeneChip y se realizó el análisis de imágenes usando el software operativo de GeneChip. Se realizaron la normalización y el análisis estadístico usando el paquete de software LIMMA para el entorno de programación R 2.7. Se eliminaron del conjunto de datos las sondas que se notificó que estaban ausentes por el software GCOS en todas las hibridaciones. Adicionalmente, se aplicó un filtro de intensidad a la base de datos para eliminar sondas que presentaban intensidades corregidas para el fondo inferiores a 16. Se normalizaron los datos usando normalización de cuantiles²⁸. Se evaluó la expresión diferencial usando un método de modelo lineal. Se ajustaron los valores de P para múltiples pruebas usando el método de Benjamini y Hochberg. Se consideró que las pruebas eran significativas si los valores de p ajustados eran $p < 0,05$. Se realizó el agrupamiento y la visualización de datos de matriz de Affymetrix usando el software MultiExperiment Viewer²⁹.

Predicción de sitio diana

Se extrajeron transcritos con 3' UTR indicadas de la base de datos Ensembl (versión 41) usando la herramienta de minería de datos EnsMart³⁰ y se buscó para determinar la presencia de la secuencia CACTCC que es el complemento inverso de la semilla de nucleótidos 2-7 en la secuencia de miR-122 maduro. Como control de fondo, se buscó en un conjunto de 1000 secuencias con una longitud de 1200 nt, correspondientes a la longitud de 3' UTR media de los transcritos regulados por incremento y por disminución a las 24 h tras la última dosis de compuesto anti-miR de ANB, para determinar la semilla de 6 nucleótidos de correspondencias de miR-122. Esto se llevó a cabo 500 veces y se usó el recuento medio para la comparación.

Ejemplo 30: La inhibición dependiente de la dosis de miR-122 en hígado de ratón mediante compuesto anti-miR de ANB se ve potenciada en comparación con la inhibición mediante antagomir de miR-122.

Se trataron ratones hembra NMRI con dosis indicadas de compuesto anti-miR de ANB (SEQ ID NO: 61) junto con un control de apareamiento erróneo (mm, SEQ ID NO: 65), solución salina y antagomir (SPC3595) durante tres días consecutivos y se sacrificaron 24 horas tras la última dosis (tal como en el ejemplo 11, "diseño antiguo", $n=5$). Se analizaron los niveles de miR-122 mediante qPCR y se normalizaron con respecto al grupo tratado con solución salina. Los genes con sitio diana de miR-122 predicho y regulados por incremento en la obtención de perfiles de expresión (AldoA, Nrdg3, Bckdk y CD320) mostraron una desrepresión dependiente de la dosis aumentando las dosis de compuesto anti-miR de ANB medido mediante qPCR.

La desrepresión fue constantemente superior en todos los ARNm diana de miR-122 sometidos a prueba (AldoA, Bckdk, CD320 y Nrdg3, figuras 17, 18, 19, 20) en ratones tratados con compuesto anti-miR de ANB en comparación con ratones tratados con antagomir. Esto también se indicó cuando se analizó la inhibición de miR-122 mediante qPCR específica para miR-122 (figura 16). Por tanto, los compuestos anti-miR de ANB proporcionan una inhibición funcional más potente de miR-122 que el antagomir a dosis correspondiente.

Ejemplo 31: Inhibición de miR-122 mediante compuesto anti-miR de ANB en ratones hipercolesterolémicos junto con reducción del colesterol y desrepresión de ARNm diana de miR-122.

Se alimentaron ratones hembra C57BL/6J con una dieta con alto contenido en grasa durante 13 semanas antes del inicio del tratamiento con SEQ ID NO: 63. Esto dio como resultado un aumento del peso hasta 30-35 g en comparación con el peso de ratones normales, que estaba justo por debajo de 20 g, según se pesaron al comienzo del tratamiento con compuesto anti-miR de ANB. Los ratones con dieta con alto contenido en grasa condujeron a un nivel de colesterol en plasma total significativamente aumentado de aproximadamente 130 mg/dl, haciendo así que los ratones fueran hipercolesterolémicos en comparación con el nivel normal de aproximadamente 70 mg/dl. Se

trataron i.p. los ratones tanto hipercolesterolémicos como normales dos veces por semana con 5 mg/kg de SEQ ID NO: 63 y el control de apareamiento erróneo correspondiente durante un periodo de estudio de 5 1/2 semanas. Se recogieron muestras de sangre semanalmente y se midió el colesterol en plasma total durante todo el transcurso del estudio. Tras sacrificar los ratones, se prepararon muestras de hígado y de sangre para la extracción de ARN total, cuantificación de miARN y ARNm, evaluación de los niveles de transaminasas en suero y la histología del hígado.

El tratamiento de ratones hipercolesterolémicos con SEQ ID NO: 63 dio como resultado la reducción de colesterol en plasma total de aproximadamente el 30% en comparación con ratones con control de solución salina tras 10 días y se mantuvo a este nivel durante todo el estudio (figura 21). El efecto no fue tan pronunciado en ratones con dieta normal. En cambio, el control de apareamiento erróneo no afectó a los niveles de colesterol en plasma ni en los ratones hipercolesterolémicos ni en los normales.

La cuantificación de la inhibición de miR-122 y la desrepresión de ARNm de gen diana de miR-122 (AldoA y Bckdk) tras el tratamiento a largo plazo con SEQ ID NO: 63 reveló un perfil comparable en ratones tanto hipercolesterolémicos como normales (figuras 22, 23, 24), demostrando así la potencia de SEQ ID NO: 63 en el antagonismo de miR-122 en ambos grupos de animales. El ensayo mediante qPCR de miR-122 indicó que el control de apareamiento erróneo también tenía un efecto sobre los niveles de miR-122 en los hígados de ratones tratados, aunque en menor grado en comparación con SEQ ID NO: 63. Esto puede ser una reducción asociada con la qPCR de horquilla. De manera que concuerda con esta noción, el tratamiento de ratones con el control de apareamiento erróneo no dio como resultado ninguna desrepresión funcional de los genes diana de miR-122 directos (figuras 23 y 24) ni reducción del colesterol en plasma (figura 21), lo que implica que el antagonismo de miR-122 mediado por SEQ ID NO: 63 es altamente específico *in vivo*.

Se evaluaron las enzimas hepáticas en hígados de ratones hipercolesterolémicos y normales tras el tratamiento a largo plazo con SEQ ID NO: 63. No se detectaron cambios en los niveles de alanina y aspartato aminotransferasa (ALT y AST) en los ratones hipercolesterolémicos tratados con SEQ ID NO: 63 en comparación con ratones con control de solución salina (figuras 25 y 26). Se observó un nivel de ALT posiblemente elevado en los ratones normales tras el tratamiento a largo plazo con SEQ ID NO: 63 (figura 26).

Ejemplo 32: Métodos para realizar el experimento y análisis con compuesto anti-miR de ANB/hipercolesterolémico:

Ratones y dosificación.

Se usaron ratones hembra C57BL/6J (Taconic M&B Laboratory Animals, Ejby, Dinamarca). Todas las sustancias se formularon en solución salina fisiológica (NaCl al 0,9%) hasta una concentración final que permitió que los ratones recibieran un volumen de inyección intraperitoneal de 10 ml/kg.

En el estudio de obesidad inducida por la dieta, los ratones recibieron una dieta con alto contenido en grasa (60% de energía) (D12492, Research Diets) durante 13 semanas para aumentar su nivel de colesterol en sangre antes de comenzar la dosificación. Se prolongó hasta 5 1/2 semanas el régimen de dosificación de compuesto anti-miR™ de ANB 5 mg/kg dos veces por semana. Se recogió plasma sanguíneo una vez por semana durante todo el periodo de dosificación. Tras completarse el experimento, se sacrificaron los ratones y se extrajo el ARN de los hígados para un análisis adicional. También se recogió suero para el análisis de enzimas hepáticas.

Extracción de ARN total.

Se almacenaron inmediatamente en RNAlater (Ambion) los hígados diseccionados de ratones sacrificados. Se extrajo el ARN total con reactivo Trizol según las instrucciones del fabricante (Invitrogen), excepto porque se lavó el sedimento de ARN precipitado en etanol al 80% etanol y no se agitó con vórtex.

RT-PCR cuantitativa específica para microARN.

Se cuantificaron los niveles de microARN de miR-122 y de let-7a con ensayo de microARN TaqMan (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se diluyó la reacción de RT diez veces en agua y posteriormente se usó para la amplificación mediante PCR en tiempo real según las instrucciones del fabricante. Una serie de dilución de ADNc de dos veces a partir de ARN total de hígado de un animal tratado con solución salina o reacción de ADNc de células transfectadas de manera simulada (usando 2,5 veces más ARN total que en las muestras) sirvió como patrón para garantizar un intervalo lineal (Ct frente al número de copias relativo) de la amplificación. Se usó un instrumento de PCR en tiempo real 7500 ó 7900 de Applied Biosystems para la amplificación.

RT-PCR cuantitativa

Se realizó la cuantificación de ARNm de genes seleccionados usando ensayos TaqMan convencionales (Applied Biosystems). Se llevó a cabo la reacción de transcripción inversa con decámeros al azar, 0,5 µg de ARN total y la enzima RT de M-MLV de Ambion según un protocolo convencional. Posteriormente se diluyó el ADNc de primera

cadena 10 veces en agua libre de nucleasa antes de la adición a la mezcla de reacción de RT-PCR. Una serie de dilución de ADNc de dos veces a partir de ARN total de hígado de un animal tratado con solución salina o reacción de ADNc de células transfectadas de manera simulada (usando 2,5 veces más ARN total que en las muestras) sirvió como patrón para garantizar un intervalo lineal (Ct frente al número de copias relativo) de la amplificación. Se usó un instrumento de PCR en tiempo real 7500 ó 7900 de Applied Biosystems para la amplificación.

Mediciones metabólicas.

Inmediatamente antes del sacrificio, se extrajo sangre del seno retro-orbital en tubos recubiertos con EDTA seguido por aislamiento de la fracción de plasma. Se analizó el colesterol en plasma total usando ABX Pentra Cholesterol CP (Horiba Grupo, Horiba ABX Diagnostics) según las instrucciones del fabricante.

Medición de enzimas hepáticas (ALT y AST)

Se preparó suero de cada ratón individual de la siguiente manera: Se almacenaron muestras de sangre a temperatura ambiente durante 2 h antes de la centrifugación (10 min, 3000 rpm a temperatura ambiente). Tras la centrifugación, se recogió el suero y se congeló a -20°C.

Se realizó la medición de ALT y AST en placas de 96 pocillos usando reactivos de ALT y AST de ABX Pentra según las instrucciones del fabricante. En resumen, se diluyeron muestras de suero 2,5 veces con H₂O y se sometió a ensayo cada muestra por duplicado. Tras la adición de 50 µl de muestra diluida o patrón (multical de ABX Pentra) a cada pocillo, se añadieron 200 µl de mezcla de reactivo de AST o ALT a 37°C a cada pocillo. Se realizaron mediciones cinéticas durante 5 min con un intervalo de 30 s a 340 nm y a 37°C usando un espectrofotómetro.

Ejemplo 33

Modulación de la replicación del virus de la hepatitis C mediante compuesto anti-miR de ANB (SEQ ID NO: 63)

Los oligos usados en este ejemplo (mayúsculas: ANB, minúsculas ADN, las C de ANB son metilo, y los ANB son preferiblemente B-D-oxi (o en superíndice tras un residuo de ANB):

SEQ ID NO:		
63	5'- ^m C _s ^o C _s A _s ^o t _s G _s ^o T _s ^o C _s a _s ^m C _s ^o a _s ^m C _s ^o t _s ^m C _s ^o mC _s ^o -3'	compuesto anti-miR de ANB que selecciona como diana miR-122
66	5'-A _s ^o t _s G _s ^o T _s ^o C _s a _s ^m C _s ^o a _s ^m C _s ^o t _s ^m C _s ^o mC _s ^o -3'	compuesto anti-miR de ANB que selecciona como diana miR-122
64	5'- ^m C _s ^o C _s A _s ^o t _s ^m C _s ^o T _s ^o G _s a _s ^m C _s ^o C _s ^m C _s ^o t _s A _s ^o mC _s ^o -3'	control de apareamiento erróneo de 4 nt para SEQ ID 63
	2'OMe anti-122: oligo modificado con 2'OMe de longitud completa (23 nt) complementario a miR-122	
	2'OMe Ctrl: control modificado con 2'OMe desordenado	

Se ha mostrado que la replicación del virus de la hepatitis C (VHC) se ve facilitada por miR-122 y, por consiguiente, se ha demostrado que antagonizar miR-122 afecta a la replicación de VHC en un modelo celular de hepatoma *in vitro*. Se evalúa la eficacia de SEQ ID NO: 63 para reducir la replicación de VHC en el modelo celular basado en Huh-7. Datos preliminares sobre SEQ ID NO: 63 junto con su versión truncada SEQ ID NO: 66 (compuesto anti-miR de ANB de 13 meros) y control de apareamiento erróneo de 4 nt de la inhibición de la replicación de VHC en la línea celular Huh-7 transfectada con un replicón de VHC (NNeo/C-5B). Se transfectaron las diferentes moléculas anti-miR de ANB junto con un 2' OMe-oligonucleótido antisentido y desordenado en células Huh-7, se dejó que el VHC se replicara durante 48 horas. Se sometieron muestras de ARN total extraídas de las células Huh-7 a análisis por transferencia de tipo Northern.

Se observó una reducción significativa del ARN de VHC en células tratadas con SEQ ID NO: 63 en comparación con el control simulado y de apareamiento erróneo. La inhibición fue claramente dependiente de la dosis tanto con SEQ ID NO: 63 como con SEQ ID NO: 66. Resulta interesante que usando un 2'OMe-oligonucleótido completamente complementario a miR-122 a 50 nM fue mucho menos eficaz que SEQ ID NO: 63 a la misma concentración final. Resulta notable que la SEQ ID NO: 66 anti-miR de ANB de 13 nt mostró una eficacia comparable con SEQ ID NO: 63 (Elmen *et al.* Nature 452, 896-899 (17 de abril de 2008)).

Ejemplo 34: Ensayo de indicador de luciferasa para evaluar la inhibición funcional de microARN mediante compuestos anti-miR de ANB y otros oligos que seleccionan como diana microARN: Generalización de un nuevo diseño y nuevo diseño potenciado como diseño preferido para bloquear la función de microARN

- 5 Los oligos usados en este ejemplo (mayúsculas: ANB, minúsculas: ADN) para evaluar el efecto de desrepresión de compuesto anti-miR de ANB sobre un indicador de luciferasa con secuencia diana de microARN clonada mediante bloque de microARN respectivos:

SEQ ID NO	target: hsa-miR-122a MIMAT0000421	
58	uggagugugacaaugguguuugu	
	examinado en la línea celular HUH-7 que expresa miR-122	
	microARN diana, secuencia de oligo	Diseño
67	miR-122 5'- ACAAacaccattgtcacacTCCA-3'	Complemento completo, hueco
68	miR-122 5'- acaaacACCATTGTcacactcca-3'	Complemento completo, bloque
69	miR-122 5'- acAaaCacCatTgtCacActCca-3'	Complemento completo, ANB_3
63	miR-122 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3'	Nuevo diseño
70	miR-122 5'- CcAtTGTcaCACtCC-3'	Nuevo diseño potenciado

- 10 *Ejemplo 35: Inhibición de combinación de las dos etapas (replicación genómica y ensamblaje/secreción) en el ciclo vital del VHC y reducción de la replicación viral completa mediante transfección conjunta de la combinación de oligos de ANB en un sistema de modelo de replicación de VHC in vitro.*

- 15 Un sistema de cultivo celular que permite la replicación completa de VHC (replicación genómica y liberación de ensamblaje de partículas), Huh-7.5 infectado con FL-J6/JFH, se transfecta usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) con compuesto anti-miR-122 de ANB junto con compuesto antisentido de apoB de ANB.

- 20 Se evalúa el ARN genómico de VHC tanto de manera intracelular como extracelular mediante RT-PCR en tiempo real específica para VHC o transferencia de tipo Northern, así como el título viral excretado de las células.

Ejemplo 36: Inhibición de estas dos etapas en el ciclo vital del VHC y reducción de la replicación viral mediante administración de la combinación de oligos de ANB en un sistema de modelo de replicación de VHC in vivo.

- 25 Ratones SCID con injerto de hepatocitos humanos replican el VHC. Se administran a los ratones inyecciones i.p. con combinación de dosis en el intervalo de, pero sin limitarse a, 5-25 mg/kg de compuesto anti-miR-122 de ANB junto con 0,5-2,5 mg/kg o menos de compuesto antisentido de apoB de ANB. Se evalúa la producción viral reducida midiendo el ARN de VHC (RT-PCR en tiempo real específica para VHC) y las partículas infecciosas en la sangre, también se evalúa el ARN de VHC en el hígado de ratones infectados (extracción de ARN a partir de hepatocitos humanos injertados y posteriormente RT-PCR en tiempo real específica para VHC y transferencia de tipo Northern).

Ejemplo 37: Inhibición de estas dos etapas en el ciclo vital del VHC y reducción de la replicación viral mediante administración de la combinación de oligos de ANB en un sistema de modelo de replicación de VHC in vivo.

- 35 A chimpancé con infección crónica por VHC se les inyecta una combinación de compuesto anti-miR-122 de ANB y oligonucleótido antisentido de apoB100 de ANB, con una razón de dosis tal como, pero sin limitarse a, 3-10 mg/kg de compuesto anti-miR-122 de ANB y 0,1-3 mg/kg de oligonucleótido antisentido de apoB100 de ANB.

- 40 Se evalúa la producción viral reducida midiendo el ARN de VHC (RT-PCR en tiempo real específica para VHC) y partículas infecciosas en la sangre, también se evalúa el ARN de VHC en el hígado de ratones infectados (extracción de ARN a partir de hepatocitos humanos injertados y posteriormente RT-PCR en tiempo real específica para VHC y transferencia de tipo Northern).

- 45 *Ejemplo 38: Un tratamiento propuesto contra VHC puede consistir en compuesto anti-miR-122 de ANB y compuesto antisentido de apoB de ANB usando una administración i.v. semanal tal como, pero sin limitarse a, de 1-5 mg/kg de*

compuesto anti-miR de ANB y 0,1-1 mg/kg de compuesto antisentido de apoB de ANB.

Ejemplo 39: Puede usarse la medición de enzimas hepáticas (AST y ALT) en un paciente como medio para evaluar la eficacia del tratamiento. Evaluación de la progresión de la enfermedad y respuesta al tratamiento:

Durante la fase aguda de la infección por VHC las transaminasas hepáticas en suero (alanina aminotransferasa, ALT/aspartato aminotransferasa, AST) están elevadas y se miden mediante ensayos colorimétricos (por ejemplo, ABX pentra, (Horiba ABX, Montpellier, Francia), el kit se usa según el protocolo). Estos niveles todavía pueden estar por encima de los niveles normales si se establece infección crónica.

Ejemplo 40: Medición de la eficacia del tratamiento en pacientes (recuento de virus).

Los métodos para diagnosticar la infección por VHC son procedimientos convencionales que se conocen bien en la técnica para el experto en la técnica.

Evaluación adicional de la progresión de la enfermedad por VHC y respuesta al tratamiento:

Durante la fase aguda de la infección por VHC pueden detectarse altas cargas de virus en la sangre. La carga viral disminuye tras la fase aguda, pero es más sensible que las transaminasas hepáticas. La carga viral se evalúa mediante PCR cuantitativa en tiempo real (por ejemplo disponible de Quest Diagnostics, Lyndhurst, NJ, EE.UU.).

Lista de secuencias

<110> Santaris Pharma

<120> Tratamiento de combinación para el tratamiento de infección por virus de la hepatitis C

<130> 1047WO

<150> Documento 60/977497

<151> 04-10-2007

<150> Documento US 60/979217

<151> 11-10-2007

<150> Documento US 71/028062

<151> 12-02-2008

<150> Documento US 61/028062

<151> 12-02-2008

<150> Documento EP 08104780

<151> 17-07-2008

<160> 103

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 16

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> motivo antisentido

<400> 1

cagcattggt attcag 16

<210> 2

<211> 15

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> motivo antisentido

<400> 2

cagcattggt attca 15

<210> 3

<211> 15

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> motivo antisentido

<400> 3

agcattggt ttcag 15

<210> 4

<211> 14

<212> ADN

<213> artificial

<220>
 <223> motivo antisentido
 <400> 4
 cagcattggt attc 14
 5 <210> 5
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 10 <223> motivo antisentido
 <400> 5
 agcattggta ttca 14
 <210> 6
 <211> 14
 15 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> motivo antisentido
 <400> 6
 20 gcattggtat tcag 14
 <210> 7
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> motivo antisentido
 <400> 7
 cagcattggt att 13
 <210> 8
 30 <211> 13
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> motivo antisentido
 35 <400> 8
 agcattggta ttc 13
 <210> 9
 <211> 13
 <212> ADN
 40 <213> artificial
 <220>
 <223> motivo antisentido
 <400> 9
 gcattggtat tca 13
 45 <210> 10
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 50 <223> motivo antisentido
 <400> 10
 cattggtatt cag 13
 <210> 11
 <211> 12
 55 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> motivo antisentido
 <400> 11
 60 cagcattggt at 12
 <210> 12
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> artificial
 65 <220>
 <223> motivo antisentido

<400> 12
 agcattggta tt 12
 <210> 13
 <211> 12
 5 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> motivo antisentido
 <400> 13
 10 gcattggtat tc 12
 <210> 14
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> motivo antisentido
 <400> 14
 cattggtatt ca 12
 <210> 15
 20 <211> 12
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> motivo antisentido
 25 <400> 15
 attggtattc ag 12
 <210> 16
 <211> 15
 <212> ADN
 30 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (1)..(15)
 <223> enlace fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 40 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> metil-citosina de ANB
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> ANB
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> metil-citosina de ANB
 <400> 16
 agcattggta ttcag 15
 55 <210> 17
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 60 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> enlaces fosforotioato
 65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(3)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (3)..(3)
 <223> metil-citosina de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(14)
 10 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> metil-citosina de ANB
 15 <400> 17
 agcattggta ttca 14
 <210> 18
 <211> 14
 <212> ADN
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1)..(3)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(13)
 30 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> metil-citosina de ANB
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(14)
 <223> ANB
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> metil-citosina de ANB
 <400> 18
 agcattggta ttca 14
 45 <210> 19
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 50 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> enlace fosforotioato
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> ANB
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (3)..(13)
 <223> enlace fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (3)..(3)
 <223> metil-citosina de ANB

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(14)
 <223> ANB
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> metil-citosina de ANB
 <400> 19
 10 agcattggta ttca 14
 <210> 20
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 20 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> ANB
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> metil-citosina de ANB
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (4)..(14)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (12)..(14)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 40 <223> metil-citosina de ANB
 <400> 20
 agcattggta ttca 14
 <210> 21
 <211> 14
 45 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (1)..(11)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (1)..(3)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 60 <223> metil-citosina de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(14)
 <223> enlaces fosforotioato
 65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (12)..(14)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (13)..(13)
 <223> metil-citosina de ANB
 <400> 21
 agcattggta ttca 14
 <210> 22
 10 <211> 14
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (3)..(3)
 <223> metil-citosina de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(14)
 30 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> enlaces fosforotioato
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> metil-citosina de ANB
 <400> 22
 40 agcattggta ttca 14
 <210> 23
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> artificial
 45 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 50 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> ANB
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> metil-citosina de ANB
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (12)..(14)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (13)..(13)
 <223> metil-citosina de ANB

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> enlaces fosforotioato
 5 <400> 23
 agcattggta ttca 14
 <210> 24
 <211> 14
 <212> ADN
 10 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (1)..(3)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(13)
 20 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> metil-citosina de ANB
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(14)
 <223> ANB
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> metil-citosina de ANB
 <400> 24
 agcattggta ttca 14
 35 <210> 25
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 40 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> ANB
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(12)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> metil-citosina de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (12)..(14)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 60 <223> metil-citosina de ANB
 <400> 25
 agcattggta ttca 14
 <210> 26
 <211> 13
 65 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(13)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 10 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> metil-citosina de ANB
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> ANB
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> metil-citosina de ANB
 <400> 26
 gcattggtat tca 13
 25 <210> 27
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 30 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> ANB
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(12)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> metil-citosina de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (11)..(13)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 50 <223> metil-citosina de ANB
 <400> 27
 gcattggtat tca 13
 <210> 28
 <211> 13
 55 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (1)..(2)
 <223> ANB

	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (2)..(2)
	<223> metil-citosina de ANB
5	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (3)..(13)
	<223> enlaces fosforotioato
	<220>
10	<221> misc_feature
	<222> (11)..(13)
	<223> ANB
	<400> 28
	gcattggtat tca 13
15	<210> 29
	<211> 13
	<212> ADN
	<213> artificial
	<220>
20	<223> oligómero de ANB
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(10)
	<223> enlaces fosforotioato
25	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (2)..(2)
	<223> ANB
	<220>
30	<221> misc_feature
	<222> (2)..(2)
	<223> metil-citosina de ANB
	<220>
	<221> misc_feature
35	<222> (11)..(13)
	<223> enlaces fosforotioato
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (11)..(13)
40	<223> ANB
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (12)..(12)
	<223> metil-citosina de ANB
45	<400> 29
	gcattggtat tca 13
	<210> 30
	<211> 13
	<212> ADN
50	<213> artificial
	<220>
	<223> oligómero de ANB
	<220>
	<221> misc_feature
55	<222> (1)..(11)
	<223> enlaces fosforotioato
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(2)
60	<223> ANB
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (2)..(2)
	<223> metil-citosina de ANB
65	<220>
	<221> misc_feature

<222> (11)..(13)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (12)..(13)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 10 <223> metil-citosina de ANB
 <400> 30
 gcattggtat tca 13
 <210> 31
 <211> 13
 15 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1)..(2)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 30 <223> metil-citosina de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> ANB
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> metil-citosina de ANB
 <400> 31
 40 gcattggtat tca 13
 <210> 32
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> artificial
 45 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 50 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(12)
 <223> enlaces fosforotioato
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> metil-citosina de ANB
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (12)..(12)
 <223> metil-citosina de ANB

<400> 32
 gcattggtat tca 13
 <210> 33
 <211> 13
 5 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (2)..(11)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 20 <223> metil-citosina de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> ANB
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> metil-citosina de ANB
 <400> 33
 30 gcattggtat tca 13
 <210> 34
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 40 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> ANB
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> metil-citosina de ANB
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (12)..(12)
 <223> metil-citosina de ANB
 <400> 34
 gcattggtat tc 12
 <210> 35
 60 <211> 12
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(2)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (2)..(12)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 10 <223> metil-citosina de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> ANB
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> metil-citosina de ANB
 <400> 35
 20 gcattggtat tc 12
 <210> 36
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 30 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> ANB
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> metil-citosina de ANB
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (3)..(12)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (11)..(12)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 50 <223> metil-citosina de ANB
 <400> 36
 gcattggtat tc 12
 <210> 37
 <211> 12
 55 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (1)..(10)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (1)..(2)
 <223> ANB

	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (2)..(2)
	<223> metil-citosina de ANB
5	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (11)..(12)
	<223> enlaces fosforotioato
	<220>
10	<221> misc_feature
	<222> (11)..(12)
	<223> ANB
	<220>
	<221> misc_feature
15	<222> (12)..(12)
	<223> metil-citosina de ANB
	<400> 37
	gcattggtat tc 12
	<210> 38
20	<211> 12
	<212> ADN
	<213> artificial
	<220>
	<223> oligómero de ANB
25	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(11)
	<223> enlaces fosforotioato
	<220>
30	<221> misc_feature
	<222> (1)..(2)
	<223> ANB
	<220>
	<221> misc_feature
35	<222> (2)..(2)
	<223> metil-citosina de ANB
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (11)..(12)
40	<223> ANB
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (12)..(12)
	<223> metil-citosina de ANB
45	<400> 38
	gcattggtat tc 12
	<210> 39
	<211> 12
	<212> ADN
50	<213> artificial
	<220>
	<223> oligómero de ANB
	<220>
	<221> misc_feature
55	<222> (1)..(2)
	<223> ANB
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (2)..(11)
60	<223> enlaces fosforotioato
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (2)..(2)
	<223> metil-citosina de ANB
65	<220>
	<221> misc_feature

<222> (11)..(12)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (12)..(12)
 <223> metil-citosina de ANB
 <400> 39
 gcattggtat tc 12
 <210> 40
 10 <211> 12
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> ANB
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> metil-citosina de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (3)..(10)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 30 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> metil-citosina de ANB
 35 <400> 40
 gcattggtat tc 12
 <210> 41
 <211> 15
 <212> ADN
 40 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (1)..(15)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 50 <223> Oxi-ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> metil-citosina de oxi-ANB
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(15)
 <223> Oxi-ANB
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> metil-citosina de oxi-ANB
 <400> 41
 cagcattggt attca 15
 65 <210> 42
 <211> 14

<212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(14)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Oxi-ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (12)..(13)
 <223> Oxi-ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 20 <223> metil-citosina de oxi-ANB
 <400> 42
 agcattggta ttca 14
 <210> 43
 <211> 14
 25 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (1)..(14)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (1)..(2)
 <223> Oxi-ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 40 <223> Oxi-ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> metil-citosina de oxi-ANB
 45 <400> 43
 agcattggta ttca 14
 <210> 44
 <211> 14
 <212> ADN
 50 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (1)..(14)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 60 <223> Oxi-ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> metil-citosina de oxi-ANB
 65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (11)..(13)
 <223> Oxi-ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (13)..(13)
 <223> metil-citosina de oxi-ANB
 <400> 44
 agcattggta ttca 14
 <210> 45
 10 <211> 12
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Oxi-ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (11)..(12)
 <223> Oxi-ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 30 <223> metil-citosina de oxi-ANB
 <400> 45
 gcattggat tc 12
 <210> 46
 <211> 12
 35 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (1)..(2)
 <223> Oxi-ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 50 <223> metil-citosina de oxi-ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(12)
 <223> Oxi-ANB
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> metil-citosina de oxi-ANB
 <400> 46
 60 gcattggat tc 12
 <210> 47
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> artificial
 65 <220>
 <223> oligómero de ANB

	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(10)
	<223> enlaces fosforotioato
5	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(1)
	<223> Oxi-ANB
	<220>
10	<221> misc_feature
	<222> (10)..(10)
	<223> Oxi-ANB
	<400> 47
	gcattggtat 10
15	<210> 48
	<211> 10
	<212> ADN
	<213> artificial
	<220>
20	<223> oligómero de ANB
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(10)
	<223> enlaces fosforotioato
25	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(2)
	<223> Oxi-ANB
	<220>
30	<221> misc_feature
	<222> (2)..(2)
	<223> metil-citosina de oxi-ANB
	<220>
	<221> misc_feature
35	<222> (9)..(10)
	<223> Oxi-ANB
	<400> 48
	gcattggtat 10
	<210> 49
40	<211> 10
	<212> ADN
	<213> artificial
	<220>
	<223> oligómero de ANB
45	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(10)
	<223> enlaces fosforotioato
	<220>
50	<221> misc_feature
	<222> (1)..(2)
	<223> Oxi-ANB
	<220>
	<221> misc_feature
55	<222> (2)..(2)
	<223> metil-citosina de oxi-ANB
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (8)..(10)
60	<223> Oxi-ANB
	<400> 49
	gcattggtat 10
	<210> 50
	<211> 14
65	<212> ADN
	<213> artificial

<220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(2)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 10 <223> ANB
 <400> 50
 agcattggta ttca 14
 <210> 51
 <211> 14
 15 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (11)..(13)
 <223> ANB
 <400> 51
 agcattggta ttca 14
 <210> 52
 30 <211> 14
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> ANB
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> ANB
 <400> 52
 agcattggta ttca 14
 45 <210> 53
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 50 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> ANB
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(14)
 <223> ANB
 <400> 53
 60 agcattggta ttca 14
 <210> 54
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> artificial
 65 <220>
 <223> oligómero de ANB

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> ANB
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> ANB
 <400> 54
 10 gcattggtat tc 12
 <210> 55
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 20 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> ANB
 25 <400> 55
 gcattggtat tc 12
 <210> 56
 <211> 12
 <212> ADN
 30 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (1)..(2)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(12)
 40 <223> ANB
 <400> 56
 gcattggtat tc 12
 <210> 57
 <211> 10
 45 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (10)..(10)
 <223> ANB
 <400> 57
 gcattggtat 10
 <210> 58
 60 <211> 23
 <212> ARN
 <213> *homo sapiens*
 <400> 58
 uggaguguga caaugguguu ugu 23
 65 <210> 59
 <211> 23

<212> ARN
 <213> *homo sapiens*
 <400> 59
 uguuuguggu aacaguguga ggu 23
 5 <210> 60
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 10 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> enlaces fosforotioato
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> ANB
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (8)..(8)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 30 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> ANB
 35 <400> 60
 ccattgtcac actcca 16
 <210> 61
 <211> 16
 <212> ADN
 40 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (1)..(16)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 50 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> ANB
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> ANB
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (15)..(15)
 <223> ANB

<400> 61
 ccattgtcac actcca 16
 <210> 62
 <211> 16
 5 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (1)..(3)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(15)
 20 <223> ANB
 <400> 62
 ccattgtcac actcca 16
 <210> 63
 <211> 15
 25 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (1)..(15)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (1)..(1)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 40 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> ANB
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> ANB
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (14)..(15)
 <223> ANB
 <400> 63
 ccattgtcac actcc 15
 <210> 64
 60 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(15)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(1)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 10 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> ANB
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> ANB
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (15)..(15)
 <223> ANB
 <400> 64
 ccattctgac cctac 15
 <210> 65
 30 <211> 16
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (6)..(6)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 50 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> ANB
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> ANB
 <400> 65
 60 ccattgtctc aatcca 16
 <210> 66
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> artificial
 65 <220>
 <223> oligómero de ANB

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> enlaces fosforotioato
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> ANB
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> ANB
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 20 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> ANB
 25 <400> 66
 attgtcacac tcc 13
 <210> 67
 <211> 23
 <212> ADN
 30 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (1)..(4)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(23)
 40 <223> ANB
 <400> 67
 acaaacacca ttgtcacact cca 23
 <210> 68
 <211> 23
 45 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (7)..(14)
 <223> ANB
 <400> 68
 acaaacacca ttgtcacact cca 23
 55 <210> 69
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 60 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> ANB
 65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (6)..(6)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (9)..(9)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (12)..(12)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> ANB
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> ANB
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> ANB
 <400> 69
 acaaacacca ttgtcacact cca 23
 25 <210> 70
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 30 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> ANB
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> ANB
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (5)..(7)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (10)..(12)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 50 <223> ANB
 <400> 70
 ccattgtcac actcc 15
 <210> 71
 <211> 13
 55 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (1)..(5)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (7)..(10)
 <223> ANB

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> ANB
 5 <400> 71
 attgtcacac tcc 13
 <210> 72
 <211> 11
 <212> ADN
 10 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (1)..(3)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(8)
 20 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> ANB
 25 <400> 72
 tgtcacactc c 11
 <210> 73
 <211> 15
 <212> ADN
 30 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (1)..(15)
 <223> análogos de nucleótido de alta afinidad
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 40 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'MOE
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> ANB
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> 2'MOE
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (6)..(7)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 60 <223> 2'MOE
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> ANB
 65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (11)..(11)
 <223> 2'MOE
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (12)..(12)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (13)..(13)
 <223> 2'MOE
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> ANB
 15 <400> 73
 ccattgtcac actcc 15
 <210> 74
 <211> 15
 <212> ADN
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1)..(1)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 30 <223> 2'Fluoro
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> ANB
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'Fluoro
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> 2'Fluoro
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (6)..(7)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 50 <223> 2'Fluoro
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> ANB
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'Fluoro
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (13)..(13)
 <223> 2'Fluoro

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> ANB
 5 <400> 74
 ccattgtcac actcc 15
 <210> 75
 <211> 16
 <212> ADN
 10 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (3)..(3)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 20 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> ANB
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> ANB
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> ANB
 <400> 75
 tgcattggatt tgcaca 16
 35 <210> 76
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 40 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> ANB
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> ANB
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (12)..(12)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 60 <223> ANB
 <400> 76
 tgcattggatt tgcac 15
 <210> 77
 <211> 13
 65 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1) .. (1)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (44) .. (4)
 10 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7) .. (7)
 <223> ANB
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (10)
 <223> ANB
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (13) .. (13)
 <223> ANB
 <400> 77
 catggatttg cac 13
 25 <210> 78
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 30 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (2)
 <223> ANB
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4) .. (4)
 <223> ANB
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (6) .. (6)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (8) .. (8)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (10)
 50 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12) .. (12)
 <223> ANB
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14) .. (14)
 <223> ANB
 <400> 78
 60 tgcattgatt tgcac 15
 <210> 79
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> artificial
 65 <220>
 <223> oligómero de ANB

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (2)
 <223> ANB
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4) .. (4)
 <223> ANB
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (6) .. (6)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (8) .. (8)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (10)
 20 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12) .. (12)
 <223> ANB
 25 <400> 79
 catggatttg cac 13
 <210> 80
 <211> 13
 <212> ADN
 30 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (1) .. (1)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 40 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8) .. (8)
 <223> ANB
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (10)
 <223> ANB
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (12) .. (13)
 <223> ANB
 <400> 80
 catggatttg cac 13
 55 <210> 81
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 60 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223> ANB
 65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (3) .. (3)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (6) .. (7)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (10) ..(10)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12) .. (12)
 <223> ANB
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14) .. (15)
 <223> ANB
 <400> 81
 20 tgcattgatt tgcac 15
 <210> 82
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 30 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3) .. (3)
 <223> ANB
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (5)
 <223> ANB
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (7) .. (7)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (9) .. (10)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12) .. (12)
 50 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14) .. (15)
 <223> ANB
 55 <400> 82
 tgcattgatt tgcaca 16
 <210> 83
 <211> 16
 <212> ADN
 60 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (2) .. (2)
 <223> ANB

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (5)
 <223> ANB
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> ANB
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (11) .. (11)
 <223> ANB
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (14) .. (14)
 <223> ANB
 <400> 83
 ccattgtcac actcca 16
 <210> 84
 20 <211> 16
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (2)
 <223> ANB
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (5)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (8) .. (8)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11) .. (11)
 40 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14) .. (14)
 <223> ANB
 45 <400> 84
 ccattgtaac tctcca 16
 <210> 85
 <211> 16
 <212> ADN
 50 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (3) .. (3)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6) .. (6)
 60 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (9)
 <223> ANB
 65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (12) .. (12)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (15) .. (15)
 <223> ANB
 <400> 85
 ccattgtcac actcca 16
 <210> 86
 10 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (2)
 <223> ANB
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (5)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (8) .. (8)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11) .. (11)
 30 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14) .. (14)
 <223> ANB
 35 <400> 86
 ccattgtcac actcc 15
 <210> 87
 <211> 13
 <212> ADN
 40 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (3) .. (3)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6) .. (6)
 50 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (9)
 <223> ANB
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12) .. (12)
 <223> ANB
 <400> 87
 60 attgtcacac tcc 13
 <210> 88
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial
 65 <220>
 <223> oligómero de ANB

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3) .. (3)
 <223> ANB
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6) .. (6)
 <223> ANB
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (9)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (12) .. (12)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15) .. (15)
 20 <223> ANB
 <400> 88
 ccattgtcac actcc 15
 <210> 89
 <211> 13
 25 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (4) .. (4)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7) .. (7)
 40 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (10)
 <223> ANB
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13) .. (13)
 <223> ANB
 <400> 89
 50 attgtcacac tcc 13
 <210> 90
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> artificial
 55 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (2)
 60 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4) .. (4)
 <223> ANB
 65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (6) .. (6)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (8) .. (8)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (10) .. (10)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12) .. (12)
 <223> ANB
 15 <400> 90
 attgtcacac tcc 13
 <210> 91
 <211> 13
 <212> ADN
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1) .. (1)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4) .. (5)
 30 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8) .. (8)
 <223> ANB
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (10)
 <223> ANB
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (12) .. (13)
 <223> ANB
 <400> 91
 attgtcacac tcc 13
 45 <210> 92
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 50 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223> ANB
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3) .. (3)
 <223> ANB
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (6) .. (7)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (10) .. (10)
 <223> ANB

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12) .. (12)
 <223> ANB
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14) .. (15)
 <223> ANB
 <400> 92
 10 ccattgtcac actcc 15
 <210> 93
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 20 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4) .. (4)
 <223> ANB
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7) .. (7)
 <223> ANB
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (11) .. (11)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (15) .. (15)
 <223> ANB
 <400> 93
 ccattgtcac actcca 16
 <210> 94
 40 <211> 16
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (3)
 <223> ANB
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (13) .. (15)
 <223> ANB
 <400> 94
 ccattgtcac actcca 16
 55 <210> 95
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 60 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (2)
 <223> ANB
 65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (5) .. (5)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (8) .. (8)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (11)..(11)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> ANB
 15 <400> 95
 tcacgattag catta 16
 <210> 96
 <211> 16
 <212> ADN
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (2) .. (2)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (5)
 30 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8) .. (8)
 <223> ANB
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11) .. (11)
 <223> ANB
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (14) .. (14)
 <223> ANB
 <400> 96
 atcacgatta gcatta 16
 45 <210> 97
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 50 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223> ANB
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> ANB
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (5)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (7) .. (7)
 <223> ANB

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (9)
 <223> ANB
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11) .. (11)
 <223> ANB
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (13) .. (13)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (15) .. (15)
 <223> ANB
 <400> 97
 tcacgattag catta 16
 <210> 98
 20 <211> 16
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223> ANB
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (4) .. (4)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (6) .. (6)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8) .. (8)
 40 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (10)
 <223> ANB
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12) .. (12)
 <223> ANB
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (14) .. (14)
 <223> ANB
 <400> 98
 atcacgatta gcatta 16
 55 <210> 99
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 60 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (2)
 <223> ANB
 65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (5) .. (5)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (8) .. (8)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (11) .. (11)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> ANB
 15 <400> 99
 gagccgaacg aacaa 15
 <210> 100
 <211> 13
 <212> ADN
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (3)..(3)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6) .. (6)
 30 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (9)
 <223> ANB
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12) .. (12)
 <223> ANB
 <400> 100
 40 gccgaacgaa caa 13
 <210> 101
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial
 45 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 50 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3) .. (3)
 <223> ANB
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (5)
 <223> ANB
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (7) .. (7)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (9) .. (9)
 <223> ANB

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11) .. (11)
 <223> ANB
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13) .. (13)
 <223> ANB
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (15) .. (15)
 <223> ANB
 <400> 101
 gagccgaacg aacaa 15
 15 <210> 102
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 20 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223> ANB
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3) .. (3)
 <223> ANB
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (5)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (7) .. (7)
 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (9)
 40 <223> ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11) .. (11)
 <223> ANB
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13) .. (13)
 <223> ANB
 <400> 102
 50 gccgaacgaa caa 13
 <210> 103
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> artificial
 55 <220>
 <223> oligómero de ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (16)
 60 <223> enlaces fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (3)
 <223> OXI-ANB
 65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (11) .. (1)
 <223> metil-citosina de OXI-ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (13) .. (15)
 <223> OXI-ANB
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14) .. (14)
 10 <223> metil-citosina de OXI-ANB
 <400> 103
 cagcattgggt attcag 16

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor de miR-122 para el tratamiento de infección por virus de la hepatitis C (VHC) o hiperlipidemia o hipercolesterolemia o para la prevención o el tratamiento de aterosclerosis, en el que dicho inhibidor de miR-122 es un oligonucleótido antisentido de secuencia 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3', y en el que las letras minúsculas representan ADN, las letras mayúsculas representan ANB y todas las C de ANB son 5'-metil-citosina y todos los enlaces internucleosídicos son enlaces fosforotioato, y en el que el inhibidor de miR-122 debe usarse en combinación con un inhibidor adicional de ensamblaje de VLDL que es o bien un compuesto oligomérico antisentido que comprende una secuencia de nucleobases que es complementaria a una región correspondiente del ARNm de apoB-100 o un compuesto hipocolesterolemiante seleccionado del grupo que consiste en resinas secuestradoras de sales biliares (por ejemplo, colestiramina, colestipol y clorhidrato de colesvelam), inhibidores de HMGCoA reductasa (por ejemplo, lovastatina, cerivastatina, prevastatina, atorvastatina, simvastatina y fluvastatina), ácido nicotínico, derivados de ácido fibríco (por ejemplo, clofibrato, gemfibrozilo, fenofibrato, bezafibrato y ciprofibrato), probucol, neomicina, dextrotiroxina, ésteres de estanoles vegetales, inhibidores de la absorción de colesterol (por ejemplo, ezetimiba), implitapida, inhibidores de transportadores de ácidos biliares (transportadores de ácidos biliares dependientes de sodio apicales), reguladores de CYP7a hepática, agentes terapéuticos de sustitución de estrógeno (por ejemplo, tamoxifeno), antiinflamatorios (por ejemplo, glucocorticoides) y estatinas.
2. Inhibidor de miR-122 según la reivindicación 1, en el que el inhibidor adicional de ensamblaje de VLDL es una estatina.
3. Inhibidor de miR-122 según la reivindicación 2, en el que la estatina se selecciona del grupo que consiste en lovastatina, cerivastatina, prevastatina, atorvastatina, simvastatina y fluvastatina.
4. Inhibidor de miR-122 según la reivindicación 2, en el que la estatina es fluvastatina.
5. Inhibidor de miR-122 según la reivindicación 1, en el que el inhibidor de ensamblaje de VLDL es un compuesto oligomérico antisentido que comprende una secuencia de nucleobases que es complementaria a una región correspondiente del ARNm de apoB-100.
6. Inhibidor de miR-122 según la reivindicación 5, en el que el compuesto oligomérico antisentido tiene una longitud de entre 10 y 23 nucleobases, tal como 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ó 23 nucleobases.
7. Inhibidor de miR-122 según la reivindicación 5 ó 6, en el que el compuesto oligomérico antisentido que inhibe el ensamblaje de VLDL es un oligonucleótido gápmero que consiste en, o comprende, una secuencia de nucleobases de fórmula 5' A - B - C 3' u, opcionalmente, 5' A-B-C-D 3', en la que: la región A consiste en, o comprende, entre 1 y 5 análogos de nucleótido; la región B comprende 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 nucleobases que, cuando se forman en un dúplex con un ARNm complementario, pueden reclutar ARNasaH, tal como unidad de nucleótido de ADN; la región C consiste en, o comprende, entre 1 y 5 análogos de nucleótido; y cuando está presente, la región D consiste en 1, 2 ó 3 unidades de ADN.
8. Inhibidor de miR-122 según la reivindicación 7, en el que los análogos de nucleótido presentes en las regiones A y C se seleccionan independientemente del grupo que consiste en 2'-O-alquil-unidad de ARN, 2'-OMe-unidad de ARN, 2'-amino-unidad de ADN, 2'-fluoro-unidad de ADN, unidad de ANB, unidad de ANP, unidad de ANH y unidad de ANI.
9. Inhibidor de miR-122 según la reivindicación 7, en el que los análogos de nucleótido presentes en las regiones A y C son todas unidades de ANB.
10. Inhibidor de miR-122 según la reivindicación 5, en el que el inhibidor de ensamblaje de VLDL se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 103.
11. Inhibidor de miR-122 según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el inhibidor de miR-122 y el inhibidor de ensamblaje de VLDL se preparan para el tratamiento de pacientes que pueden ser, o son, resistentes a un tratamiento existente, tal como tratamiento con interferón y/o ribavirina.
12. Inhibidor de miR-122 según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el inhibidor de miR-122 y el inhibidor de ensamblaje de VLDL se preparan para el tratamiento o la prevención de infección por VHC.
13. Inhibidor de miR-122 según la reivindicación 12, en el que el inhibidor adicional de ensamblaje de VLDL es un compuesto oligomérico antisentido que comprende una secuencia de nucleobases que es complementaria a una región correspondiente del ARNm de apoB-100.
14. Inhibidor de miR-122 según la reivindicación 12, en el que el inhibidor adicional de ensamblaje de VLDL es una estatina.

15. Inhibidor de miR-122 según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el inhibidor de miR-122 y el inhibidor de ensamblaje de VLDL se preparan para la prevención de reinfección postrasplante en pacientes con VHC.

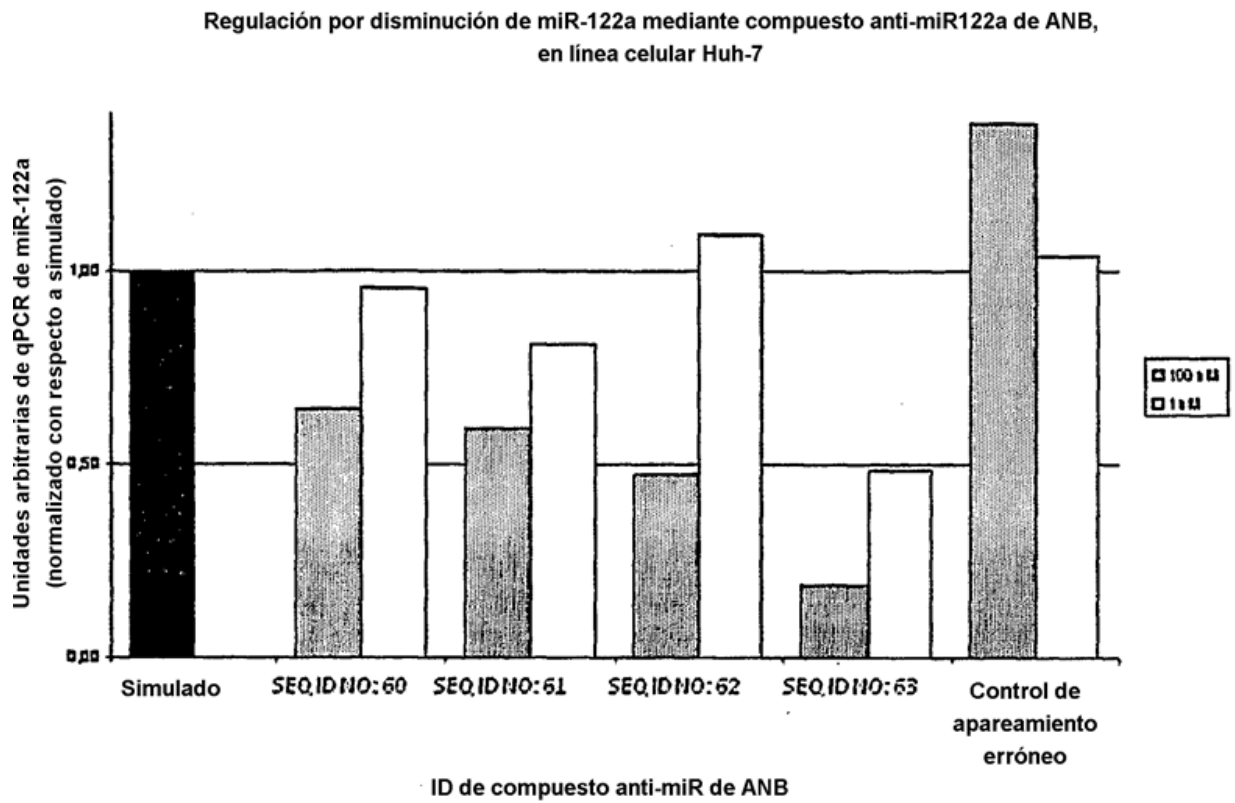


Figura 1

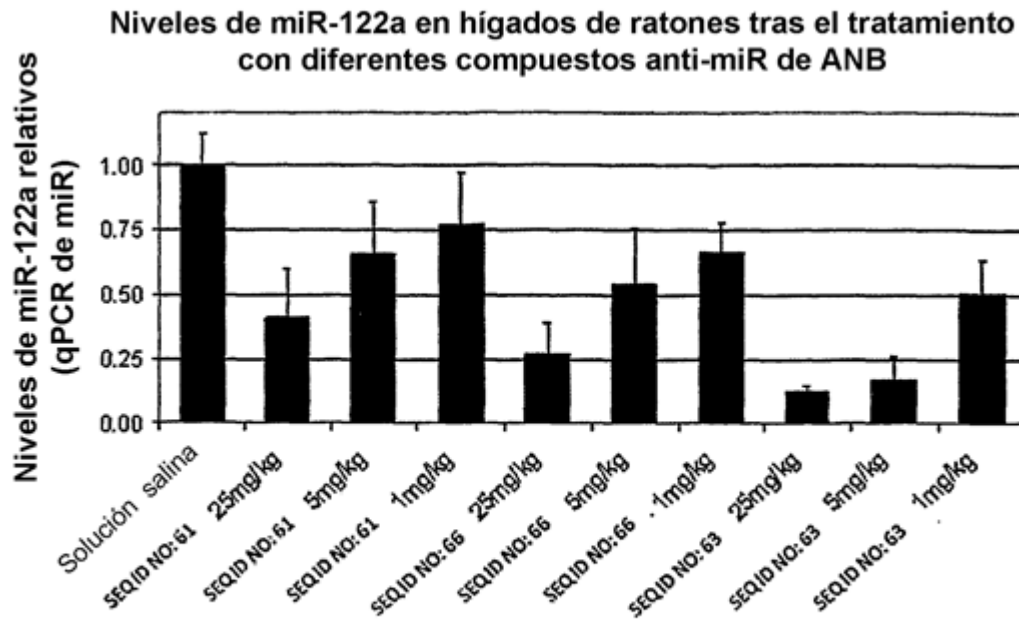


Figura 2a.

Inhibición de miR-122 mediante compuesto anti-miR de ANB *in vivo*, en hígado de ratón (tres dosis i.p. (indicado) en C57/BL6 cada dos días y sacrificio 48 h tras la última dosis, PD-06-042/-050, miR-06-014/-026, media y D.E., n = 8)

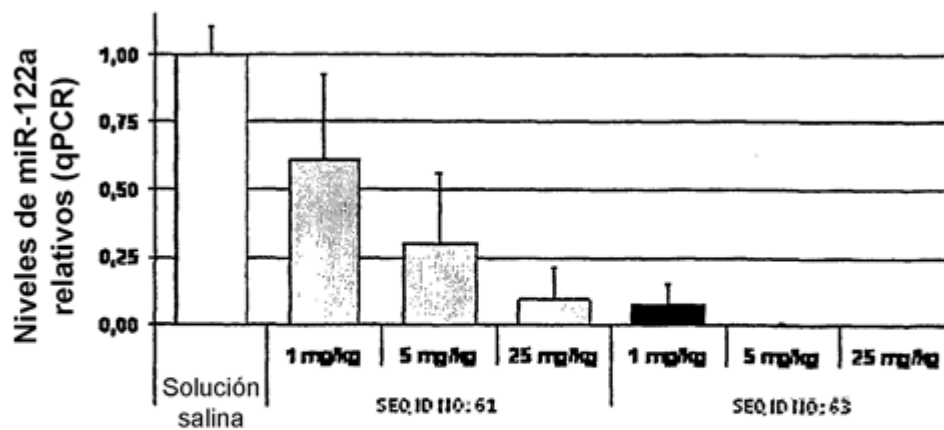
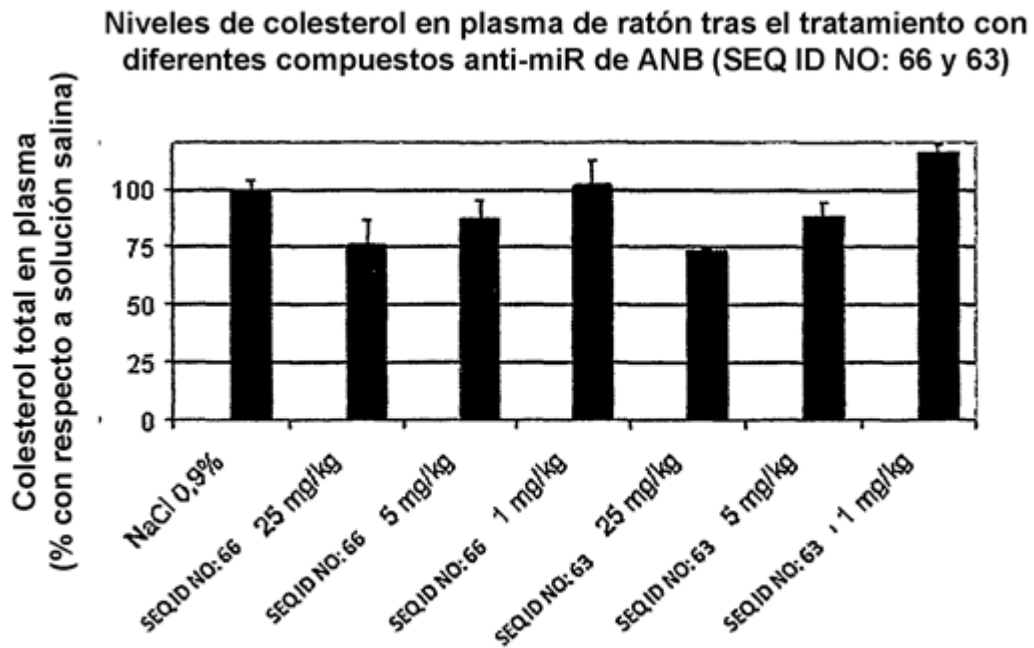


Figura 2b.



Colesterol en plasma total en ratones tratados con compuesto anti-miR de ANB
(Tres dosis i.p. (indicado) en C57/BL6 cada dos días y sacrificio 48 h tras la última dosis, PD-06-042/-050, miR-06-014/-026, media y D.E., n = 8, col. tot. medio en grupo con solución salina: 78 mg/ml)

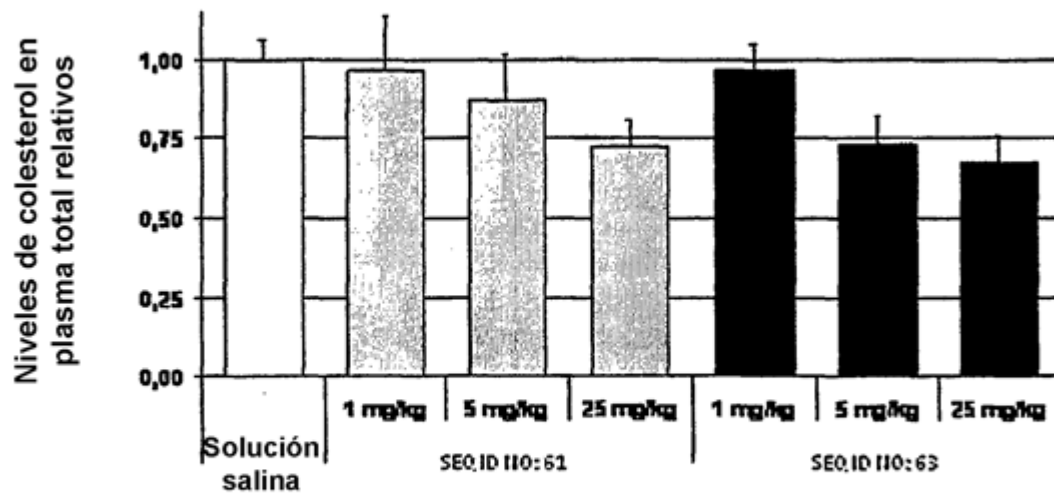


Figura 3 (A y B)

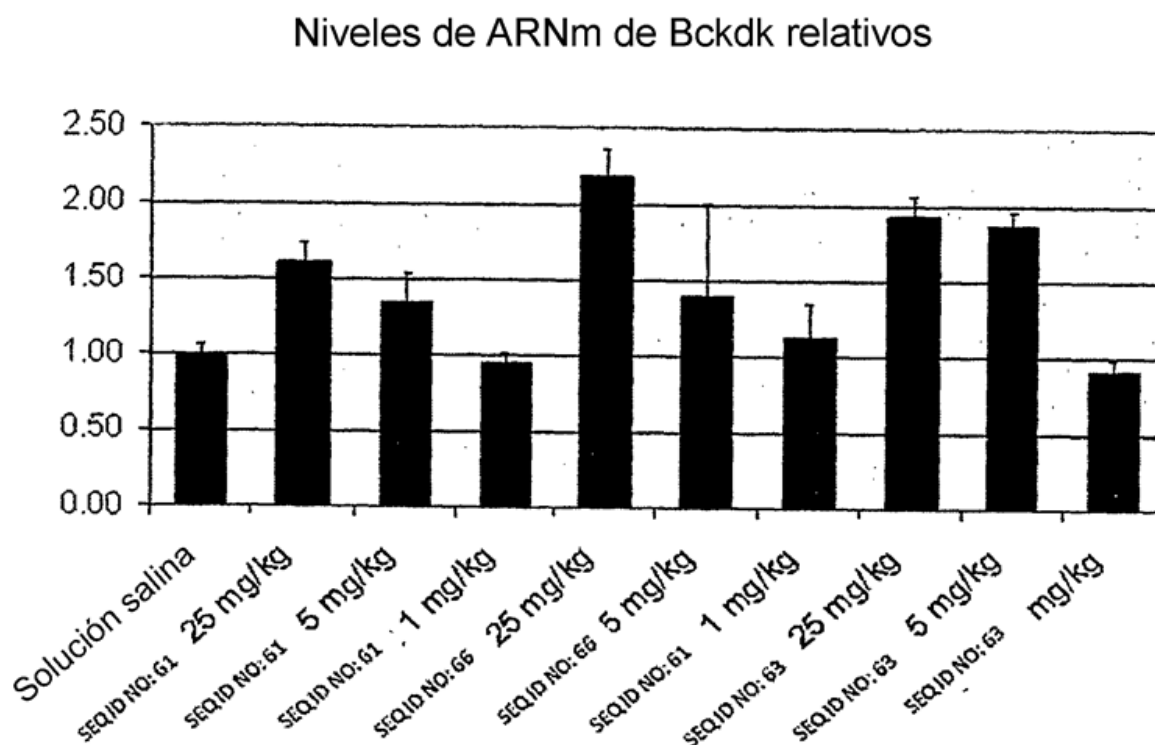


Figura 4a

Niveles de ARNm de AldoA relativos

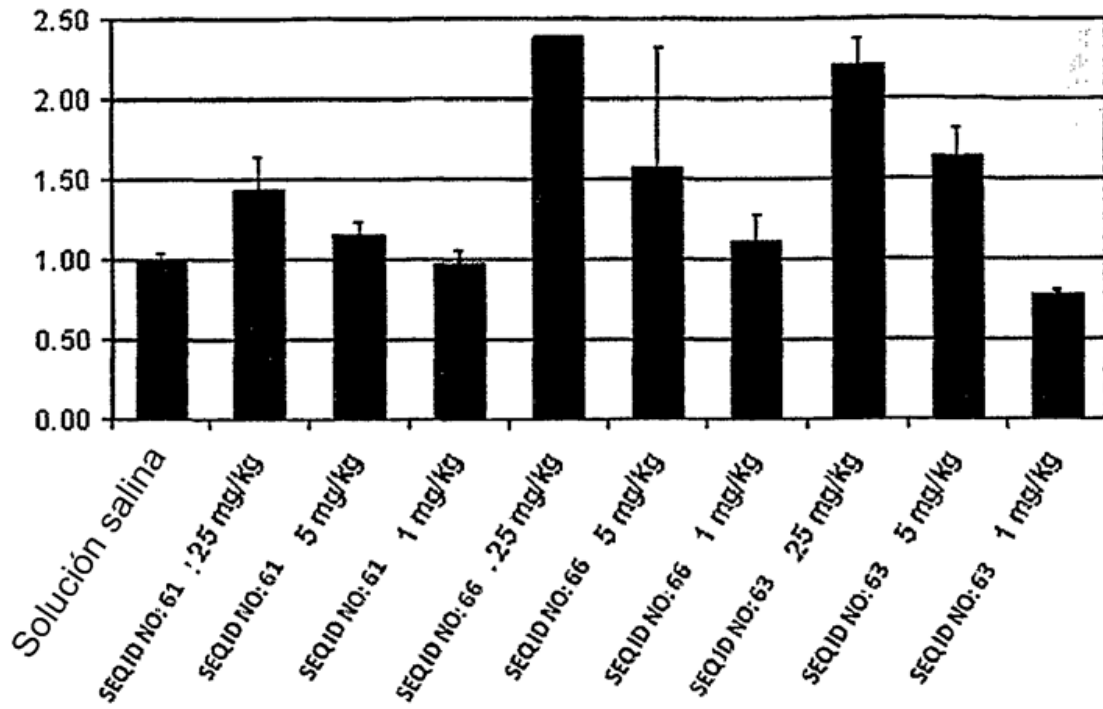


Figura 4b

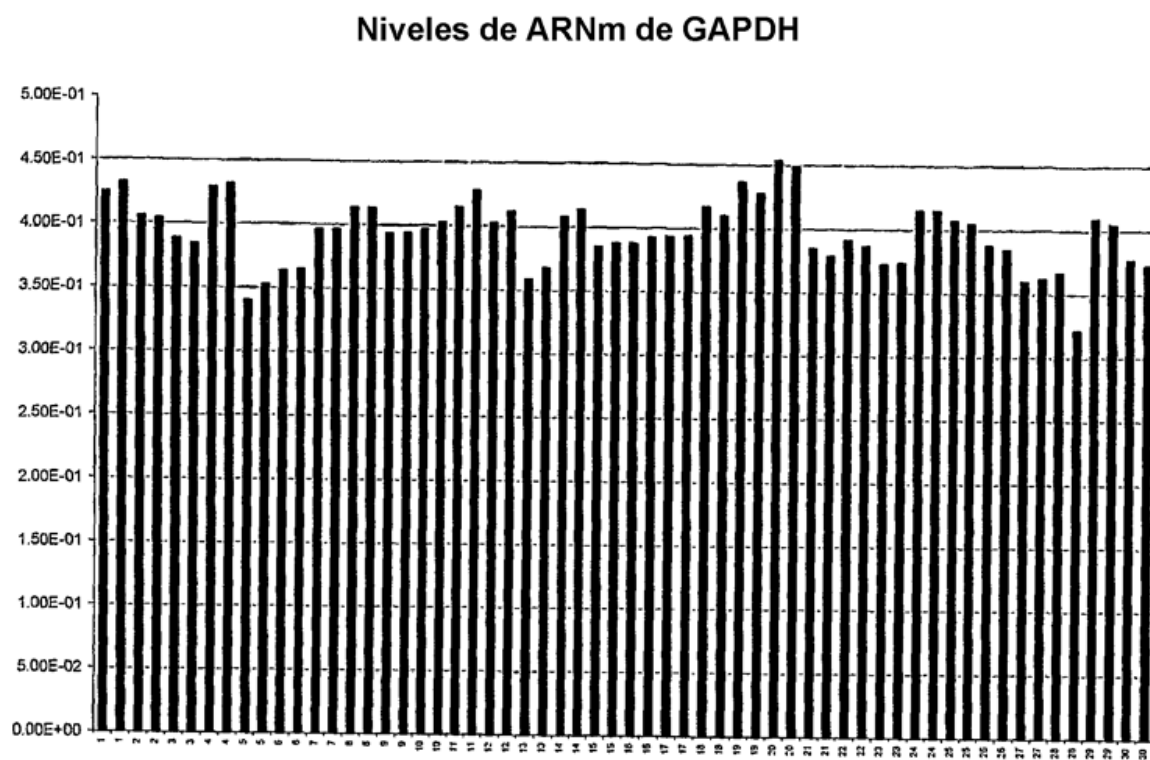
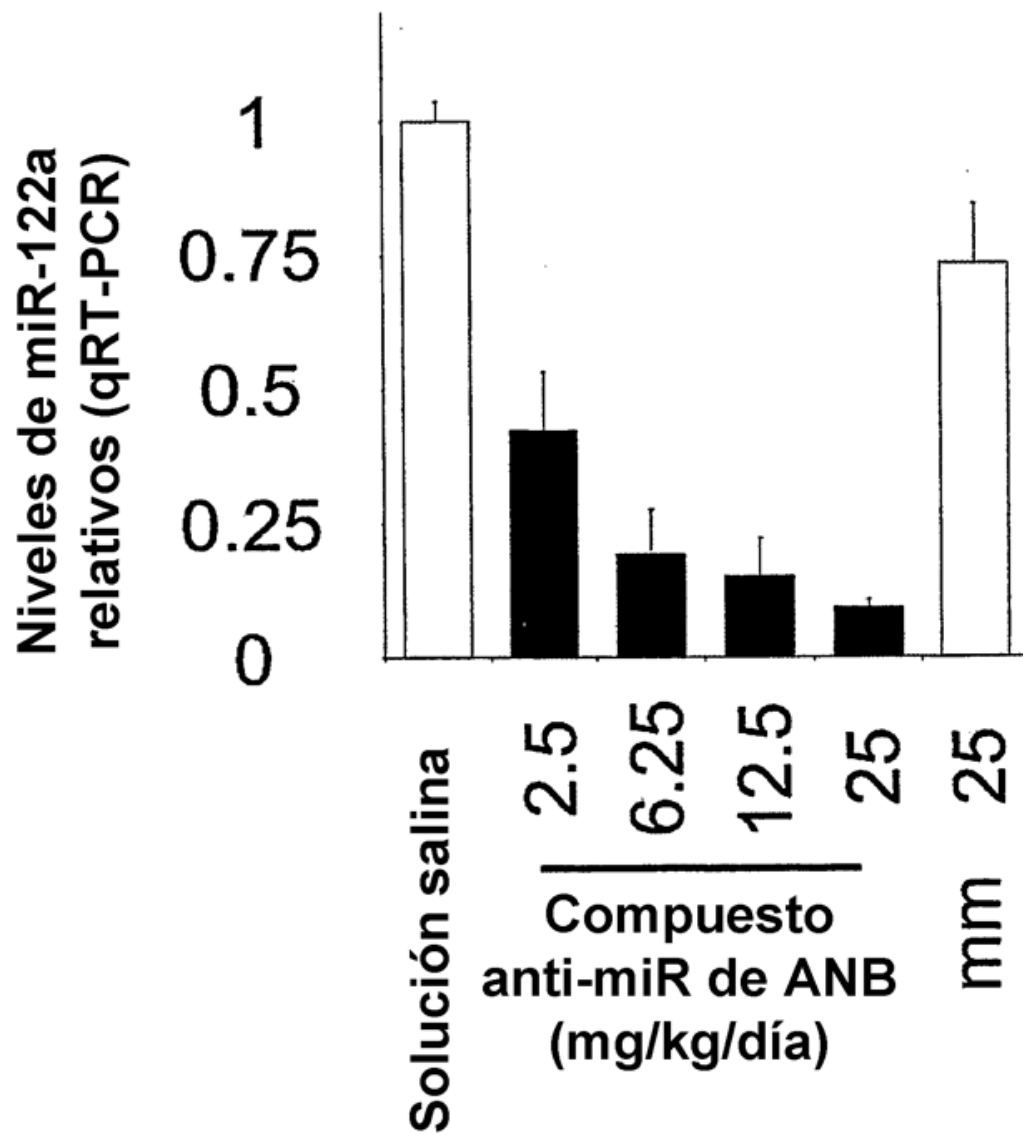


Figura 4c

**Figura 5**

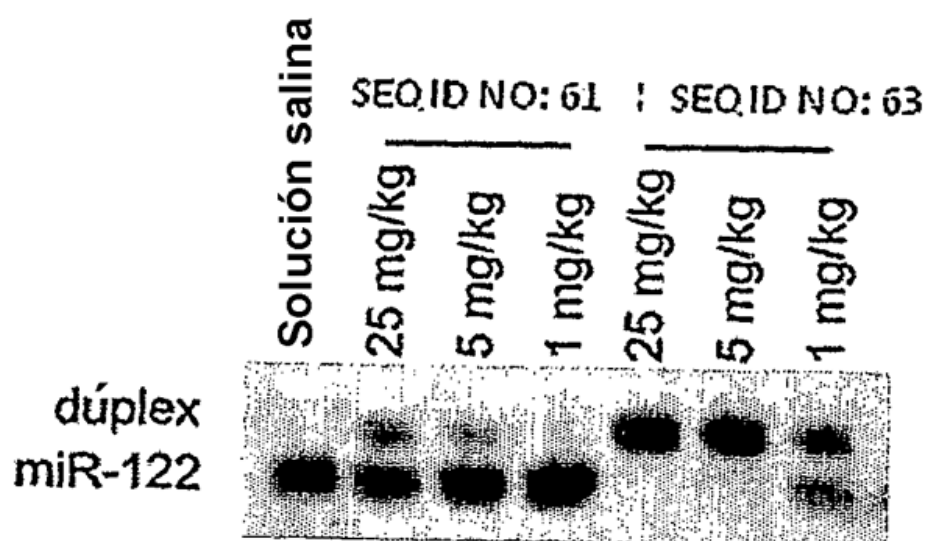


Figura 6

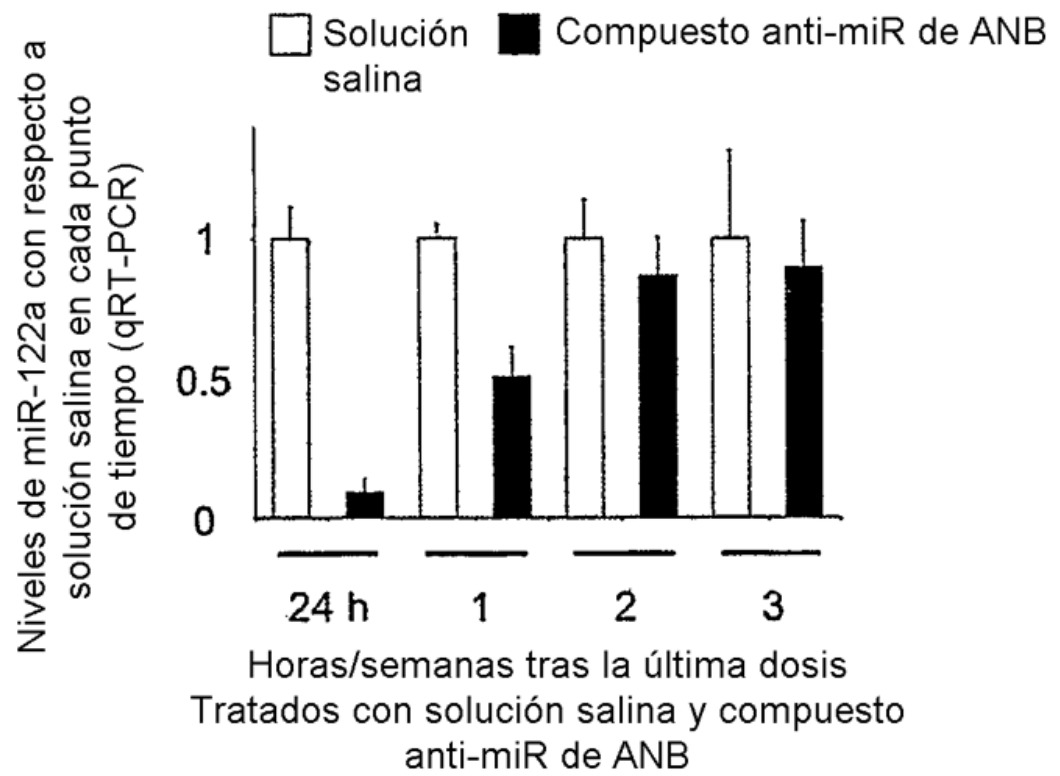
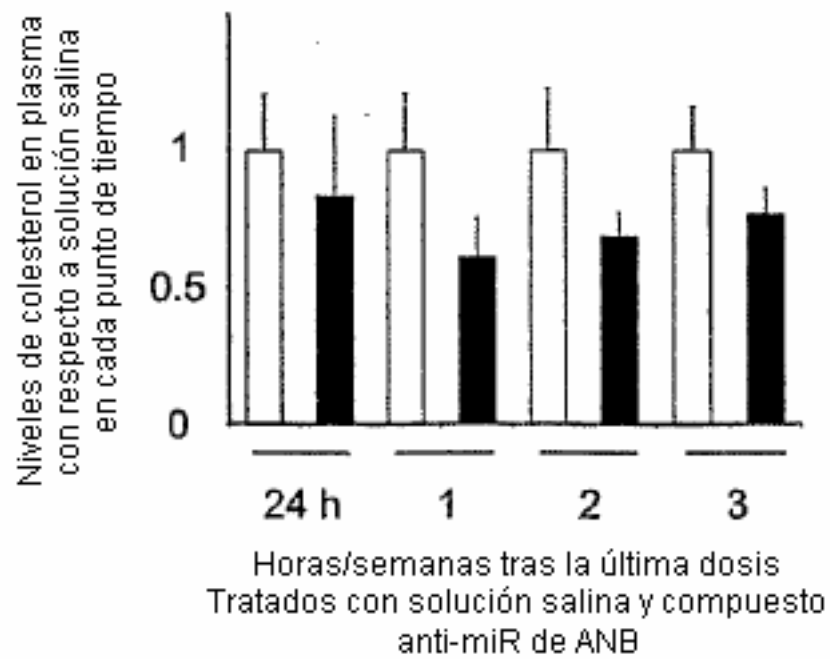


Figura 7

**Figura 8**

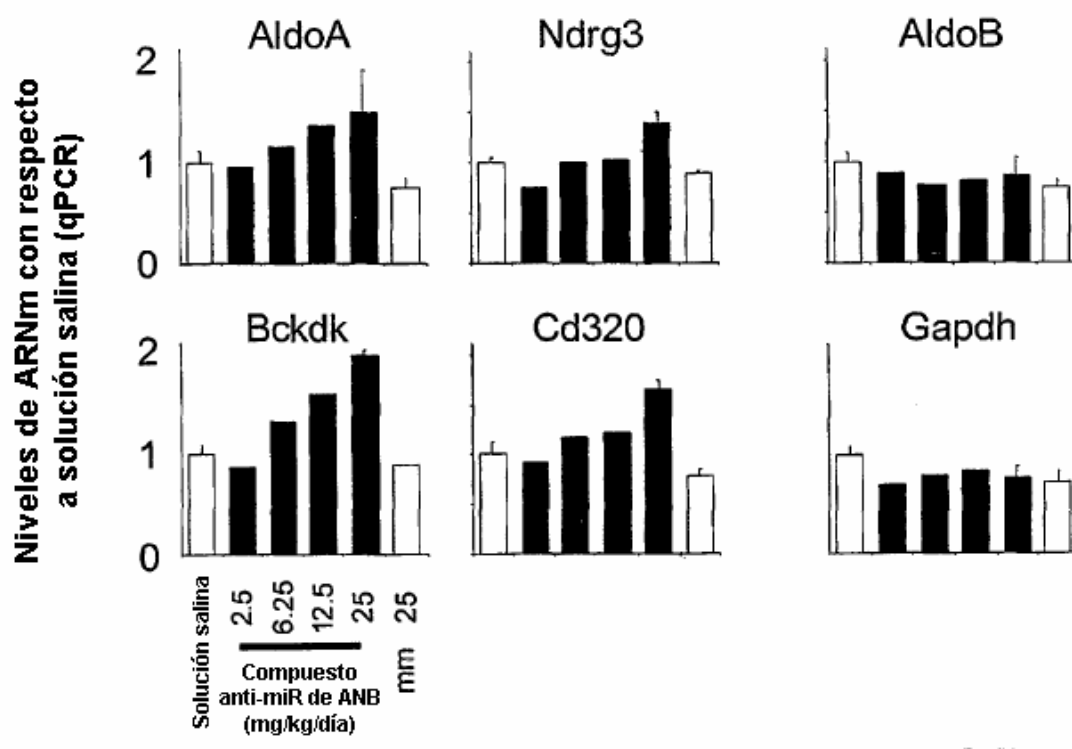
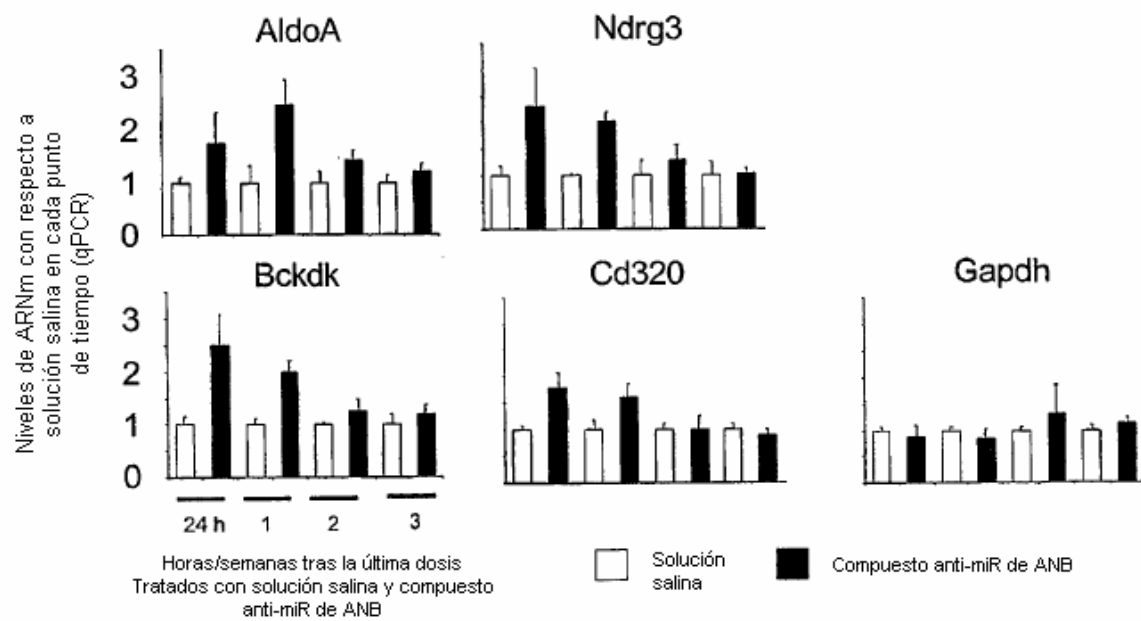


Figura 9

**Figura 10**

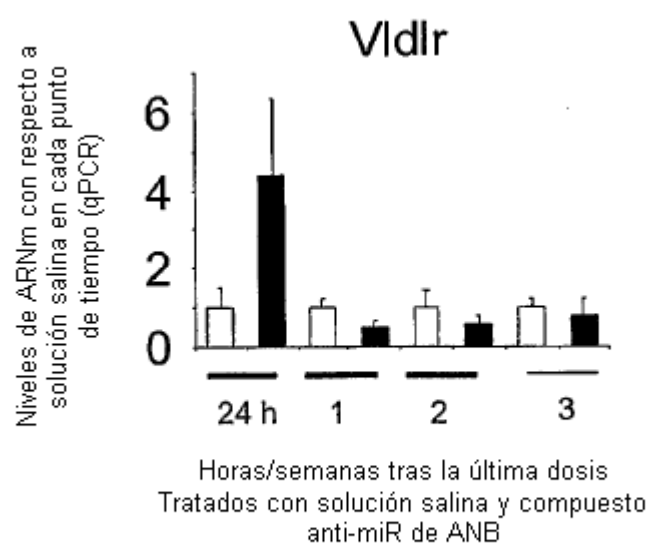


Figura 11

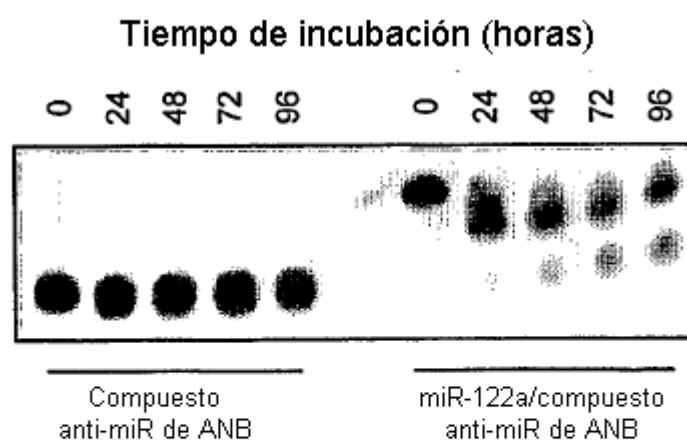


Figura 12

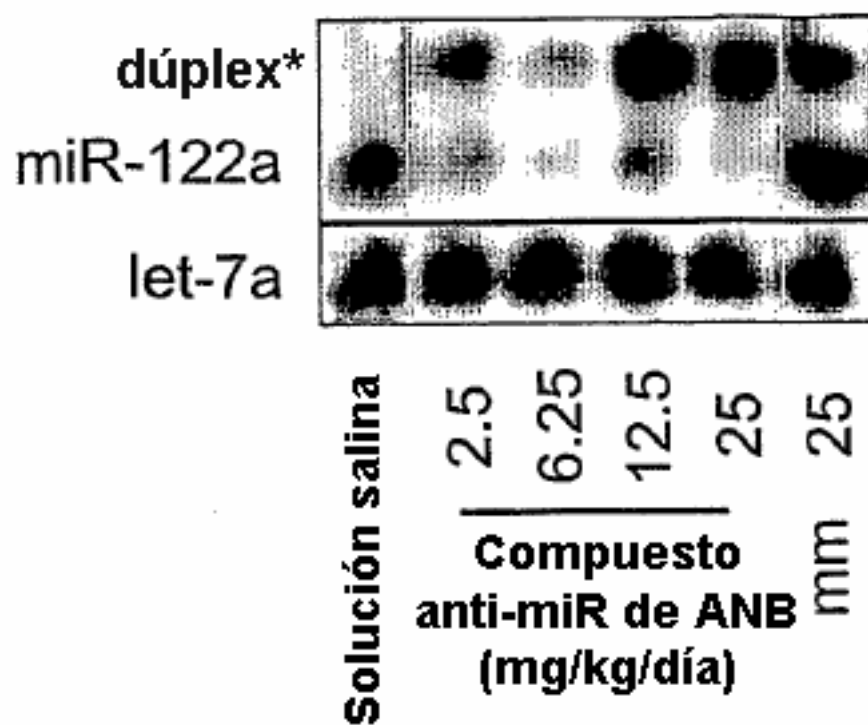


Figura 13

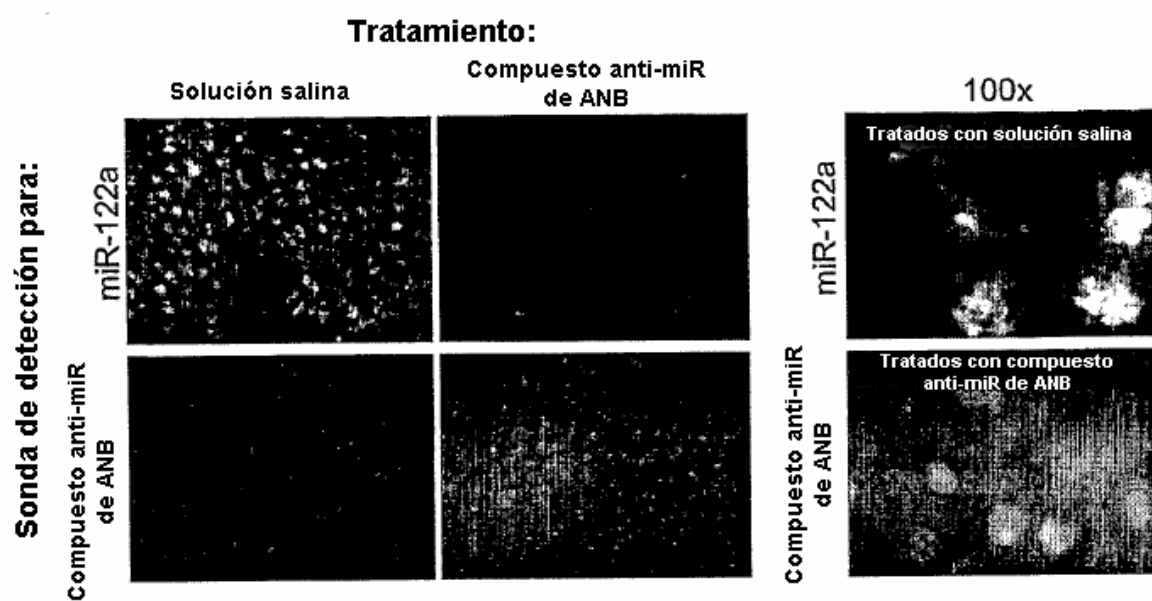


Figura 14

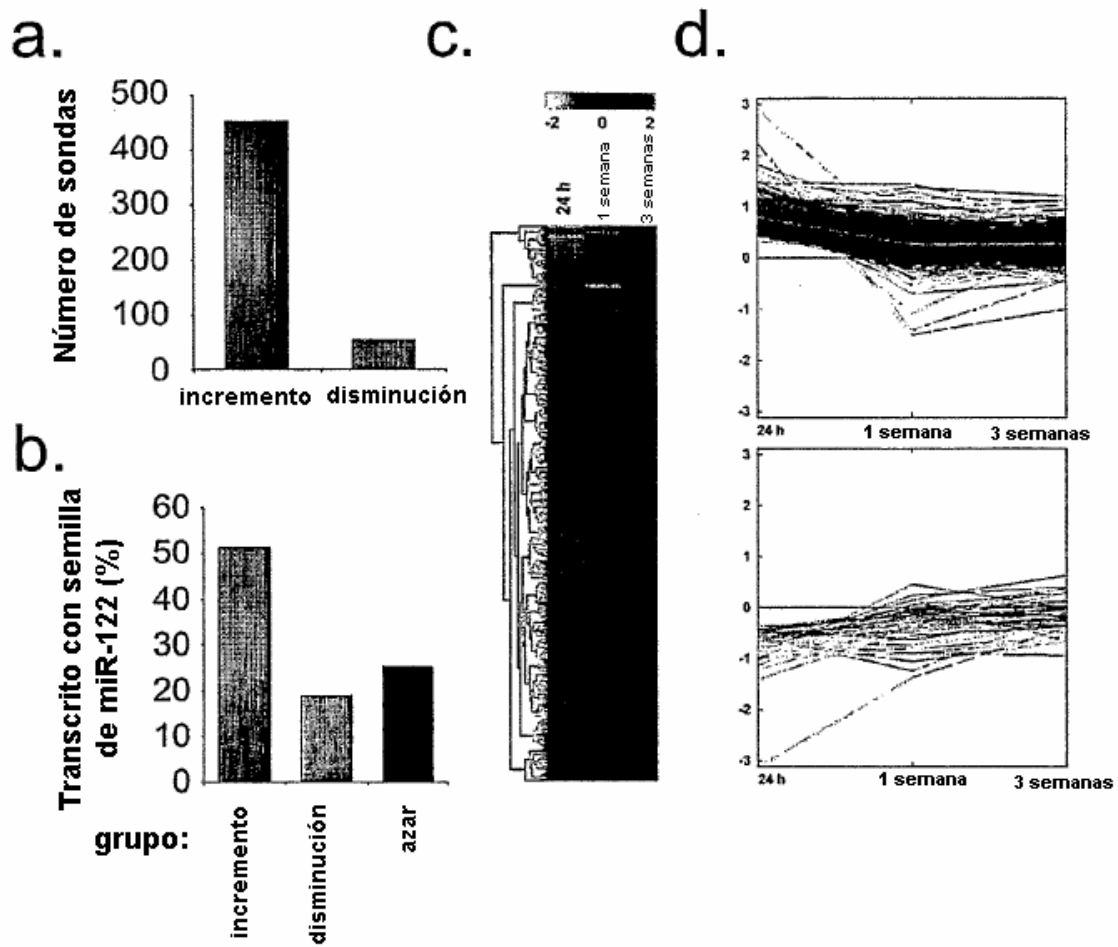


Figura 15

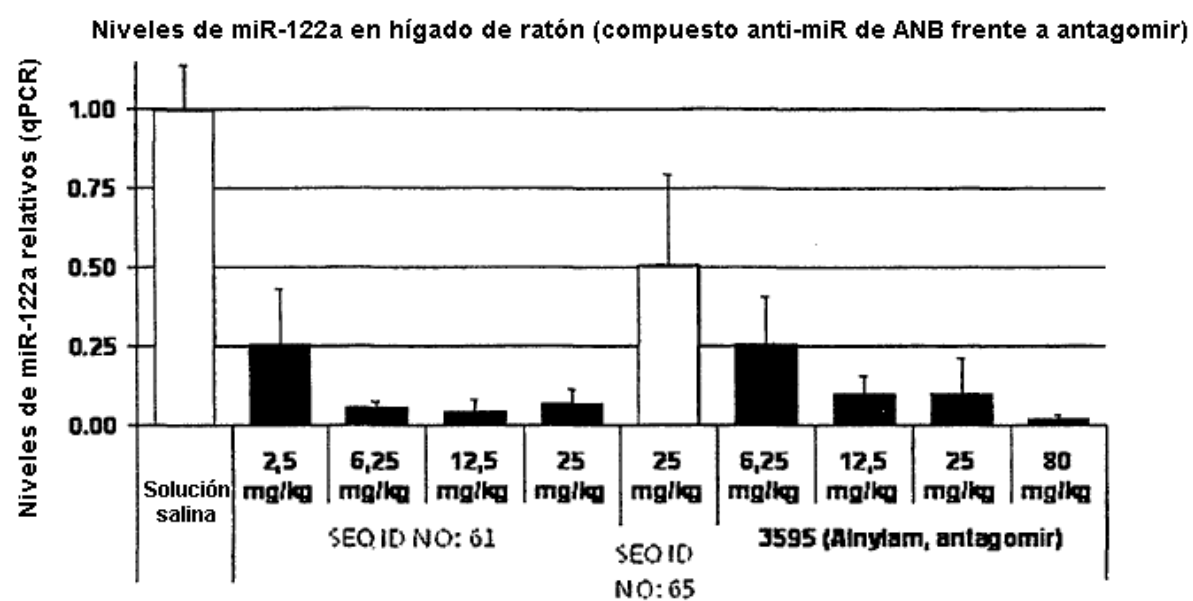
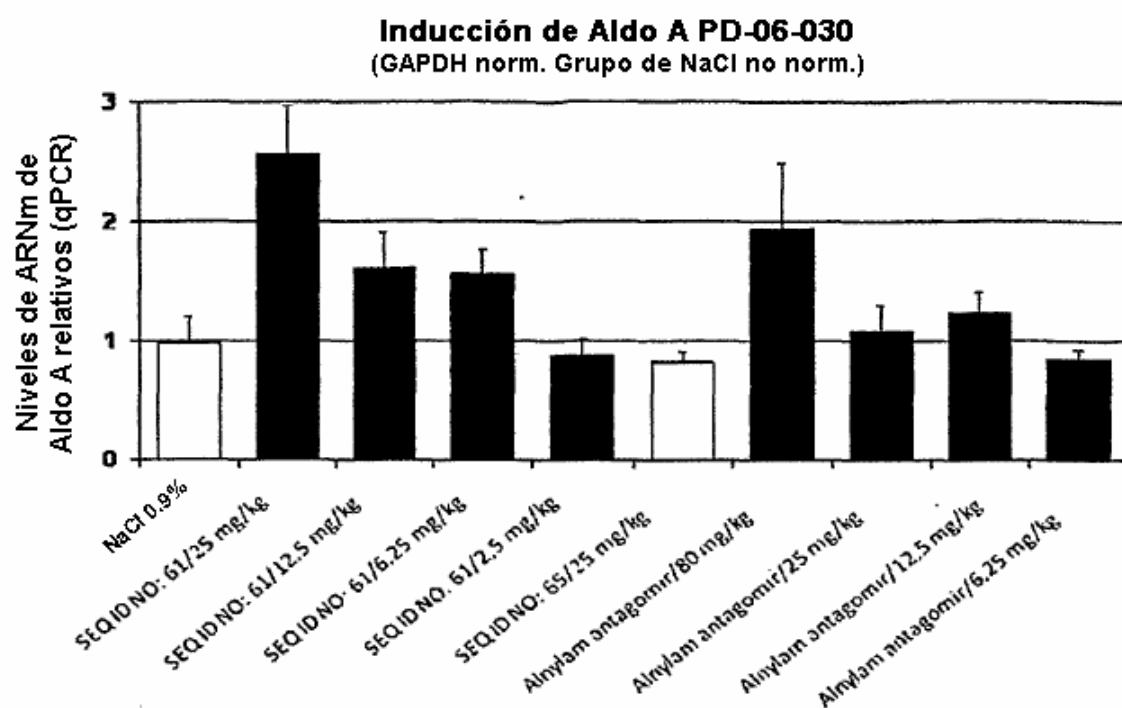
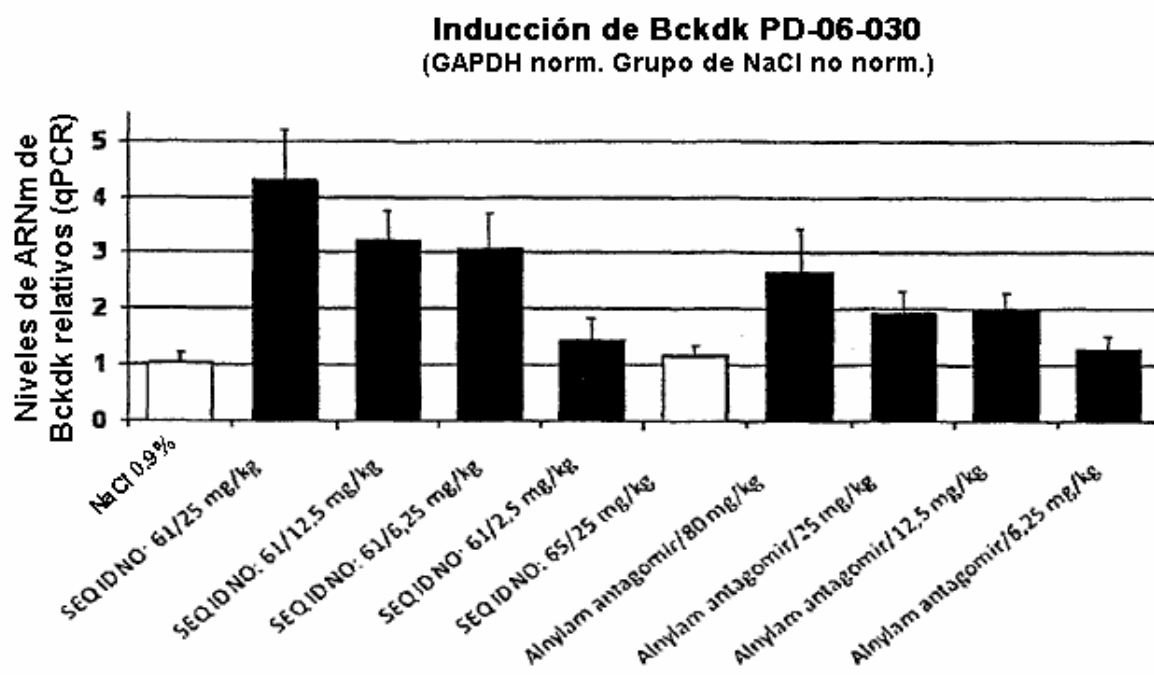


Figura 16

**Figura 17**

**Figura 18**

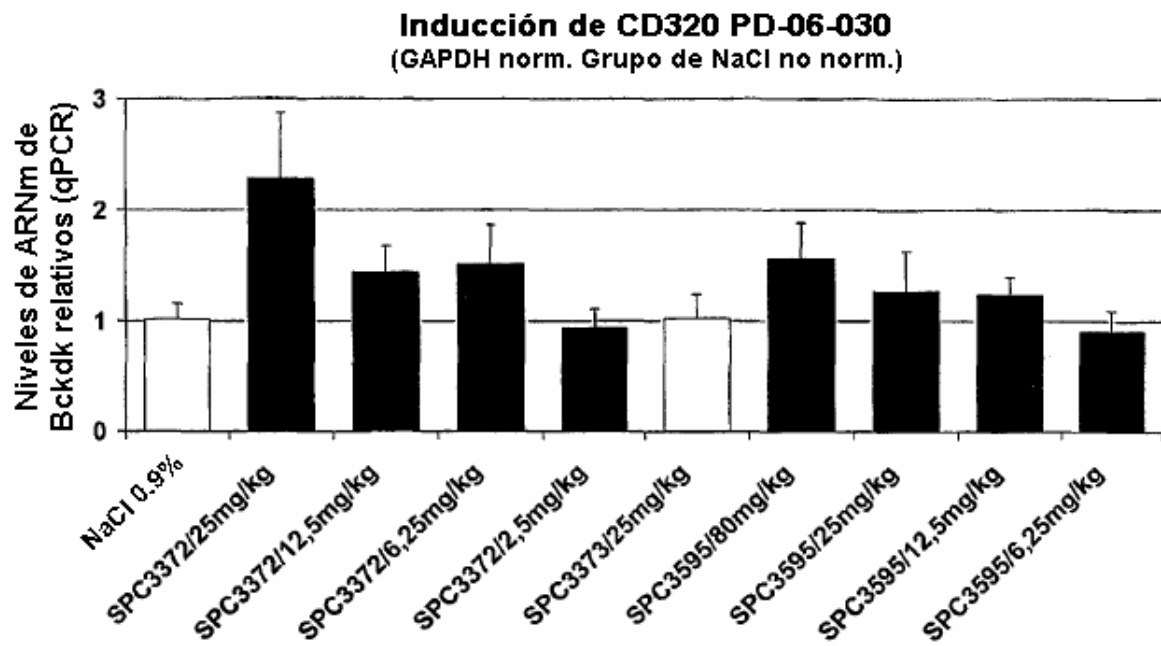
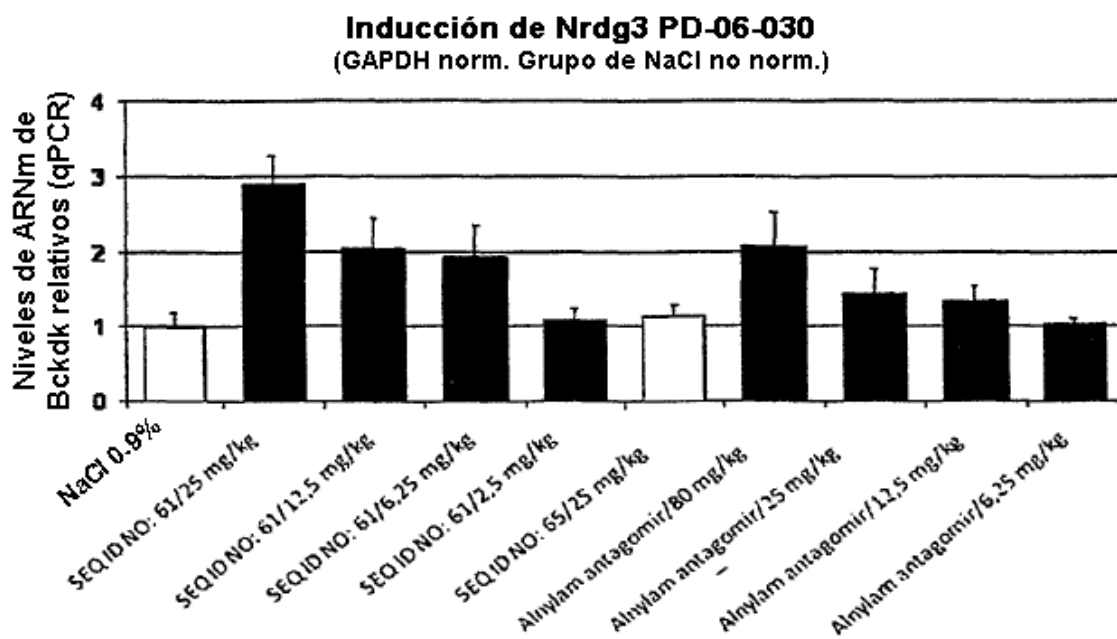


Figura 19

**Figura 20**

Niveles de colesterol en plasma total a lo largo del tiempo en ratones con obesidad inducida por la dieta tratados con compuesto anti-miR de ANB contra miR-122

(SEQ ID NO: 63, control de apareamiento erróneo PD-06-053/miR-06-036/IB-06-203, media y D.E.
(sólo NaCl y SEQ ID No: 63), n=10 para inducido por dieta, n=5 para dieta normal)

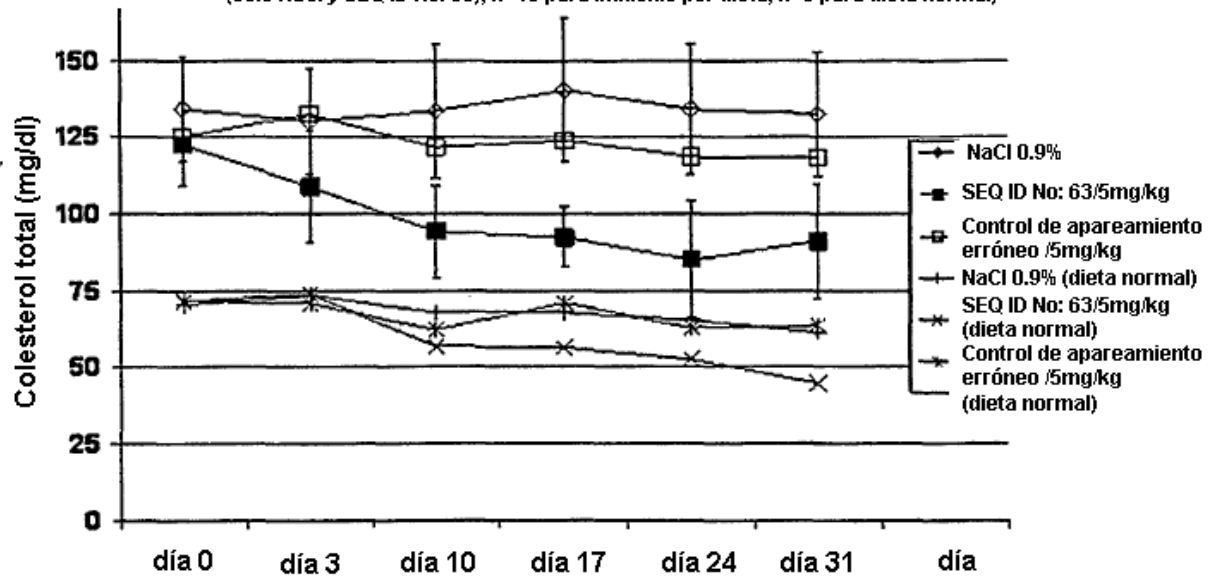
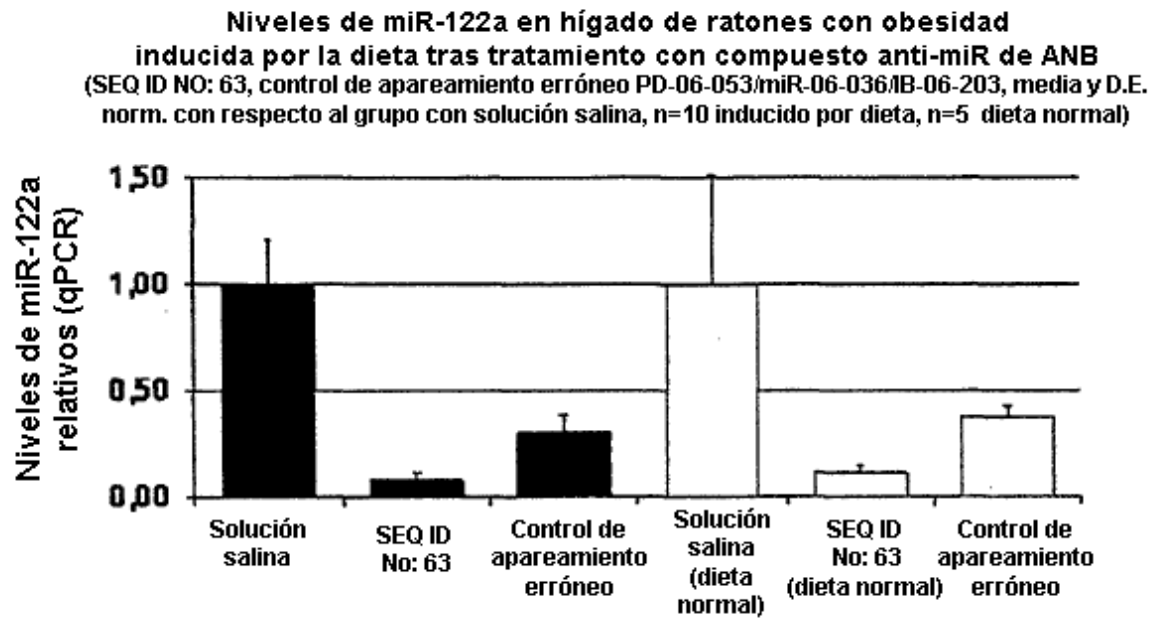


Figura 21

**Figura 22**

La expresión del ARNm de aldolasa A en hígado de ratones con obesidad inducida por la dieta tras tratamiento con compuesto anti-miR de ANB (SEQ ID NO: 63, control de apareamiento erróneo PD-06-053/miR-06-036/IB-06-203, media y D.E. norm. con respecto al grupo con solución salina, n=10 inducido por dieta, n=5 dieta normal)

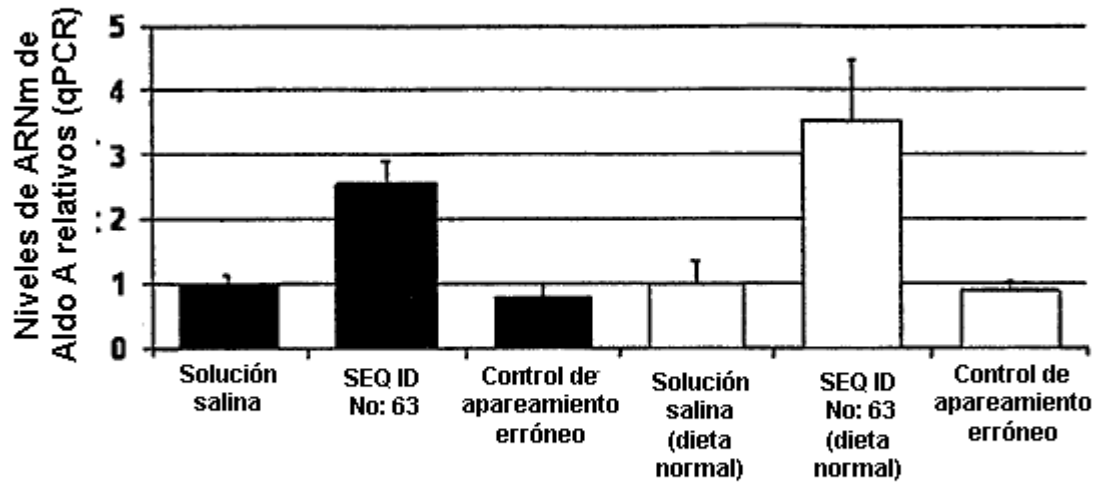


Figura 23

La expresión del ARNm de Bckdk en hígado de ratones con obesidad inducida por la dieta tras tratamiento con compuesto anti-miR de ANB
(SEQ ID NO: 63, control de apareamiento erróneo PD-06-053/miR-06-036/IB-06-203, media y D.E. norm. con respecto al grupo con solución salina, n=10 inducido por dieta, n=5 dieta normal)

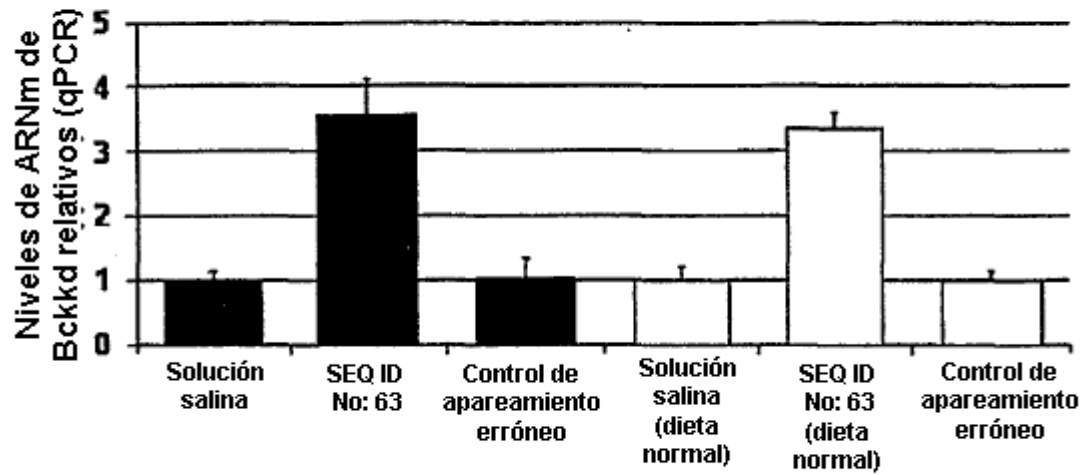
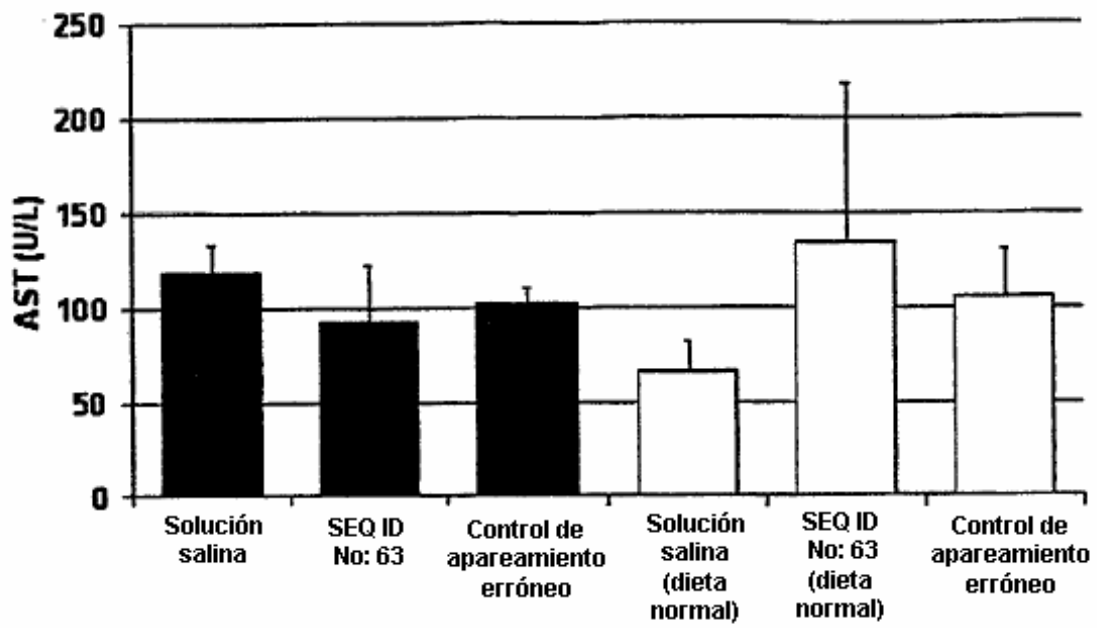
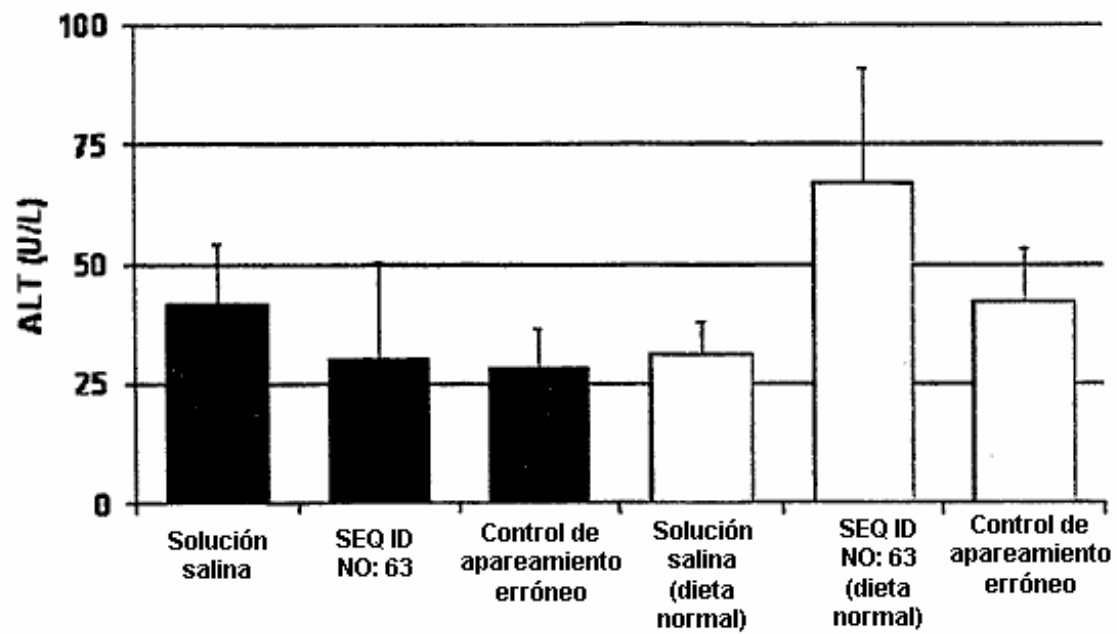
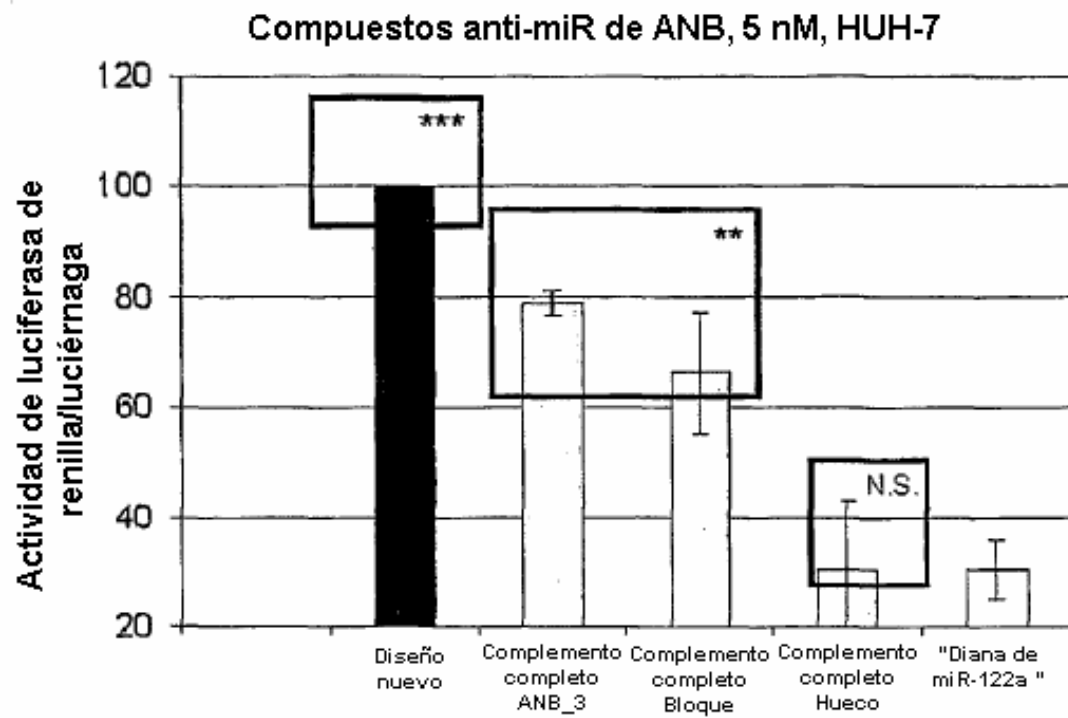


Figura 24

**Figura 25**

**Figura 26**

**Figura 27**

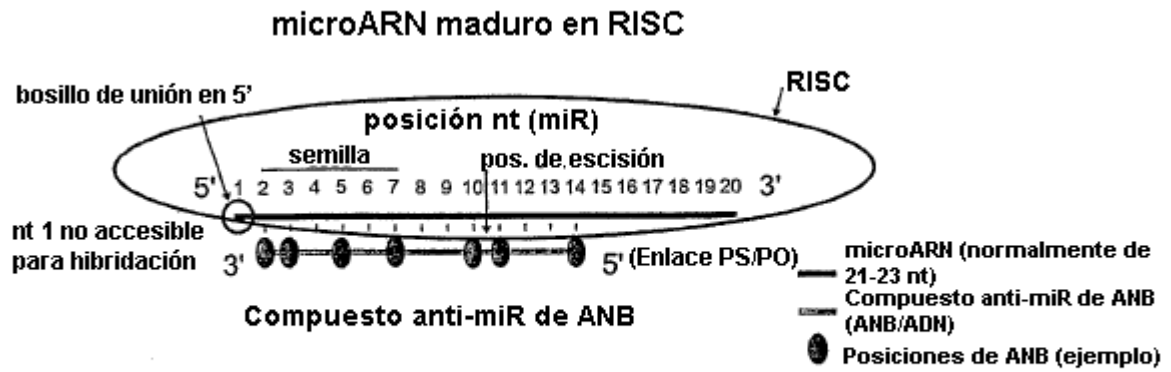
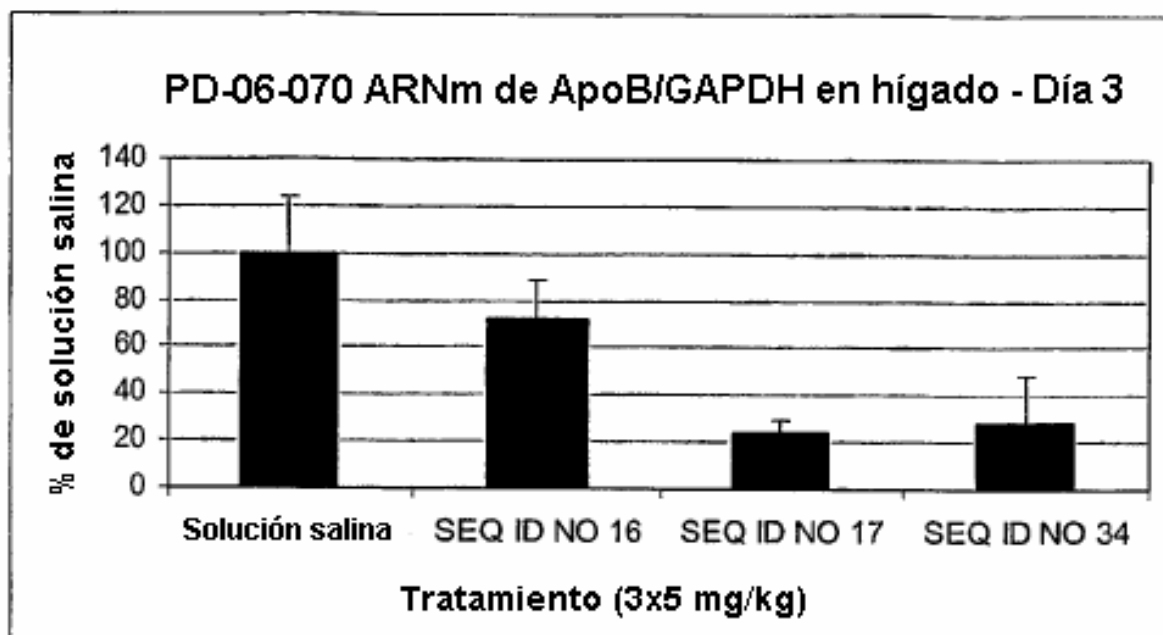
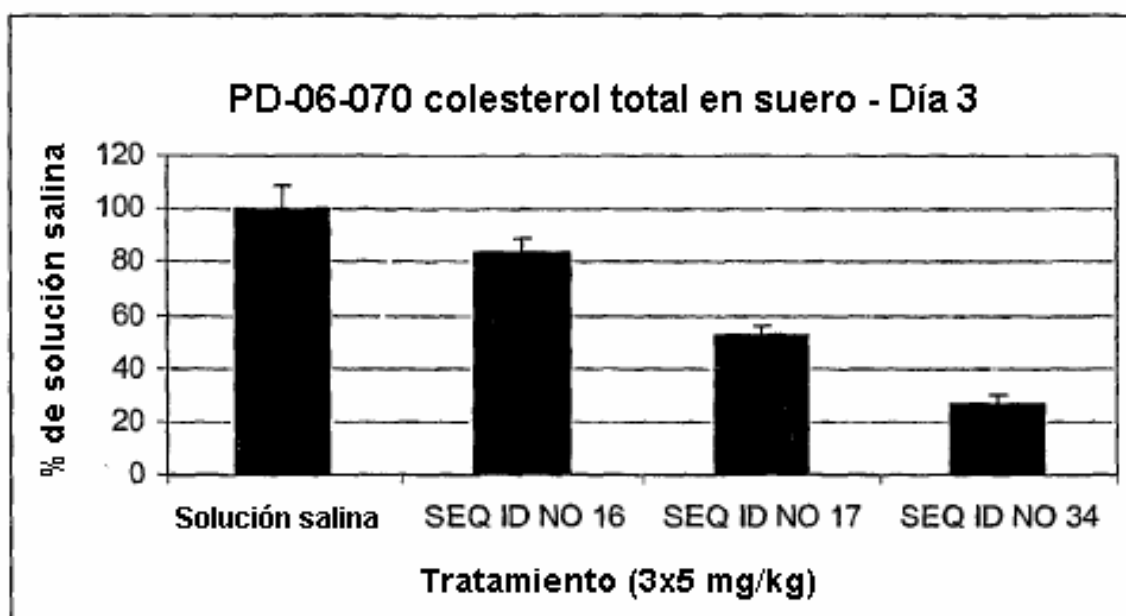


Figura 28

**Figura 29**

**Figura 30**

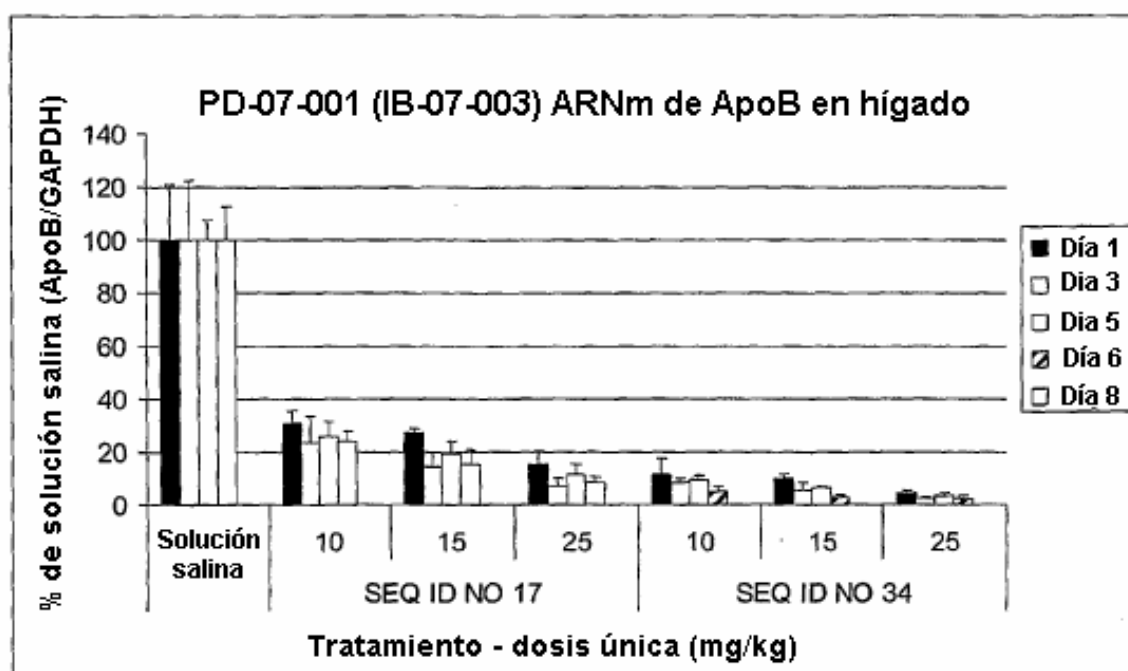


Figura 31

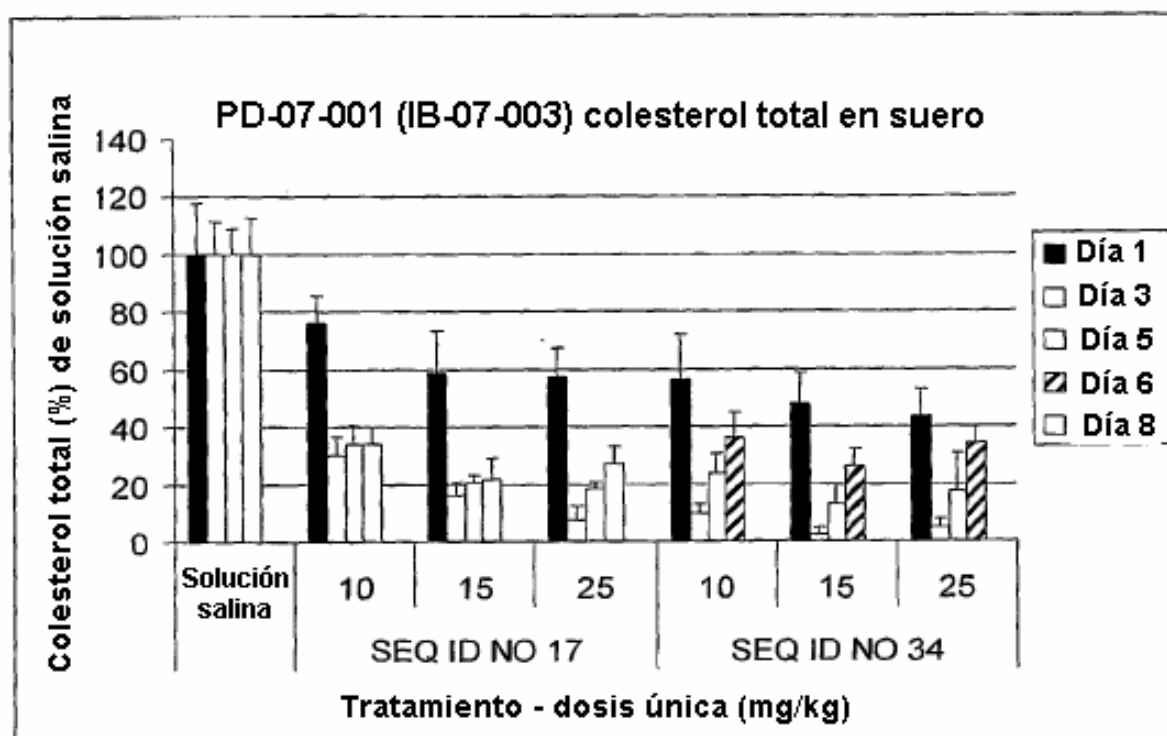


Figura 32

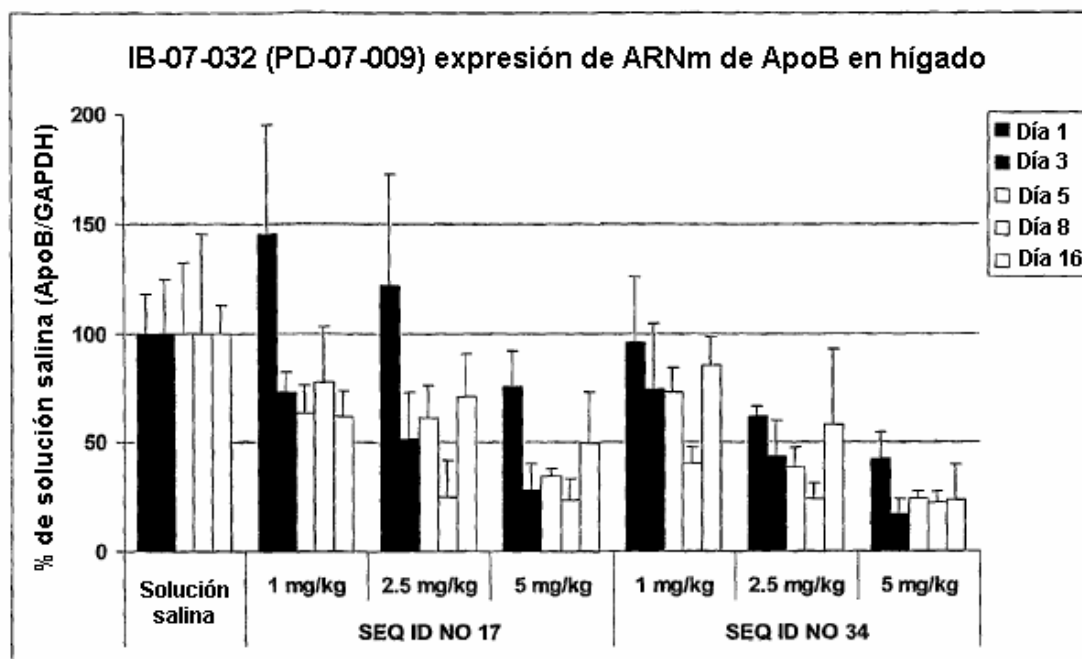


Figura 33

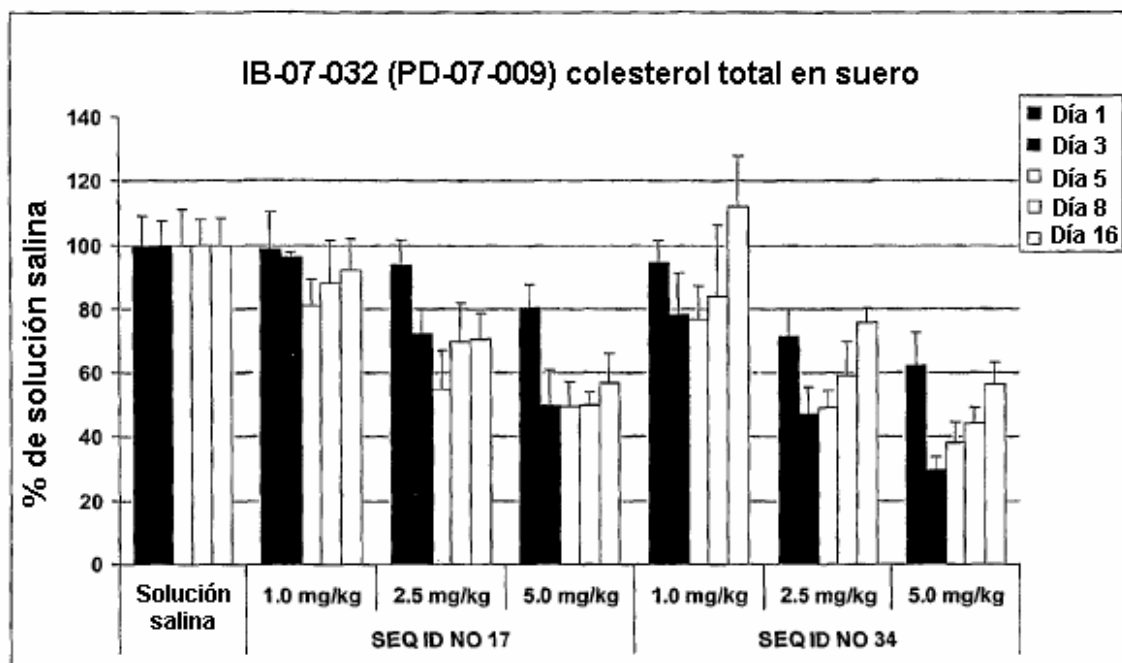
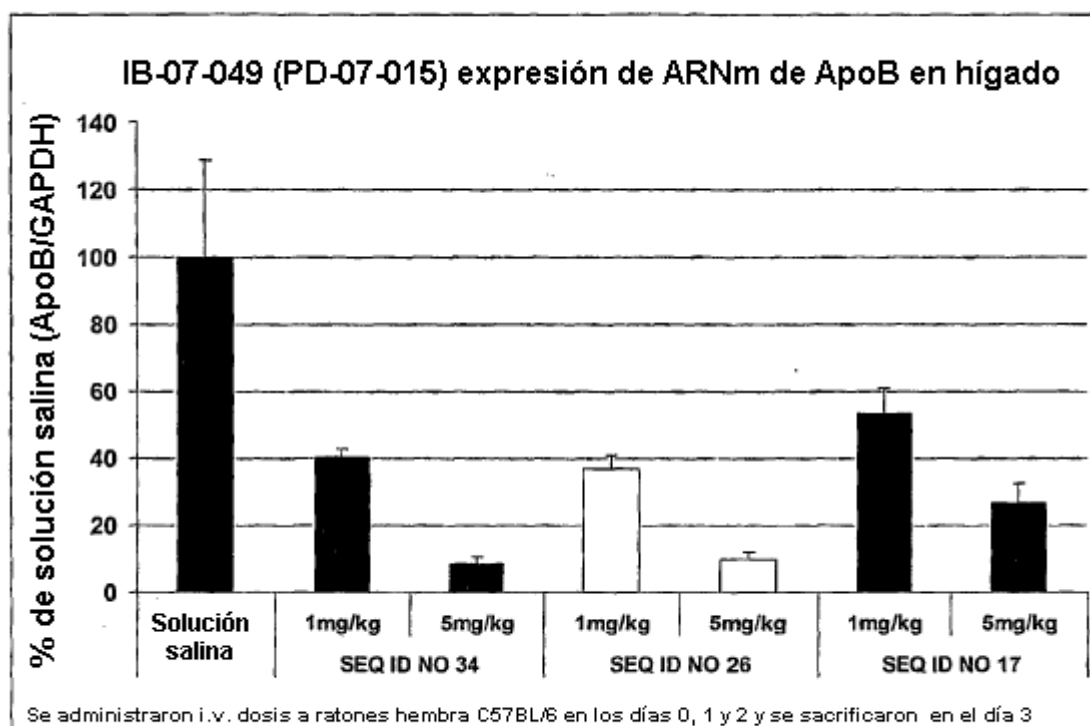
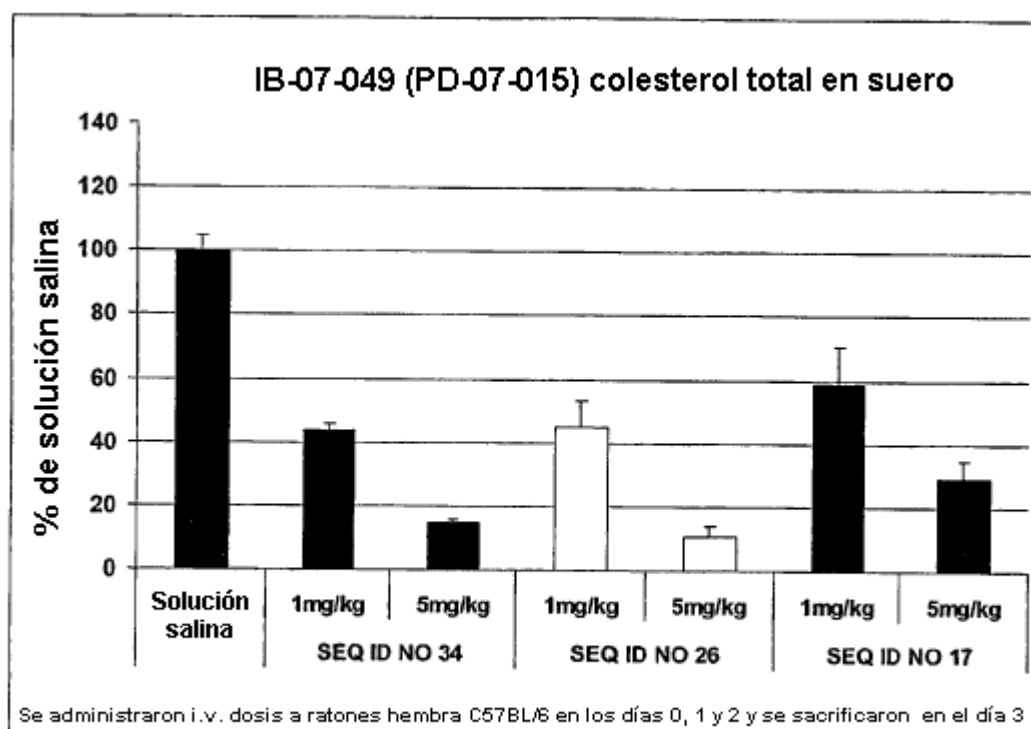


Figura 34

**Figura 35**

**Figura 36**