

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 558**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/712** (2006.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

**A61P 3/06** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

**A61P 31/14** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2007 E 10173208 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2261333**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende oligonucleótidos antisentido anti-ARNmi**

30 Prioridad:

**03.04.2006 DK 200600478**

**03.04.2006 US 788995 P**

**01.05.2006 DK 200600615**

**01.05.2006 US 796813 P**

**18.08.2006 US 838710 P**

**30.10.2006 DK 200601401**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.05.2016**

73 Titular/es:

**ROCHE INNOVATION CENTER COPENHAGEN**

**A/S (100.0%)**

**Fremtidsvej 3**

**2970 Hørsholm, DK**

72 Inventor/es:

**ELMÉN, JOACIM;**

**KEARNEY, PHIL y**

**KAUPPINEN, SAKARI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 569 558 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

Composición farmacéutica que comprende oligonucleótidos antisentido anti-ARNmi

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden oligonucleótidos de cadena sencilla que contienen ANB capaces de inhibir microARN inductores de enfermedad, en particular el microARN humano miR-122A.

10

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

MicroARN: nuevos reguladores de la expresión génica

15 Los microARN (ARNmi) son una clase abundante de ARN endógenos cortos que actúan como reguladores post-transcripcionales de la expresión génica mediante apareamiento de bases con sus ARNm diana. Los ARNmi maduros se procesan secuencialmente a partir de transcritos en horquilla más largos por parte de las ribonucleasas ARNasa III Drosha (Lee et al., 2003) y Dicer (Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001). Actualmente se han  
20 identificado más de 3.400 ARNmi en vertebrados, invertebrados y plantas según la base de datos de microARN miRBase versión 7.1, de octubre de 2005 (Griffith-Jones, 2004; Griffith-Jones et al., 2006), y también se han identificado muchos ARNmi que corresponden a genes putativos.

25

La mayoría de los ARNmi de animales reconocen sus sitios diana situados en RNT-3' mediante apareamiento de bases incompleto, resultando en la represión traduccional de los genes diana (Bartel, 2004). Un cuerpo de investigación creciente demuestra que los ARNmi de animales desempeñan papeles biológicos fundamentales en el crecimiento y apoptosis celulares (Brennecke et al., 2003, la diferenciación del linaje hematopoyético (Chen et al., 2004), la regulación de la duración de vida (Boehm y Slack, 2005), la diferenciación de fotorreceptores (Li y Carthew, 2005), la regulación génica de la caja homeo (Yekta et al., 2004, Hornstein et al., 2005), la asimetría neuronal (Johnston et al., 2004), la secreción de insulina (Poy et al., 2004), la morfogénesis cerebral (Giraldez et al., 2005), la proliferación y diferenciación muscular (Chen, Mandel et al., 2005; Kwon et al., 2005; Sokol y Ambros, 2005), la cardiogénesis (Zhao et al., 2005) y el desarrollo embrionario tardío en los vertebrados (Wienholds et al., 2005).

30

Los microARN en las enfermedades humanas

35 Los ARNmi participan en una amplia diversidad de enfermedades humanas. Una es la atrofia muscular espinal (AME), una enfermedad neurodegenerativa pediátrica causada por niveles proteicos reducidos o mutaciones de pérdida de función del gen de supervivencia de las neuronas motoras (SNM) (Paushkin et al., 2002). Una mutación en el sitio diana de miR-189 en el gen SLITRK1 humano se ha demostrado recientemente que se asocia al síndrome de Tourette (Abelson et al., 2005), mientras que otro estudio reciente informa de que el genoma de ARN del virus de la hepatitis C (VHC) interactúa con un microARN de la célula huésped, miR-122a específico del hígado, facilitando  
40 su replicación en el huésped (Jopling et al., 2005). Entre otras enfermedades en las que se han implicado ARNmi o su maquinaria de procesamiento se incluyen el retardo mental del cromosoma X frágil (RMXF), causado por la ausencia de la proteína de retardo mental del cromosoma X frágil (PRMF) (Nelson et al., 2003; Jin et al., 2004) y el síndrome de DiGeorge (Landthaler et al., 2004).

45

Además, se ha informado de patrones de expresión de ARNmi alterados en muchos cánceres humanos. Por ejemplo, los genes de ARNmi humano miR15a y miR16-1 se encuentran deletados o regulados negativamente en la mayoría de casos de leucemia linfocítica crónica (LLC) de células B, en la que recientemente se ha demostrado que una firma única de 13 genes de ARNmi se asocia al pronóstico y progresión (Calin et al., 2002; Calin et al., 2005). El papel de los ARNmi en el cáncer se ha visto adicionalmente corroborado por el hecho de que más de 50% de los genes de ARNmi humanos se encuentran situados en regiones genómicas asociadas a cáncer o en sitios frágiles (Calin et al., 2004). Recientemente, el análisis sistemático de la expresión de una diversidad de cánceres humanos ha revelado una regulación negativa general de los ARNmi en los tumores en comparación con tejidos normales (Lu et al., 2005). Resulta interesante que la clasificación basada en los ARNmi de tumores pobremente diferenciados tuvo éxito, mientras que los perfiles de ARNm son muy inexactos al aplicarlos a las mismas muestras. También se ha demostrado que los ARNmi se encuentran desregulados en el cáncer de mama (Iorio et al., 2005), en el cáncer de pulmón (Johnson et al., 2005) y en el cáncer de colon (Michael et al., 2004, mientras que la agregación miR-17-92, que se encuentra amplificada en los linfomas de células B humanos, y miR-155, que se encuentra regulado positivamente en el linfoma de Burkitt, han sido informados como los primeros  
50 oncogenes de ARNmi humanos (Eis et al., 2005; He et al., 2005). De esta manera, los ARNmi humanos no sólo resultarían útiles como biomarcadores para el diagnóstico futuro de cánceres, sino que emergen rápidamente como dianas atractivas para la intervención en enfermedades mediante tecnologías de oligonucleótidos.

60

Inhibición de los microARN utilizando oligonucleótidos de cadena sencilla

65

Se ha informado de varios enfoques de oligonucleótidos para la inhibición de los ARNmi.

El documento nº WO03/029459 (Tuschl) reivindica oligonucleótidos codificantes de microARN y sus complementos de entre 18 y 25 nucleótidos de longitud que pueden comprender análogos de nucleótido. Se sugiere que los ANB son posibles análogos de nucleótido, aunque no se dan a conocer oligonucleótidos que contengan ANB. Tuschl reivindica que pueden utilizarse oligonucleótidos de ARNmi en la terapia.

El documento nº US2005/0182005 da a conocer un oligorribonucleótido de 2'OMe-ARN 24mero complementario a la forma más larga de miR 21 que se ha encontrado que reduce la represión inducida por miR 21, mientras que un oligonucleótido equivalente que contenía ADN no lo hacía. El término 2'-OMe-ARN se refiere a un análogo de ARN en el que existe una sustitución por metilo en la posición 2' (2'OMetilo).

El documento nº US2005/0227934 (Tuschl) se refiere a moléculas antimir con hasta 50% de residuos de ADN. Se informa además que se utilizaron antimirs que contienen 2'OMe-ARN contra los microARN pancreáticos aunque aparentemente no se dan a conocer estructuras oligonucleótidas reales.

El documento nº US2005/0261218 (ISIS) reivindica un compuesto oligomérico que comprende una primera región y una segunda región, en el que por lo menos una región comprende una modificación y una parte del compuesto oligomérico presenta como diana un ácido nucleico diana de ARN no codificante pequeño, en el que el ácido nucleico diana ARN no codificante pequeño es un ARNmi. Se reivindican compuestos oligoméricos de entre 17 y 25 nucleótidos de longitud. Los ejemplos se refieren totalmente a compuestos 2' OMe PS, 21meros y 20meros y oligonucleótidos gápmers 2'OMe con diana en un abanico de dianas de pre-ARNmi y ARNmi maduros.

Boutla et al., 2003 (Nucleic Acids Research 31: 4973-4980) describe la utilización de oligonucleótidos antisentido de ADN complementarios a 11 ARNmi diferentes en *Drosophila* así como la utilización de los mismos para inactivar los ARNmi mediante la inyección de los oligonucleótidos de ADN en embriones de mosca. De los 11 oligonucleótidos antisentido de ADN, sólo 4 constructos mostraron interferencia severa con el desarrollo normal, mientras que los 7 oligonucleótidos restantes no mostraron ningún fenotipo, presumiblemente debido a su incapacidad de inhibir el ARNmi en cuestión.

Un enfoque alternativo a lo anterior se ha informado en Hutvagner et al. (2004) y Leaman et al. (2005), en los que podrían utilizarse oligonucleótidos antisentido 2'-O-metilo, complementarios al ARNmi maduros, como inhibidores potentes e irreversibles de ARN interfiriendo pequeño (ARNip) y de la función de ARNmi in vitro e in vivo en *Drosophila* y en *C. elegans*, induciendo de esta manera un fenotipo de pérdida de función. Una desventaja de dicho método es la necesidad de concentraciones elevadas de oligonucleótidos 2'-O-metilo (100 micromolar) en experimentos de transfección e inyección, que pueden resultar tóxicos para el animal. Dicho método ha sido aplicado recientemente a estudios con animales, mediante la conjugación de oligonucleótidos antisentido 2'-O-metilo complementarios a cuatro ARNmi diferentes con colesterol para el silenciamiento de ARNmi in vivo (Krützfeldt et al., 2005). Estos denominados antagomirs se administraron en ratones mediante inyección intravenosa. Aunque estos experimentos resultaron en el silenciamiento eficaz de los ARNmi endógenos in vivo, que se encontró que era específico, eficiente y de larga duración, una desventaja importante fue la necesidad de dosis elevadas (80 mg/kg) de antagomir 2'-O-Me para el silenciamiento eficiente.

La inhibición de los microARN utilizando oligonucleótidos modificados con ANB ha sido descrita anteriormente por Chan et al., Cancer Research 65(14):6029-6033, 2005; Lecellier et al., 308:557-560, 2005; Naguibneva et al., Nature Cell Biology 8(3):278-84, 2006, y Ørum et al., Gene, 2006 (disponible en Internet el 24 de febrero de 2006). En todos los casos, los oligonucleótidos anti-mir modificados con ANB eran complementarios al microARN maduro completo, es decir, los 20 a 23 nucleótidos de longitud, dificultando la incorporación in vivo eficiente y una biodistribución amplia de las moléculas.

Naguibneva (Naguibneva et al., Nature Cell Biology 8, 2006, describe la utilización de oligonucleótido antisentido antimir máximo de ADN-ANB-ADN para la inhibición de la función del microARN miR-181 in vitro, en el que un bloque de 8 nucleótidos de ANB se localizan en el centro de la molécula flanqueados por 6 nucleótidos de ADN en el extremo 5' y 9 nucleótidos de ADN en el extremo 3', respectivamente. Una desventaja importante de dicho diseño de antisentido es la baja estabilidad in vivo debido a la baja resistencia a nucleasas de los extremos de ADN flanqueante.

Aunque Chan et al. (Chan et al., Cancer Research 65(14):6029-6033, 2005) y Ørum et al. (Ørum et al., Gene, 2006 (disponible en internet el 24 de febrero de 2006) no dan a conocer el diseño de moléculas antimir modificadas con ANB en sus estudios, Lecellier et al. (Lecellier et al., Science 308:557-560, 2005) describen la utilización del oligonucleótido antisentido antimir gápmo de ANB-ADN-ANB para inhibir la función de microARN, en la que un bloque de 4 nucleótidos de ANB se localizan tanto en el extremo 5' como en el extremo 3', respectivamente, con una ventana de 13 nucleótidos de ADN en el centro de la molécula. Una desventaja importante de dicho diseño de antisentido es la baja incorporación in vivo, así como la baja estabilidad in vivo, debido al tramo de 13 nucleótidos de ADN en el oligonucleótido antimir.

De esta manera, existe una necesidad en el campo de oligonucleótidos mejorados capaces de inhibir los microARN.

#### DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

5 La presente invención se basa en el descubrimiento de que la utilización de oligonucleótidos cortos diseñados para la unión con una afinidad elevada a dianas de ARNmi resultan altamente eficaces en el alivio de la represión del ARNm por parte de los microARN in vivo.

10 Aunque sin restringirse a ninguna teoría en particular, los datos dados a conocer en la presente memoria indican que la administración dirigida altamente eficiente de los ARNmi in vivo se consigue mediante el diseño de oligonucleótidos con el fin de formar un dúplex altamente estable con la diana de ARNmi in vivo. Lo anterior se consigue utilizando análogos de nucleótido de alta afinidad, tales como por lo menos una unidad de ANB y convenientemente análogos de nucleótido de alta afinidad adicionales, tales como ANB, 2'-MOE-ARN de análogos de nucleótido 2-fluoro, en un oligonucleótido corto, tal como de 10 a 17 o de 10 a 16 nucleobases. En un aspecto, el  
15 objetivo es generar un oligonucleótido de una longitud que es improbable que forme un complejo de ARNip (es decir, un oligonucleótido pequeño) y con una carga suficiente de análogos de nucleótido de alta afinidad para que el oligonucleótido se enganche de manera prácticamente permanente a su diana de ARNmi, formando eficazmente un dúplex estable y no funcional con la diana de ARNmi. Los presentes inventores han encontrado que dichos diseños resultan considerablemente más eficaces que los oligonucleótidos de la técnica anterior, en particular los diseños de gápmero y blócmero y los oligonucleótidos largos, por ejemplo los 20-23meros. El término 2'fluoro-ADN se refiere a un análogo de ADN en el que existe una sustitución por flúor en la posición 2' (2'F).  
20

La invención proporciona un oligonucleótido de fórmula 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3' (SEC ID nº 99), en la que una letra minúscula identifica la base nitrogenada de una unidad de ADN; una letra mayúscula identifica la base nitrogenada de una unidad de ANB y en la que las citosinas de ANB se encuentran opcionalmente metiladas.  
25

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido de fórmula 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3' (SEC ID nº 99), en la que una letra minúscula identifica la base nitrogenada de una unidad de ADN; una letra mayúscula identifica la base nitrogenada de una unidad de ANB y en la que las citosinas de ANB se encuentran opcionalmente metiladas, y un diluyente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable; los  
30 análogos de nucleótido de alta afinidad son análogos de nucleótido que resultan en oligonucleótidos que presentan una estabilidad térmica del dúplex más elevada con un nucleótido de ARN complementario que la afinidad de unión de un nucleótido de ADN equivalente. Lo anterior se determina típicamente midiendo la  $T_m$ .

35 Los presentes inventores no han identificado ningún efecto fuera de diana significativo al utilizar dichos oligonucleótidos pequeños de alta afinidad con diana en ARNmi específicos. En efecto, los datos proporcionados en la presente memoria indican que los efectos sobre la expresión del ARNm se deben a la presencia de una secuencia complementaria al ARNmi diana (dianas primarias de ARNm) dentro del ARNm o a efectos secundarios sobre los ARNm que están regulados por dianas de ARNm primarias (dianas de ARNm secundarias). No se identificaron efectos de toxicidad, indicando la ausencia de efectos fuera de diana perjudiciales.  
40

La invención proporciona además la utilización de un oligonucleótido según la invención, tal como los que pueden formar parte de la composición farmacéutica, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad o trastorno médico asociado a la presencia o sobreexpresión (regulación positiva) del microARN.  
45

La invención proporciona además la utilización del oligonucleótido de la invención en un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno médico asociado a la presencia o sobreexpresión del microARN, que comprende la etapa de administrar una composición (tal como la composición farmacéutica) según la invención en una persona que requiere tratamiento.  
50

La invención proporciona además un método in vitro para reducir la cantidad eficaz de un ARNmi en una célula, que comprende administrar una composición (tal como la composición farmacéutica) según la invención o un oligonucleótido de cadena sencilla según la invención en la célula u organismo. La reducción de la cantidad eficaz en el presente contexto se refiere a la reducción del ARNmi funcional presente en la célula u organismo. Se reconoce que los oligonucleótidos preferentes según la invención no siempre reducirán significativamente la cantidad real de ARNmi en la célula u organismo, ya que típicamente forman dúplex muy estables con sus dianas de ARNmi.  
55

La invención proporciona además un método in vitro para la desrepresión de un ARNm diana de un ARNmi en una célula o en un organismo, que comprende administrar una composición (tal como la composición farmacéutica) o un oligonucleótido de cadena sencilla según la invención en la célula o en el organismo.  
60

La invención proporciona además la utilización de un oligonucleótido de fórmula 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3' (SEC ID nº 99), en la que una letra minúscula identifica la base nitrogenada de una unidad de ADN; una letra mayúscula identifica la base nitrogenada de una unidad de ANB, en la que las citosinas de ANB se encuentran opcionalmente  
65

metiladas, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad o trastorno médico asociado a la presencia o sobreexpresión del microARN.

5 La invención proporciona además un método in vitro para reducir la cantidad eficaz de un ARNm diana (es decir, la cantidad de ARNm que se encuentra disponible para reprimir los ARNm diana) en una célula, que comprende administrar una composición (tal como la composición farmacéutica) que comprende un oligonucleótido de cadena sencilla de la invención en la célula o en el organismo.

10 La invención proporciona además un método in vitro para la desrepresión de un ARNm diana de un ARNm en una célula, que comprende administrar un oligonucleótido de cadena sencilla de la invención (o una composición que comprende dicho oligonucleótido) en la célula.

15 En una realización, el oligonucleótido de la invención está diseñado para no ser reclutado por RISC o para mediar en el corte dirigido por RISC de la diana de ARNm. Se ha considerado que mediante la utilización de oligonucleótidos largos, por ejemplo 21 o 22meros, en particular oligonucleótidos de ARN u oligonucleótidos 'análogos' de ARN que son complementarios a la diana de ARNm, el oligonucleótido puede competir contra el ARNm diana en términos de asociación con el complejo RISC, y aliviar de esta manera la represión por parte de ARNm de los ARNm diana de ARNm mediante la introducción de un oligonucleótido que compite como sustrato para el ARNm.

20 Sin embargo, la presente invención pretende evitar dicha corte no deseable del ARN diana o inhibición de la traducción proporcionando oligonucleótidos capaces de unión complementaria, y aparentemente en algunos casos prácticamente irreversible, con el microARN maduro. Lo anterior aparentemente resulta en una forma de protección frente a la degradación o corte (por ejemplo por RISC o RNasa H u otras endo- o exo-nucleasas), que puede no resultar en una reducción sustancial o incluso significativa del ARNm (por ejemplo según se detecta mediante transferencia northern utilizando sondas de ANB) dentro de una célula, aunque garantiza que la cantidad eficaz del ARNm, medida mediante análisis de desrepresión, se reduzca considerablemente. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona oligonucleótidos que se diseñan deliberadamente para que no sean compatibles con el complejo RISC pero que eliminan el ARNm mediante titulación con el oligonucleótido. Aunque sin pretender restringirse a ninguna teoría específica de por qué los oligonucleótidos de la presente invención resultan tan eficaces, análogamente a los oligonucleótidos basados en ARN (u oligonucleótidos 2'OMe completos), aparentemente los oligonucleótidos según la presente invención funcionan mediante inhibición no competitiva de la función del ARNm, ya que eliminan eficazmente el ARNm disponible del citoplasma, mientras que los oligonucleótidos de la técnica anterior proporcionan un sustrato de ARNm alternativo, que pueden actuar como un inhibidor competitivo, la eficacia del cual sería mucho más dependiente de la concentración del oligonucleótido en el citoplasma, así como de la concentración del ARNm diana y el ARNm.

40 Aunque sin deseo de restringirse a ninguna teoría en particular, una posibilidad adicional que puede existir al utilizar oligonucleótidos de longitud aproximadamente similar a los ARNm diana (es decir, el ARNm) es que los oligonucleótidos podrían formar un dúplex de tipo ARNip con el ARNm diana, una situación que reduciría la eficacia del oligonucleótido. También resulta posible que los oligonucleótidos mismos puedan utilizarse como la cadena guía dentro del complejo RISC, generando de esta manera la posibilidad de la degradación dirigida por RISC de dianas no específicas que simplemente resulta que presentan suficiente complementariedad con el oligonucleótido guía.

45 Mediante la selección de oligonucleótidos pequeños con diana en secuencias de ARNm, se evitan dichos problemas.

50 Los oligonucleótidos pequeños que incorporan ANB son conocidos del campo de los reactivos, tales como los ANB (ver, por ejemplo, los documentos nº WO 2005/098029 y nº WO 2006/069584). Sin embargo, las moléculas diseñadas para la utilización diagnóstica o como reactivos son muy diferentes en su diseño a las destinadas a la utilización farmacéutica. Por ejemplo, las nucleobases terminales de los oligos reactivos típicamente no son de ANB, sino de ADN, y los enlaces entre nucleósidos típicamente no son fosforotioato, el enlace de utilización preferente en los oligonucleótidos de la presente invención. Por lo tanto, la invención proporciona una nueva clase de oligonucleótidos per se.

55 Resulta preferible para la mayoría de usos terapéuticos que el oligonucleótido se encuentre totalmente fosforotiolado, siendo la excepción los oligonucleótidos terapéuticos para la utilización en el SNC, tal como en el cerebro o la médula espinal, en donde la fosforotiolación puede resultar tóxica, y debido a la ausencia de nucleasas, pueden utilizarse enlaces fosfodiéster, incluso entre unidades consecutivas de ADN. Tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria, otros aspectos preferentes del oligonucleótido según la invención es que la segunda nucleobase 3' y/o la 9a y 10a (desde el extremo 3') también sean de ANB.

60 Por lo tanto, los inventores han encontrado inesperadamente que los oligonucleótidos de cadena sencilla diseñados cuidadosamente que comprenden unidades de ácido nucleico bloqueado (ANB) en un orden particular muestran un silenciamiento significativo de los microARN, resultando en niveles reducidos de microARN. Se ha encontrado que la unión estrecha de dichos oligonucleótidos a la denominada secuencia germinal, nucleótidos 2 a 8 o 2 a 7, contando desde el extremo 5', de los microARN diana resulta importante. El nucleótido 1 de los microARN diana es una base

que no se empareja y con toda probabilidad se encuentra oculta en un bolsillo de unión en la proteína Ago 2. Sin deseo de restringirse a ninguna teoría en particular, los presentes inventores consideran que mediante la selección de las secuencias de región germinal, en particular con oligonucleótidos que comprenden ANB, preferentemente unidades de ANB en la región que es complementaria a la región germinal, el dúplex entre el ARNmi y el oligonucleótido resulta particularmente eficaz reconociendo los ARNmi, evitando efectos fuera de diana y posiblemente proporcionando una característica adicional que evita la función de ARNmi dirigida por RISC.

Los inventores han encontrado inesperadamente que el silenciamiento de los microARN resulta todavía más incrementado en el caso de que los oligonucleótidos de cadena sencilla modificados con ANB no contengan un nucleótido en el extremo 3' correspondiente a dicho nucleótido 1 no emparejado. Se ha encontrado además que dos unidades de ANB en el extremo 3' de los oligonucleótidos según la presente invención convierten a dichos oligonucleótidos en altamente resistentes a nucleasas.

Se ha encontrado además que los oligonucleótidos de la invención que presentan por lo menos un nucleótido de ANB en las posiciones correspondientes a las posiciones 10 y 11, contando desde el extremo 5', del microARN diana pueden evitar el corte de los oligonucleótidos de la invención.

La invención proporciona además los oligonucleótidos tal como se definen en la presente memoria para la utilización como medicamento.

La invención se refiere además a composiciones que comprenden los oligonucleótidos definidos en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto adicional de la invención es un método para reducir los niveles de microARN diana mediante la puesta en contacto del microARN diana con un oligonucleótido tal como se define en la presente memoria, el oligonucleótido:

1. es complementario al microARN diana,
2. no contiene un nucleótido en el extremo 3' que correspondiente al primer extremo 5'.

La invención proporciona además un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleobases en la 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 y en la que las citosinas de ANB se encuentran opcionalmente metiladas, o un conjugado de las mismas.

Los inventores de la presente invención han encontrado inesperadamente que los oligonucleótidos antisentido de una longitud determinada que comprenden una secuencia nuclear de ADN particular y ácidos nucleicos bloqueados (ANB) en dicha secuencia nuclear muestran propiedades superiores de inhibición del microARN.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Fig. 1. Efecto del tratamiento con diferentes oligonucleótidos de ANB anti-miR sobre la expresión de ácidos nucleicos diana en la línea celular Huh-7 expresante de miR-122a. Se muestran las cantidades miR-122a (unidades arbitrarias) derivadas de qRT-PCR específica de miR-122a en comparación con las células no tratadas (tratamiento simulado). Los oligonucleótidos de ANB anti-miR se utilizaron a dos concentraciones: 1 y 100 nM, respectivamente. También se incluyó un control de desapareamiento (SPC3350) a SPC3349 (también denominado SPC3549 en la presente memoria).

Fig. 2. Evaluación de la respuesta dosis de inactivación de ANB anti-miR-122a para SPC3548 y SPC3549 en comparación con SPC3372 in vivo en hígados de ratón utilizando RT-PCR en tiempo real de miR-122a.

Fig. 2b. Niveles de miR-122 en hígado de ratón tras el tratamiento con diferentes ANB-anti-miR. Se administraron las moléculas ANB-anti-miR SPC3372 y SPC3649 en ratones normales mediante tres inyecciones i.p. cada dos días durante un periodo de seis días a las dosis indicadas y se sacrificaron 48 horas después de la última dosis. Se extrajo el ARN total de los hígados de ratón y se midió miR-122 mediante qPCR específica de miR-122.

Fig. 3. Evaluación de los niveles plasmáticos de colesterol en ratones tratados con ANB-anti-miR-122a en comparación con ratones de control que habían recibido solución salina.

Fig. 4a. Evaluación de los niveles relativos de ARNm de Bckdk en ratones tratados con ANB anti-miR-122a en comparación con ratones de control tratados con solución salina, utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

Fig. 4b. Evaluación de los niveles relativos de ARNm de aldolasa a en ratones tratados con ANB anti-miR-122a en comparación con ratones de control tratados con solución salina, utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

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

Fig. 5. Evaluación de la respuesta in vivo a dosis de inactivación de ANB-anti-miR<sup>TM</sup>-122a en hígados de ratón utilizando RT-PCR en tiempo real de miR-122a. Se trataron seis grupos de animales (5 ratones en cada grupo) de la manera siguiente. Los animales del grupo 1 recibieron inyecciones i.v. de 0,2 ml de solución salina en 3 días sucesivos; el grupo 2 recibió 2,5 mg/kg de SPC3372; 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 SPC 3373 (oligonucleótido ANB desapareado-anti-miR<sup>TM</sup>), todos de la misma manera. Se repitió el experimento (por lo tanto n=10) y se muestran los resultados agrupados.

Fig. 6. Transferencia northern de comparación de SPC3649 y SPC3372. El ARN total de un ratón de cada grupo se sometió a transferencia northern específica para miR-122. Se indica miR-122 maduro y el dúplex (microARN bloqueado) formado entre ANB-anti-miR y miR-122.

Fig. 7. Los ratones fueron tratados con 25 mg/kg/día de ANB-anti-miR o solución salina durante tres días consecutivos y se sacrificaron 1, 2 o 3 semanas después de la última dosis. También se incluyen los valores de animales sacrificados 24 horas después de la última dosis (Ejemplo 11, "diseño antiguo"). Se evaluaron los niveles de miR-122 mediante qPCR y se normalizaron respecto a la media del grupo de solución salina en cada punto temporal individual. Se incluyen también los valores de los animales sacrificados 24 horas después de la última dosis (se muestran medias y SD, n=7, 24 h n=10). Día de sacrificio 9, 16 o 23 corresponde al sacrificio 1, 2 o 3 semanas después de la última dosis).

Fig. 8. Los ratones fueron tratados con 25 mg/kg/día de ANB-anti-miR o solución salina durante tres días consecutivos y se sacrificaron 1, 2 o 3 semanas después de la última dosis. Se incluyen también los valores de los animales sacrificados 24 horas después de la última dosis (Ejemplo 11, "diseño antiguo"). Se midió el nivel plasmático de colesterol y se normalizó respecto al grupo de solución salina en cada punto temporal (se muestran medias y SD, n=7, 24 h n=10).

Fig. 9. Inducción de ARNm de diana miR-122a dependiente de la dosis mediante inhibición con SPC3372 de miR-122a. Los ratones se trataron con diferentes dosis de SPC3372 durante tres días consecutivos, tal como se ha indicado anteriormente, y se sacrificaron 24 horas después de la última dosis. El ARN total extraído del hígado se sometió a qPCR. Los genes con sitio diana miR-122 predicho y que se había observado que estaban regulados positivamente según el análisis de micromatrices se investigaron para la inducción dependiente de la dosis mediante el incremento de las dosis de SPC3372 utilizando qPCR. El ARN hepático total de 2 a 3 ratones de cada grupo sacrificados 24 horas después de la última dosis se sometió a qPCR para los genes indicados. En la figura 9 se muestran los niveles de ARNm respecto al grupo de solución salina, n=2-3 (2,5 a 12,5 mg/kg/día: n=2, sin SD). Se muestra también el control desapareado (mm, SPC3373).

Fig. 10. Inducción transitoria de ARNm de diana miR-122a tras el tratamiento de SPC3372. Se trataron ratones NMRI hembra con 25 mg/kg/día de SPC3372 conjuntamente con el control de solución salina durante tres días consecutivos y se sacrificaron 1, 2 o 3 semanas después de la última dosis, respectivamente. Se extrajo el ARN de los hígados y se investigaron mediante qPCR los niveles de ARNm de los ARNm de la diana miR-122a predicha; datos seleccionados mediante micromatrices se investigaron mediante qPCR. Se analizaron tres animales de cada grupo.

Fig. 11. Inducción de Vldlr en el hígado mediante el tratamiento con SPC3372. Se investigaron para la inducción de Vldlr las mismas muestras hepáticas de ARN tal como en el ejemplo anterior (fig. 10).

Fig. 12. Estabilidad del dúplex miR-122a/SPC3372 en plasma de ratón. Se sometió a ensayo la estabilidad de SPC3372 y el dúplex SPC3372/miR-122a en plasma de ratón a 37°C durante 96 horas. Se muestra en la figura 12 un PAGE teñido con SYBR-oro.

Fig. 13. El secuestro de miR-122a maduro por SPC3372 conduce a la formación de dúplex. En la figura 13 se muestra una membrana sondeada con una sonda específica de miR-122a (panel superior) y se sondeó nuevamente con una sonda específica de Let-7 (panel inferior). Con la sonda miR-122 pudieron detectarse dos bandas, una correspondiente a miR-122 maduro y una correspondiente a un dúplex de SPC3372 y miR-122.

Fig. 14. Secuestro de miR-122a por SPC3372 conjuntamente con la distribución de SPC3372 evaluada mediante hibridación in situ de secciones hepáticas. Las criosecciones hepáticas de los animales tratados se

Fig. 15. Expresión de genes hepáticos en ratones tratados con ANB de miR-122-antimiR. Se compararon ratones tratados con solución salina y con ANB-antimiR mediante perfilado de expresión genómica utilizando matrices Mouse Genome 430 2.0 de Affymetrix. (a,1) Se muestra el número de sondas que muestran diferencialmente la expresión en muestras de hígado de ratones tratados con ANB-antimiR-122 o con solución salina 24 horas después del tratamiento. (b,2) Incidencia de secuencia nuclear de miR-122 en genes expresados diferencialmente. El gráfico

muestra el porcentaje de transcritos con por lo menos una secuencia de reconocimiento de núcleo de miR-122 en su RNT 3'. Aleatorio: se generaron secuencias aleatorias y se realizó una búsqueda para secuencias de reconocimiento de núcleo miR-122. Perfiles de expresión temporales de genes hepáticos en ratones tratados con ANB-antimiR. Los ratones fueron tratados con 25 mg/kg/día de ANB-antimiR o solución salina durante tres días consecutivos y se sacrificaron 1, 2 o 3 semanas después de la última dosis. Se incluyen también los valores de los animales sacrificados 24 horas después de la última dosis. (c,3) También se sometieron a perfilado de expresión muestras de ARN de diferentes puntos temporales. Análisis de agregación jerárquica de perfiles de expresión de genes identificados como expresados diferencialmente en ratones tratados con ANB-antimiR o solución salina 24 horas, una semana o tres semanas después del tratamiento. (d,4) Se realizó un seguimiento durante el tiempo de los perfiles de expresión de genes identificados como expresados diferencialmente en ratones tratados con ANB-antimiR o solución salina 24 horas después del tratamiento. Las proporciones de expresión de genes regulados positiva y negativamente en ratones tratados con ANB-antimiR se aproximan a 1 en el curso temporal, indicando un efecto reversible del tratamiento con ANB-antimiR.

Fig. 16. Efecto del tratamiento con SPC3372 y 3595 sobre los niveles de miR-122 en hígados de ratón.

Fig. 17. Efecto del tratamiento con SPC3372 y 3595 sobre los niveles de aldolasa A en hígados de ratón.

Fig. 18. Efecto del tratamiento con SPC3372 y 3595 sobre los niveles de Bcdkd en hígados de ratón.

Fig. 19. Efecto del tratamiento con SPC3372 y 3595 sobre los niveles de CD320 en hígados de ratón.

Fig. 20. Efecto del tratamiento con SPC3372 y 3595 sobre los niveles de Ndr3 en hígados de ratón.

Fig. 21. Efecto del tratamiento a largo plazo con SPC3649 sobre el colesterol total en plasma en ratones hipercolesterolémicos y normales. Se obtuvieron muestras semanales de plasma sanguíneo de ratones tratados con SPC3649 y con control de solución salina una vez a la semana seguido de la evaluación del colesterol total en plasma. Los ratones se trataron con 5 mg/kg de SPC3649, SPC3744 o solución salina dos veces a la semana. Los ratones normales se trataron en paralelo.

Fig. 22. Efecto del tratamiento a largo plazo con SPC3649 sobre los niveles de miR-122 en ratones hipercolesterolémicos y normales.

Fig. 23. Efecto del tratamiento a largo plazo con SPC3649 sobre los niveles de aldolasa A en ratones hipercolesterolémicos y normales.

Fig. 24. Efecto del tratamiento a largo plazo con SPC3649 sobre los niveles de Bcdkd en ratones hipercolesterolémicos y normales.

Fig. 25. Efecto del tratamiento a largo plazo con SPC3649 sobre los niveles de AST en ratones hipercolesterolémicos y normales.

Fig. 26. Efecto del tratamiento a largo plazo con SPC3649 sobre los niveles de ALT en ratones hipercolesterolémicos y normales.

Fig. 27. Modulación de la replicación del VHC por SPC3649 en un modelo de células Huh-7. Análisis de transferencia northern del ARN del VHC en células Huh-7 tras la transfección con diferentes moléculas de ANB-antimiR (SPC3648, SPC3649 y SPC3550) y 2'OMe-antagomir-122 (panel superior). Se cuantificaron las intensidades de la señal de hibridación y se normalizaron respecto a la señales de ARNm de espectrina en cada carril (panel inferior).

Fig. 28. Desrepresión funcional de luciferasa de Renilla con diana miR-19b por oligonucleótidos bloqueantes de miR-19b en una línea celular endógenamente expresante de miR-19b, HeLa. "diana miR-19b" es el plásmido con diana miR-19b pero no cotransfectado con oligo bloqueante de miR-19b y por lo tanto representa una expresión de luciferasa de *Renilla* totalmente reprimida por miR-19b.

Fig. 29. Desrepresión funcional de luciferasa de Renilla con diana miR-122 por oligonucleótidos bloqueantes de miR-122 en una línea celular endógenamente expresante de miR-122, Huh-7. La "diana miR-122" es el plásmido correspondiente con diana miR-122 pero no cotransfectado con oligo bloqueante de miR-122 y por lo tanto representa una expresión de luciferasa de *Renilla* con represión total de miR-122.

Fig. 30. Diagrama que ilustra la alineación de un oligonucleótido según la invención y un microARN diana.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El oligonucleótido de la invención típicamente es de cadena sencilla. Por lo tanto, se entenderá que dentro del contexto de la invención el término oligonucleótido puede utilizarse intercambiabilmente con la expresión oligonucleótido de cadena sencilla.

- 5 En una realización, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden oligonucleótidos pequeños (de cadena sencilla) de la invención. Los oligonucleótidos pequeños resultan particularmente eficaces para aliviar la represión de ARNmi in vivo. Se ha encontrado que la incorporación de análogos de nucleótido de alta afinidad en los oligonucleótidos resulta en moléculas anti-microARN altamente eficaces que aparentemente funcionan mediante la formación de dúplex prácticamente irreversibles con el ARNmi diana, y no mediante mecanismos basados en el corte del ARN, tales como los mecanismos asociados a la ARNasa H o a RISC.

El oligonucleótido de cadena sencilla según la invención comprende una región de secuencia de nucleobases contigua que es 100% complementaria a la región núcleo de microARN humano.

- 15 El oligonucleótido de cadena sencilla según la invención es complementario a la secuencia de microARN humano madura.

Los oligonucleótidos según la invención son complementarios a hsa-miR-122.

- 20 En una realización preferente, los análogos de nucleótido ANB presentan una estabilidad térmica del dúplex más alta con un nucleótido de ARN complementario que la afinidad de unión de un nucleótido de ADN equivalente con dicho nucleótido de ARN complementario.

- 25 En una realización, los análogos de nucleótido ANB confieren una estabilidad en suero incrementada respecto al oligonucleótido de cadena sencilla.

En una realización, el oligonucleótido de cadena sencilla forma una conformación de A-hélice con una molécula de ARN de cadena sencilla complementaria.

- 30 Típicamente entre dos moléculas de ARN existe un dúplex en una conformación de forma A, mientras que un dúplex entre dos moléculas de ADN típicamente existe en una conformación de forma B.

Un dúplex entre una molécula de ADN y una de ARN típicamente existe en una conformación intermedia (forma A/B). La utilización de análogos de nucleótido, tales como beta-D-oxi-ANB, puede utilizarse para favorecer una confirmación más de tipo forma A. Se utilizan los dicroísmos circulares (DC) estándares o el análisis de RMN para determinar la forma de los dúplex entre los oligonucleótidos de la invención y las moléculas de ARN complementarias.

- 35 Debido a que se cree que el reclutamiento por el complejo RISC depende de la conformación estructural específica de la diana de ARNmi/ARNm, los oligonucleótidos según la presente invención pueden, en una realización, formar un dúplex de forma A/B con una molécula de ARN complementaria.

Sin embargo, los presentes inventores también han determinado que la utilización de análogos de nucleótido que estimulan la estructura de forma A también pueden resultar eficaces, tales como el isómero alfa-L de ANB.

- 45 En una realización, el oligonucleótido de cadena sencilla forma una conformación de forma A/B con una molécula de ARN de cadena sencilla complementaria.

En una realización, el oligonucleótido de cadena sencilla forma una conformación de forma A con una molécula de ARN de cadena sencilla complementaria.

- 50 En una realización, el oligonucleótido de cadena sencilla según la invención no media en el corte basado en ARNasa H de una molécula de ARN de cadena sencilla complementaria. Típicamente se requiere un tramo de por lo menos 5 (típicamente no eficaz para el reclutamiento de la ARNasa H), más preferentemente de por lo menos 6, más preferentemente de por lo menos 7 o 8 nucleobases de ADN consecutivas (o nucleobases alternativas que pueden reclutar ARNasa H, tal como alfa-L-amino ANB) con el fin de que un oligonucleótido resulte eficaz en el reclutamiento de la ARNasa H.

La patente EP n° 1 222 309 proporciona métodos in vitro para determinar la actividad de ARNasa H, que puede utilizarse para determinar la capacidad de reclutar ARNasa H. Se considera que un compuesto es capaz de reclutar ARNasa H en el caso de que, al proporcionarle el ARN diana complementario, presente una tasa inicial, medida en pmoles/l/min, de por lo menos 1%, tal como de por lo menos 5%, tal como de por lo menos 10% o inferior a 20% del oligonucleótido equivalente de sólo ADN, sin sustituciones en 2', con grupos de enlace fosforotioato entre todos los nucleótidos en el oligonucleótido, utilizando la metodología proporcionada en los Ejemplos 91 a 95 de la patente EP n° 1 222 309.

65

Se considera que un compuesto es esencialmente incapaz de reclutar ARNasa H en el caso de que, al proporcionarle el ARN diana complementario y ARNasa H, la tasa inicial de la ARNasa H, medida en pmoles//min, sea inferior a 1%, tal como inferior a 5%, tal como inferior a 10% o inferior a 20% de la velocidad inicial determinada utilizando el oligonucleótido equivalente de sólo ADN, sin sustituciones en 2', con grupos de enlace fosforotioato entre todos los nucleótidos en el oligonucleótido, utilizando la metodología proporcionada en los Ejemplos 91 a 95 de la patente EP nº 1 222 309.

En una realización altamente preferente, el oligonucleótido de cadena sencilla de la invención es capaz de formar un dúplex con una molécula de ácido nucleico ARN de cadena sencilla complementaria (típicamente de aproximadamente la misma longitud que dicho oligonucleótido de cadena sencilla) con enlaces fosfodiéster entre nucleósidos, en el que el dúplex presenta una  $T_m$  de por lo menos aproximadamente 60°C, en efecto resulta preferente que el oligonucleótido de cadena sencilla sea capaz de formar un dúplex con una molécula de ácido nucleico ARN de cadena sencilla complementario con enlaces fosfodiéster entre nucleósidos, en el que el dúplex presenta una  $T_m$  de entre aproximadamente 70°C y aproximadamente 95°C, tal como una  $T_m$  de entre aproximadamente 70°C y aproximadamente 90°C, tal como de entre aproximadamente 70°C y aproximadamente 85°C.

En una realización, el oligonucleótido de cadena sencilla es capaz de formar un dúplex con una molécula de ácido nucleico ADN de cadena sencilla complementaria con enlaces fosfodiéster entre nucleósidos, en el que el dúplex presenta una  $T_m$  de entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 95°C, tal como de entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 90°C, tal como de por lo menos aproximadamente 55°C, tal como de por lo menos aproximadamente 60°C, o no más de aproximadamente 95°C.

En una realización, la unidad o unidades de ANB se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste de oxi-ANB, tio-ANB y amino-ANB, en configuraciones D- $\beta$  y L- $\alpha$  o combinaciones de las mismas.

En una realización específica, las unidades de ANB pueden ser nucleobases de ENA.

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

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

En una realización, el oligonucleótido de cadena sencilla comprende por lo menos un grupo de enlace entre nucleósidos que no es fosfato.

En una realización, el oligonucleótido de cadena sencilla comprende por lo menos un grupo de enlace fosforotioato entre nucleósidos.

En una realización, el oligonucleótido de cadena sencilla comprende enlaces fosfodiéster y fosforotioato.

En una realización, todos los enlaces entre nucleósidos son enlaces fosforotioato.

En una realización, el oligonucleótido de cadena sencilla comprende por lo menos un enlace fosfodiéster entre nucleósidos.

En una realización, todos los enlaces entre nucleósidos del oligonucleótido de cadena sencilla de la invención son enlaces fosfodiéster.

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

Se muestran realizaciones adicionales de la invención, que pueden combinarse con las realizaciones anteriormente indicadas, en las reivindicaciones y en la sección titulada 'Realizaciones adicionales'.

## Definiciones

El término 'nucleobase' se refiere a nucleótidos, tales como ADN y ARN, y análogos de nucleótidos.

El término "oligonucleótido" (o simplemente "oligo") se refiere, en el contexto de la presente invención, a una molécula formada mediante enlace covalente de dos o más nucleobases. Al utilizarlo en el contexto del oligonucleótido de la invención (también denominado oligonucleótido de cadena sencilla), el término "oligonucleótido" puede presentar, en una realización, por ejemplo entre 8 y 26 nucleobases, tal como entre 10 y 26 nucleobases, tal como entre 12 y 26 nucleobases. En una realización preferente, tal como se detalla en la presente memoria, el oligonucleótido presenta una longitud de entre 8 y 17 nucleobases, tal como de entre 20 y 27 nucleobases, tal como de entre 8 y 16 nucleobases, tal como de entre 12 y 15 nucleobases.

En dicha realización, el oligonucleótido puede presentar una longitud de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 nucleobases.

Se reconocerá que, para oligonucleótidos más pequeños, puede resultar necesario incrementar la proporción de análogos de nucleótido (de alta afinidad), tales como ANB. Por lo tanto, en una realización, por lo menos aproximadamente 30% de las nucleobases son análogos de nucleótido, tal como por lo menos aproximadamente 33%, tal como por lo menos aproximadamente 40%, o por lo menos aproximadamente 50%, o por lo menos aproximadamente 60%, tal como por lo menos aproximadamente 66%, tal como por lo menos aproximadamente 70%, tal como por lo menos aproximadamente 80%, o por lo menos aproximadamente 90%. También resultará evidente que el oligonucleótido puede comprender una secuencia de nucleobases que consiste de únicamente secuencias de análogos de nucleótido.

En la presente memoria, la expresión "base nitrogenada" pretende cubrir las purinas y las pirimidinas, tales como las nucleobases de ADN A, C, T y G, las nucleobases de ARN A, C, U y G, así como las nucleobases no de ADN/ARN, tales como la 5-metilcitosina (<sup>Me</sup>C), isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 5-propinil-6-fluorouracilo, 5-metilthiazoluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, 2,6-diaminopurina, 7-propín-7-deazaadenina, 7-propín-7-deazaguanina y 2-cloro-6-aminopurina, en particular <sup>Me</sup>C. Se entenderá que la selección final de la nucleobase no de ADN/ARN dependerá del nucleótido correspondiente (o emparejado) presente en la cadena de microARN que pretende ser la diana del oligonucleótido. Por ejemplo, en el caso de que el nucleótido correspondiente sea G, normalmente resultará necesario seleccionar una nucleobase no de ADN/ARN que sea capaz de establecer enlaces de hidrógeno con G. En este caso específico, en el que el nucleótido correspondiente es G, un ejemplo típico de una nucleobase no de ADN/ARN preferente es <sup>Me</sup>C.

La expresión "grupo de enlace entre nucleósidos" pretende referirse a un grupo capaz de unir covalentemente dos nucleobases, tal como entre unidades de ADN, entre unidades de ADN y análogos de nucleótido, entre dos unidades no de ANB, entre una unidad no de ANB y una unidad de ANB, y entre dos unidades de ANB, etc. Entre los ejemplos preferentes se incluyen los grupos fosfato, fosfodiéster y fosforotioato.

El enlace entre nucleósidos puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de: -O-P(O)<sub>2</sub>-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)<sub>2</sub>-O-, -S-P(O)<sub>2</sub>-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)<sub>2</sub>-O-, -O-P(O)<sub>2</sub>-S-, -O-P(O,S)-S-, -S-P(O)<sub>2</sub>-S-, -O-PO(R<sup>H</sup>)-O-, O-PO(OCH<sub>3</sub>)-O-, -O-PO(NR<sup>H</sup>)-O-, -O-PO(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S-R)-O-, -O-PO(BH<sub>3</sub>)-O-, -O-PO(NHR<sup>H</sup>)-O-, -O-P(O)<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-, -NR<sup>H</sup>-P(O)<sub>2</sub>-O-, -NR<sup>H</sup>-CO-O-, -NR<sup>H</sup>-CO-NR<sup>H</sup>-, y/o el enlace entre nucleósidos puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de: -O-CO-O-, -O-CO-NR<sup>H</sup>-, -NR<sup>H</sup>-CO-CH<sub>2</sub>-, -O-CH<sub>2</sub>-CO-NR<sup>H</sup>-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-, -CO-NR<sup>H</sup>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-CO-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, -S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, -S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CO-NR<sup>H</sup>-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-CO-, -CH<sub>2</sub>-NCH<sub>3</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, en donde R<sup>H</sup> se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>. Convenientemente, en algunas realizaciones, pueden resultar preferentes enlaces entre nucleósidos que contienen azufre (S) tal como se han proporcionado anteriormente.

Las expresiones "correspondiente a" y "corresponde a" se refieren en el contexto de los oligonucleótidos a la comparación entre una secuencia de nucleobases del compuesto de la invención, y el complemento inverso de la misma, o en una realización, entre una secuencia de nucleobases y una secuencia de nucleobases equivalente (idéntica) que puede comprender, por ejemplo, otras nucleobases pero que conserva la misma secuencia de bases, o un complemento de la misma. Los análogos de nucleótido se comparan directamente con sus nucleótidos equivalentes o naturales correspondientes. Las secuencias que forman el complemento inverso de una secuencia se denominan secuencia complementaria de la secuencia.

En referencia a la longitud de una molécula de nucleótidos tal como se denomina en la presente memoria, la longitud corresponde al número de unidades monoméricas, es decir nucleobases, con independencia de si dichas unidades monoméricas son nucleótidos o análogos de nucleótido. Con respecto a las nucleobases, los términos monómero y unidad se utilizan intercambiabilmente en la presente memoria.

Debe entenderse que al utilizar el término "aproximadamente" en el contexto de valores o intervalos específicos de valores, la exposición debe entenderse que incluye el valor o intervalo específico al que se hace referencia.

Entre los análogos de ADN preferentes se incluyen análogos de ADN en los que el grupo 2'-H se sustituye por una sustitución diferente de -OH (ARN), por ejemplo mediante sustitución con -O-CH<sub>3</sub>, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH o -F.

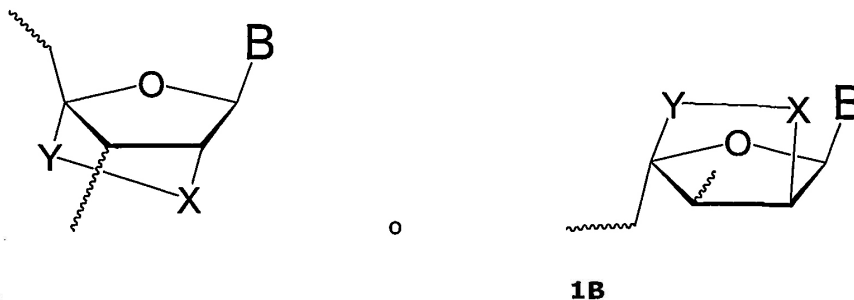
Entre los análogos de ARN preferentes se incluyen análogos de ARN que han sido modificados en su grupo 2'-OH, por ejemplo mediante sustitución por un grupo diferente de -H (ADN), por ejemplo -O-CH<sub>3</sub>, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH o -F.

En una realización, el análogo de nucleótido es "ENA".

Al utilizarlos en el presente contexto, las expresiones "unidad de ANB", "monómero de ANB", "residuo de ANB", "unidad de ácido nucleico bloqueado", "monómero de ácido nucleico bloqueado" o "residuo ácido nucleico

bloqueado" se refieren a un análogo de nucleósido bicíclico. Las unidades de ANB se describen en, entre otros, los documentos n° WO 99/14226, n° WO 00/56746, n° WO 00/56748, n° WO 01/25248, n° WO 02/28875, n° WO 03/006475 y n° WO 03/095467. La unidad de ANB también puede definirse con respecto a su fórmula química. De esta manera, una "unidad de ANB", tal como se utiliza en la presente memoria, presenta la estructura química mostrada en el Esquema 1, a continuación:

Esquema 1



en la que:

- 10 X se selecciona de entre el grupo que consiste de O, S y  $\text{NR}^{\text{H}}$ , en el que  $\text{R}^{\text{H}}$  es H o alquilo  $\text{C}_{1-4}$ ,  
 Y es  $(-\text{CH}_2)_r$ , en el que r es un número entero entre 1 y 4, y  
 B es una base nitrogenada.

- 15 En referencia a la sustitución de una unidad de ADN por su unidad de ANB correspondiente en el contexto de la presente invención, la expresión "unidad de ANB correspondiente" pretende referirse a que la unidad de ADN ha sido sustituida por una unidad de ANB que contiene la misma base nitrogenada que la unidad de ADN que ha sustituido, por ejemplo la unidad de ANB correspondiente de una unidad de ADN que contiene la base nitrogenada A también contiene la base nitrogenada A. La excepción es que, en el caso de que una unidad de ADN contenga la base C, la unidad de ANB correspondiente puede contener la base C o la base  $^{\text{Me}}\text{C}$ , preferentemente  $^{\text{Me}}\text{C}$ .

- 20 En la presente memoria, la expresión "unidad no de ANB" se refiere a un nucleósido diferente de una unidad de ANB, es decir, la expresión "unidad no de ANB" incluye una unidad de ADN así como una unidad de ARN. Una unidad no de ANB preferente es una unidad de ADN.

- 25 Los términos "unidad", "residuo" y "monómero" en la presente memoria se utilizan intercambiamente.

- En el presente contexto, el término "conjugado" pretende indicar una molécula heterogénea formada mediante unión covalente de un oligonucleótido tal como se indica en la presente memoria a una o más fracciones no nucleótidas o no polinucleótidas. Entre los ejemplos de fracciones no nucleótidas o no polinucleótidas se incluyen agentes macromoleculares tales como proteínas, cadenas de ácido graso, residuos sacáridos, glucoproteínas, polímeros o combinaciones de los mismos. Típicamente las proteínas pueden ser anticuerpos para una proteína diana. Los polímeros típicos pueden ser polietilenglicol.

- 35 La expresión "por lo menos uno" comprende un número entero superior o igual a 1, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc.

- Los términos "un" y "una", tal como se utilizan en referencia a un nucleótido, agente, unidad de ANB, etc., pretenden referirse a uno o más. En particular, la expresión "un componente (tal como un nucleótido, un agente, una unidad de ANB o similar) seleccionado de entre el grupo que consiste de..." pretende referirse a que puede seleccionarse uno o más de los componentes citados. De esta manera, expresiones como "un componente seleccionado de entre el grupo que consiste de A, B y C" pretende incluir todas las combinaciones de A, B y C, es decir, A, B, C, A+B, A+C, B+C y A+B+C.

- 45 La expresión "unidad de tio-ANB" se refiere a una unidad de ANB en la que X en el Esquema 1 es S. Una unidad de tio-ANB puede encontrarse tanto en forma beta-D como en forma alfa-L. Generalmente, la forma beta-D de la unidad de tio-ANB resulta preferente. La forma beta-D y la forma alfa-D de una unidad de tio-ANB se muestran en el Esquema 3 como compuestos 3A y 3B, respectivamente.

- 50 La expresión "unidad amino-ANB" se refiere a una unidad de ANB en la que X en el Esquema 1 es  $\text{NH}$  o  $\text{NR}^{\text{H}}$ , en la que  $\text{R}^{\text{H}}$  es hidrógeno o alquilo  $\text{C}_{1-4}$ . Una unidad de amino-ANB puede encontrarse tanto en forma beta-D como en forma alfa-L. Generalmente, la forma beta-D de la unidad de amino-ANB resulta preferente. La forma beta-D y la forma alfa-D de una unidad de amino-ANB se muestran en el Esquema 4 como compuestos 4A y 4B, respectivamente.

La expresión "unidad de oxi-ANB" se refiere a una unidad de ANB en la que X en el Esquema 1 es O. Una unidad de oxi-ANB puede encontrarse tanto en forma beta-D como en forma alfa-L. Generalmente, la forma beta-D de la unidad de oxi-ANB resulta preferente. La forma beta-D y la forma alfa-D de una unidad de oxi-ANB se muestran en el Esquema 5 como compuestos 5A y 5B, respectivamente.

En el presente contexto, el término "alquilo C<sub>1-6</sub>" pretende referirse a una cadena de hidrocarburo saturado lineal o ramificado en el que las cadenas más largas presentan entre uno y seis átomos de carbono, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo y hexilo. Una cadena de hidrocarburo ramificado pretende referirse a un alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido en cualquier carbono con una cadena hidrocarburo.

En el presente contexto, el término "alquilo C<sub>1-4</sub>" pretende referirse a una cadena de hidrocarburo saturado lineal o ramificado en el que las cadenas más largas presentan entre uno y cuatro átomos de carbono, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo. Una cadena de hidrocarburo ramificado pretende referirse a un alquilo C<sub>1-4</sub> sustituido en cualquier carbono con una cadena hidrocarburo.

Al utilizarse en la presente memoria el término "alcoxi C<sub>1-6</sub>" pretende referirse a alquilo C<sub>1-6</sub>, tal como metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, pentoxi, isopentoxi, neopentoxi y hexoxi.

En el presente contexto, el término "alqueno C<sub>2-6</sub>" pretende referirse a un grupo de hidrocarburo lineal o ramificado que presenta entre dos y seis átomos de carbono y que contiene uno o más dobles enlaces. Entre los ejemplos ilustrativos de grupos de alqueno C<sub>2-6</sub> se incluyen alilo, homoalilo, vinilo, crotilo, butenilo, butadienilo, pentenilo, pentadienilo, hexenilo y hexadienilo. La posición de la insaturación (el doble enlace) puede encontrarse en cualquier posición a lo largo de la cadena de carbonos.

En el presente contexto, el término "alquino C<sub>2-6</sub>" pretende referirse a un grupo de hidrocarburo lineal o ramificado que contiene entre dos y seis átomos de carbono y que contiene uno o más triples enlaces. Entre los ejemplos de alquino C<sub>2-6</sub> se incluyen acetileno, propinilo, butinilo, pentinilo y hexinilo. La posición de la insaturación (el triple enlace) puede encontrarse en cualquier posición a lo largo de la cadena de carbonos. Más de un enlace puede ser insaturado, de manera que el "alquino C<sub>2-6</sub>" es un diino o enediino, tal como es conocido por el experto en la materia.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "hibridación" se refiere a enlaces de hidrógeno, que puede ser de Watson-Crick, Hoogsteen, enlaces de hidrógeno de Hoogsteen invertidos, etc. entre nucleósidos o bases nucleótidas complementarias. Las cuatro nucleobases que se encuentran comúnmente en el ADN son G, A, T y C, de las que G se empareja con C, y A se empareja con T. En el ARN, la T ha sido sustituida por uracilo (U), que se empareja con A. Los grupos químicos en las nucleobases que participan en la formación de dúplex estándar constituyen la cara de Watson-Crick. Hoogsteen demostró un par de años después que las nucleobases purina (G y A) además de su cara de Watson-Crick presentan una cara de Hoogsteen que puede ser reconocida desde el exterior de un dúplex y utilizarse para unir oligonucleótidos pirimidina mediante enlace de hidrógeno, formando de esta manera una estructura de triple hélice.

En el contexto de la presente invención, el término "complementario" se refiere a la capacidad de apareamiento preciso mutuo entre dos secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, en el caso de que un nucleótido en una posición determinada de un oligonucleótido sea capaz de enlace de hidrógeno con un nucleótido en la posición correspondiente de una molécula de ADN o ARN, el oligonucleótido y el ADN o ARN se considera que son complementarios entre sí en esa posición. Las cadenas de ADN o ARN se consideran complementarios entre sí en el caso de que un número suficiente de nucleótidos en el oligonucleótido pueda formar enlaces de hidrógeno con nucleótidos correspondientes en el ADN o ARN diana para permitir la formación de un complejo estable. Para ser estable in vitro o in vivo, la secuencia de un oligonucleótido no necesita ser complementaria al 100% respecto a su microARN diana. Los términos "complementario" y "específicamente hibridable" implican, de esta manera, que el oligonucleótido se une de manera suficientemente fuerte y específica a la molécula diana, proporcionando la interferencia deseada con la función normal de la diana, sin afectar simultáneamente a la función de los ARN no diana.

En un ejemplo preferente, el oligonucleótido de la invención es complementario al 100% respecto a una secuencia de microARN humano, tal como una de las secuencias de microARN a las que se hace referencia en la presente memoria.

En un ejemplo preferente, el oligonucleótido de la invención comprende una secuencia contigua que es 100% complementaria a la región núcleo de la secuencia de microARN humano.

Los microARN son ARN no codificantes cortos que se derivan de genes endógenos, que actúan como reguladores post-transcripcionales de la expresión génica. Se procesan a partir de precursores de tipo horquilla más largos (aproximadamente 70 a 80 nt) denominados pre-ARNmi, por el enzima de ARNasa III Dicer. Los microARN se ensamblan en complejos de ribonucleoproteína denominados RNPmi y reconocen sus sitios diana mediante

complementariedad de antisentido, mediando de esta manera en la regulación negativa de sus genes diana. La complementariedad prácticamente perfecta o perfecta entre el ARNm y su sitio diana resulta en el corte del ARNm diana, mientras que una complementariedad limitada entre el microARN y el sitio diana resulta en la inhibición traduccional del gen diana.

5 El término "microARN" o "ARNmi" en el contexto de la presente invención se refiere a un oligonucleótido de ARN que consiste de entre 18 y 25 nucleótidos. En términos funcionales, los ARNm típicamente son moléculas de ARN endógenas reguladoras.

10 Las expresiones "microARN diana" o "ARNmi diana" o "diana de ARNm" se refieren a un microARN con una función biológica en las enfermedades humanas, por ejemplo un ARNm oncogénico regulado positivamente o un ARNm supresor tumoral en el cáncer, siendo de esta manera una diana para la intervención terapéutica de la enfermedad en cuestión.

15 Las expresiones "gen diana" o "ARNm diana" se refieren a dianas de ARNm reguladores de los microARN en los que dicho "gen diana" o "ARNm diana" se encuentra regulado post-transcripcionalmente por el microARN basado en una complementariedad prácticamente perfecta o perfecta entre el ARNm y su sitio diana, resultando en el corte del ARNm diana, o en una complementariedad perfecta, con frecuencia denominada complementariedad entre la denominada secuencia núcleo (nucleótidos 2 a 7 del ARNm) y el sitio diana, resultando en la inhibición traduccional del ARNm diana.

20 En el contexto de la presente invención, el oligonucleótido es de cadena sencilla; ello se refiere a la situación en la que el oligonucleótido se encuentra presente en ausencia de un oligonucleótido complementario, es decir, no es un complejo de oligonucleótidos de doble cadena, tal como un ARNip. En una realización, la composición según la invención no comprende un oligonucleótido adicional que presenta una región de complementariedad con el oligonucleótido de cadena sencilla de cinco o más nucleobases consecutivas, tal como ocho o más, o 12 o más nucleobases consecutivas. Se considera que el oligonucleótido adicional no se encuentra unido covalentemente al oligonucleótido de cadena sencilla.

25 *Oligonucleótidos que contienen ANB de la invención*

Aunque las unidades de ANB y las unidades no de ANB pueden combinarse de varias maneras para formar oligonucleótidos, los inventores de la presente invención han encontrado inesperadamente que una determinada secuencia nuclear de ADN y una determinada presencia de unidades de ANB en dicha secuencia de ADN resulta en una inhibición particularmente elevada del microARN. Esta presencia de unidades de ANB en dicha secuencia nuclear de los oligonucleótidos de la presente invención convierte a dichos oligonucleótidos en altamente resistentes a nucleasas.

30 Los nucleótidos fuera de la secuencia nuclear pueden ser unidades de ANB y/o unidades no de ANB. En una realización, las unidades no de ANB fuera de la secuencia nuclear son unidades de ADN.

#### La secuencia nuclear

35 Con el fin de que los oligonucleótidos antisentido de la presente invención inhiban sus microARN diana tan eficientemente como resulte posible, debe existir un determinado grado de complementariedad entre el oligonucleótido antisentido de la presente invención y el microARN diana correspondiente.

40 Resulta particularmente importante que los oligonucleótidos de la presente invención sean complementarios a las posiciones 3 a 8, contando desde el extremo 5', del microARN diana correspondiente. El nucleótido 1, contando desde el extremo 5', en algunos de los microARN diana es una base que no se aparea y con toda probabilidad se encuentra oculta en un bolsillo de unión en la proteína Ago 2. De acuerdo con lo anterior, el oligonucleótido de la invención puede presentar o no un nucleótido en la posición 1, contando desde el extremo 3', correspondiente al nucleótido 1, contando desde el extremo 5', del microARN diana correspondiente. En algunos casos, los primeros dos nucleótidos, contando desde el extremo 5', del microARN diana correspondiente pueden dejarse no apareados.

45 Por lo tanto, la secuencia nuclear de los oligonucleótidos de la presente invención es una secuencia de ADN entre las posiciones uno y seis, dos a siete o tres a ocho, contando desde el extremo 3', correspondiendo a las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 5', del microARN diana correspondiente.

50 miR-122a

Otro microARN diana interesante es miR-122a. La secuencia de miR-122a entre las posiciones tres y ocho, contando desde el extremo 5', es gagugu (ver la entrada de miRBase HGNC:MIRN122A). La secuencia de ADN correspondiente es ctcaca.

55 Modificación de nucleótidos en la secuencia nuclear

Tal como se ha indicado anteriormente, en la secuencia nuclear de los oligonucleótidos de la presente invención se han sustituido tres unidades de ADN en dicha secuencia por sus unidades de ANB correspondientes. Los presentes inventores han encontrado además que la inhibición de los microARN diana puede incrementarse adicionalmente garantizando que dos unidades de ANB en dicha secuencia nuclear se encuentran separadas por como mínimo una unidad de ADN.

Las unidades no de ANB son unidades de ANB, el oligonucleótido según la presente invención contiene 15 nucleótidos y el patrón de sustitución, partiendo del extremo 3', es XXxXxXxxXXxxXxX, en la que "X" se refiere a una unidad de ANB y "x" se refiere a una unidad no de ANB. La secuencia preferente para dicha realización, partiendo del extremo 3', es CCtCaCacTGtAcC, en la que una letra mayúscula se refiere a una base nitrogenada en una unidad de ANB y una letra minúscula se refiere a una base nitrogenada en una unidad no de ANB.

#### Modificación del grupo de enlace entre nucleósidos

Los grupos de enlace entre nucleósidos típicos en los oligonucleótidos son los grupos fosfato, aunque estos pueden sustituirse por grupos de enlace entre nucleósidos que no son fosfatos. En una realización interesante adicional de la invención, el oligonucleótido de la invención se modifica en la estructura de grupos de enlace entre nucleósidos del mismo, es decir, el oligonucleótido modificado comprende un grupo de enlace entre nucleósidos que difiere del fosfato. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en una realización preferente, el oligonucleótido según la presente invención comprende por lo menos uno de los ejemplos específicos de grupo de enlace entre nucleósidos que difieren del fosfato (-O-P(O)<sub>2</sub>-O-), de entre: -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)<sub>2</sub>-O-, -S-P(O)<sub>2</sub>-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)<sub>2</sub>-O-, -O-P(O)<sub>2</sub>-S-, -O-P(O,S)-S-, -S-P(O)<sub>2</sub>-S-, -O-PO(R<sup>H</sup>)-O-, O-PO(OCH<sub>3</sub>)-O-, -O-PO(NR<sup>H</sup>)-O-, -O-PO(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S-R)-O-, -O-PO(BH<sub>3</sub>)-O-, -OPO(NHR<sup>H</sup>)-O-, -O-P(O)<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-, -NR<sup>H</sup>-P(O)<sub>2</sub>-O-, -NR<sup>H</sup>-CO-O-, -NR<sup>H</sup>-CO-NR<sup>H</sup>-, -O-CO-O-, -O-CO-NR<sup>H</sup>-, -NR<sup>H</sup>-CO-CH<sub>2</sub>-, -O-CH<sub>2</sub>-CO-NR<sup>H</sup>-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-, -CO-NR<sup>H</sup>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-CO-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, -S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, -S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CO-NR<sup>H</sup>-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-CO-, -CH<sub>2</sub>-NCH<sub>3</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, en donde R<sup>H</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1-4</sub>.

En el caso de que se modifique un grupo de enlace entre nucleósidos, el grupo de enlace entre nucleósidos preferentemente es un grupo fosforotioato (-O-P(O,S)-O-). En una realización preferente, todos los grupos de enlace entre nucleósidos de los oligonucleótidos según la presente invención son fosforotioato.

#### Diseños de microARN específicos

La tabla a continuación proporciona ejemplos de oligonucleótidos según la presente invención, tales como los utilizados en composiciones farmacéuticas, en comparación con moléculas del tipo de la técnica anterior.

|                                                    |                              |              |
|----------------------------------------------------|------------------------------|--------------|
| diana: hsa-miR-122a MIMAT0000421                   |                              | SEC ID       |
| uggagugugacaaugguguuugu                            |                              | SEC ID nº 1  |
| Cribado en línea celular HUH-7 que expresa miR-122 |                              |              |
| Nº de oligo, microARN diana, secuencia de oligo    | Diseño                       |              |
| diana: hsa-miR-122a MIMAT0000421                   |                              | SEC ID       |
| 3962:miR-122 5'-ACAAacaccattgtcacacTCCA-3'         | Complemento completo, hueco  | SEC ID nº 11 |
| 3965:miR-122 5'-acaacACCATTTGTcacactcca-3'         | Complemento completo, bloque | SEC ID nº 12 |
| 3972:miR-122 5'-acAaaCacCatTgtCacActCca-3'         | Complemento completo, ANB_3  | SEC ID nº 13 |
| 3549 (3649):miR-122 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3'          | Nuevo diseño                 | SEC ID nº 14 |
| 3975:miR-122 5'-CcAtTGTcaCACTCC-3'                 | Nuevo diseño mejorado        | SEC ID nº 15 |
| 3975':miR-122 5'-ATTGTcACACTCC-3'                  | ED-13mero                    | SEC ID nº 16 |
| 3975'':miR-122 5'-TGTcACACTCC-3'                   | ED-11mero                    | SEC ID nº 17 |
| 3549' (3649):miR-122 5' CCMATMTMGTCMAMCAMCTMCC-3'  | Nuevo diseño -2'MOE          | SEC ID nº 18 |
| 3549'' (3649):miR-122 5' CCFATFTFGTCFAFCACTFCC-3'  | Nuevo diseño -2'Fluoro       | SEC ID nº 19 |
|                                                    |                              |              |
| diana: hsa-miR-19b MIMAT0000074                    |                              |              |
| ugugcaaaaucaugcaaaacuga                            |                              | SEC ID nº 2  |
| línea celular HeLa cribada que expresa miR-19b     |                              |              |
| nº de oligo, microARN diana, secuencia de oligo    | Diseño                       |              |
| 3963:miR-19b 5'-TCAGttttgcatggattgCACA-3'          | Complemento completo, hueco  | SEC ID nº 20 |
| 3967:miR-19b 5'-tcagttTTGCATGGattgcaca-3'          | Complemento completo, bloque | SEC ID nº 21 |
| 3973:miR-19b 5'-tcAgtTttGcaTggAttTgcAca-3'         | Complemento completo, ANB_3  | SEC ID nº 22 |

|                                                                              |                              |              |
|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|--------------|
| 3560:miR-19b 5'-TgCatGGatTtGcAC-3'                                           | Nuevo diseño                 | SEC ID nº 23 |
| 3976:miR-19b 5'-TgCaTGGatTTGcAC-3'                                           | Nuevo diseño mejorado        | SEC ID nº 24 |
| 3976':miR-19b 5'-CaTGGaTTTGcAC-3'                                            | ED-13mero                    | SEC ID nº 25 |
| 3976":miR-19b 5'-TGGaTTTGcAC-3'                                              | ED-11mero                    | SEC ID nº 26 |
| 3560':miR-19b 5' TGMCA <sup>M</sup> MTMG <sup>M</sup> AMTMTMGCMAC-3'         | Nuevo diseño -2'MOE          | SEC ID nº 27 |
| 3560":miR-19b 5'-TGFC <sup>A</sup> FTFGG <sup>A</sup> FTFTTGCFAC-3'          | Nuevo diseño -2'MOE          | SEC ID nº 28 |
| diana: hsa-miR-155 MIMAT0000646                                              |                              |              |
| uuaugcuaaucgugauagggg                                                        |                              | SEC ID nº 3  |
| criado en línea celular 518A2 que expresa miR-155                            |                              |              |
| nº de oligo, microARN diana, secuencia de oligo                              | Diseño                       |              |
| 3964:miR-155 5'-CCCCtatcacgattagcaTTAA-3'                                    | Complemento completo, hueco  | SEC ID nº 29 |
| 3968:miR-155 5'-cccctaTCACGATTtagcattaa-3'                                   | Complemento completo, bloque | SEC ID nº 30 |
| 3974:miR-155 5'-cCccTatCacGatTagCatTaa-3'                                    | Complemento completo, ANB_3  | SEC ID nº 31 |
| 3758: miR-155 5'-TcAcgATtaGcAtTA-3'                                          | Nuevo diseño                 | SEC ID nº 32 |
| 3818: miR-155 5'-TcAcGATtaGCA <sup>A</sup> tTA-3'                            | Nuevo diseño mejorado        | SEC ID nº 33 |
| 3818': miR-155 5'-ACGATtAGCA <sup>A</sup> tTA-3'                             | ED-13mero                    | SEC ID nº 34 |
| 3818": miR-155 5'-GATtAGCA <sup>A</sup> tTA-3'                               | ED-11mero                    | SEC ID nº 35 |
| 3758': miR-155 5'-TCMAC <sup>M</sup> MG <sup>M</sup> MATTAMGCMATMTA-3'       | Nuevo diseño -2'MOE          | SEC ID nº 36 |
| 3758": miR-155 5'-TCFAC <sup>F</sup> GFATTFAFGCFATFTA-3'                     | Nuevo diseño -2'Fluoro       | SEC ID nº 37 |
| diana: hsa-miR-21 MIMAT0000076                                               |                              |              |
| uagcuauacagacugauguuga                                                       |                              | SEC ID nº 4  |
| miR-21 5'-TCAACatcagctctgataaGCTA -3'                                        | Complemento completo, hueco  | SEC ID nº 38 |
| miR-21 5'-tcaacaTCAGTCTGataagcta -3'                                         | Complemento completo, bloque | SEC ID nº 39 |
| miR-21 5'-tcAtcAtcAgtCtgAtaAGcTt -3'                                         | Complemento completo, ANB_3  | SEC ID nº 40 |
| miR-21 5'-TcAgtCTgaTaAgCT -3'                                                | Nuevo diseño                 | SEC ID nº 41 |
| miR-21 5'-TcAgTCTgTAAGCT -3'-                                                | Nuevo diseño mejorado        | SEC ID nº 42 |
| miR-21 5'-AGTCTgATAAGCT-3'-                                                  | ED-13mero                    | SEC ID nº 43 |
| miR-21 5'-TCTgAtAAGCT -3'-                                                   | ED-11mero                    | SEC ID nº 44 |
| miR-21 5'-TCMAGMTMCTGMAMTAMAGMCT -3'                                         | Nuevo diseño -2'MOE          | SEC ID nº 45 |
| miR-21 5'-TCFAGTFTCTGFAFTAFAAGFCT-3'                                         | Nuevo diseño -2'Fluoro       | SEC ID nº 46 |
| diana: hsa-miR-375 MIMAT0000728                                              |                              |              |
| uuuguucguucggcucgcguga                                                       |                              | SEC ID nº 5  |
| miR-375 5'-TCTCgcggtgccgttcgttCTTT -3'                                       | Complemento completo, hueco  | SEC ID nº 47 |
| miR-375 5'-tctcgcGTCCGTTcgttcttt -3'                                         | Complemento completo, bloque | SEC ID nº 48 |
| miR-375 5'-tcTcgCgtGccGttCgtTctTt -3'                                        | Complemento completo, ANB_3  | SEC ID nº 49 |
| miR-375 5'-GtGccGTtcGtTcTT 3'                                                | Nuevo diseño                 | SEC ID nº 50 |
| miR-375 5'-GtGcCGTtcGTTcTT 3'                                                | Nuevo diseño mejorado        | SEC ID nº 51 |
| miR-375 5'-GCCGTtCgTTCTT 3'                                                  | ED-13mero                    | SEC ID nº 52 |
| miR-375 5'-CGTTcGTTCTT 3'                                                    | ED-11mero                    | SEC ID nº 53 |
| miR-375 5'-GTMGCMCMGTTMCMGMTMCMTT 3'                                         | Nuevo diseño -2'MOE          | SEC ID nº 54 |
| miR-375 5'-GTFGCF <sup>F</sup> GTTF <sup>F</sup> CFGTFTCF <sup>F</sup> TT 3' | Nuevo diseño -2'Fluoro       | SEC ID nº 55 |

Las letras mayúsculas sin un superíndice M o F se refieren a unidades de ANB. Letra minúscula=ADN, excepto la letra minúscula en negrita, que es =ARN. Las citosinas de ANB pueden opcionalmente estar metiladas. Las letras mayúsculas seguidas de un superíndice M se refieren a las unidades de 2'OMe-ARN. Las letras mayúsculas seguidas de un superíndice F se refieren a unidades de 2'fluoro-ADN, las letras minúsculas se refieren a ADN. Los oligos anteriormente indicados pueden en una realización ser enteramente fosforotioato, pero pueden utilizarse otros enlaces de nucleobase tales como los indicados en la presente memoria. En una realización, los enlaces de nucleobases son todos fosfodiéster. Se considera que para la utilización en el cerebro/médula espinal, resulta preferible utilizar enlaces fosfodiéster, por ejemplo para la utilización de antimiR con diana en miR21.

El oligonucleótido según la presente invención CcAttGTcaCaCtCC (SEC ID nº 99), 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, refiriéndose una C mayúscula a <sup>Me</sup>C.

## 5 Conjugados

La invención proporciona además conjugados que comprenden el oligonucleótido según la invención.

10 En una realización de la invención, el compuesto oligomérico se une a ligandos/conjugados, que pueden utilizarse, por ejemplo, para incrementar la incorporación celular de oligonucleótidos antisentido. Dicha conjugación puede tener lugar en las posiciones terminales 5'/3'-OH, aunque los ligandos también pueden en los azúcares y/o las bases. En particular, el factor de crecimiento con el que puede conjugarse el oligonucleótido antisentido, puede comprender transferrina o folato. Los complejos de transferrina-polilisina-oligonucleótido o los complejos de folato-polilisina-oligonucleótido pueden prepararse para la incorporación por las células que expresan niveles elevados de receptor de transferrina o folato. Otros ejemplos de conjugados/ligandos son las fracciones de colesterol, intercalantes de dúplex tales como acridina, poli-L-lisina, "adición terminal de caperuzas" con uno o más grupos de unión resistentes a nucleasas, tales como fosforomonotioato y similares. La invención proporciona además un conjugado que comprende el compuesto según la invención tal como se indica en la presente memoria y por lo menos una fracción no nucleótida o no polinucleótida unida covalentemente a dicho compuesto. Por lo tanto, en una realización en la que el compuesto de la invención consiste de un ácido nucleico especificado, tal como se da a conocer en la presente memoria, el compuesto puede comprender además por lo menos una fracción no nucleótida o no polinucleótida (por ejemplo que no comprende uno o más nucleótidos o análogos de nucleótido) unidos covalentemente a dicho compuesto. La fracción no nucleobase puede ser o comprender, por ejemplo, un esteroide, tal como colesterol.

25 Por lo tanto, se reconocerá que el oligonucleótido de la invención, tal como el oligonucleótido utilizado en formulaciones farmacéuticas (terapéuticas), puede comprender componentes no nucleobases adicionales, tales como los conjugados definidos en la presente memoria.

## 30 La unidad de ANB

En una realización preferente, la unidad de ANB presenta la estructura química general mostrada en el Esquema 1, a continuación:

**Esquema 1**



**1A**

**1B**

35 en la que:

X se selecciona de entre el grupo que consiste de O, S y NR<sup>H</sup>, en el que R<sup>H</sup> es H o alquilo C<sub>1-4</sub>,  
Y es (-CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, en el que r es un número entero entre 1 y 4, y  
B es una base nitrogenada.

40 En una realización preferente de la invención, r es 1 o 2, en particular 1, es decir, una unidad de ANB preferente presenta la estructura química mostrada en el Esquema 2, a continuación:

**Esquema 2**



**2A**

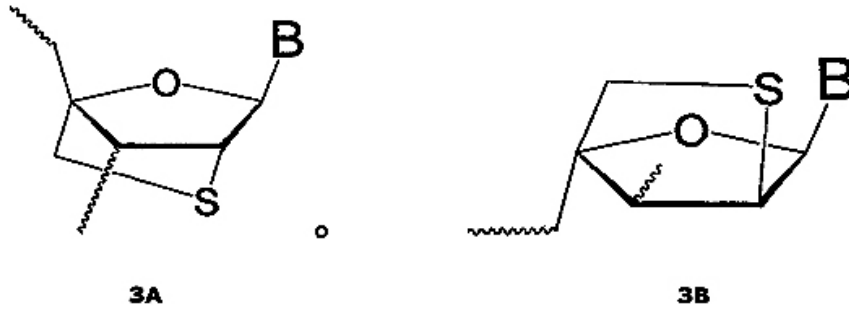
**2B**

en la que X y B son tal como se ha definido anteriormente.

En una realización interesante, las unidades de ANB incorporados en los oligonucleótidos de la invención se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste de unidades tio-ANB, unidades amino-ANB y unidades oxi-ANB.

De esta manera, la unidad de tio-ANB presenta la estructura química mostrada en el Esquema 3, a continuación:

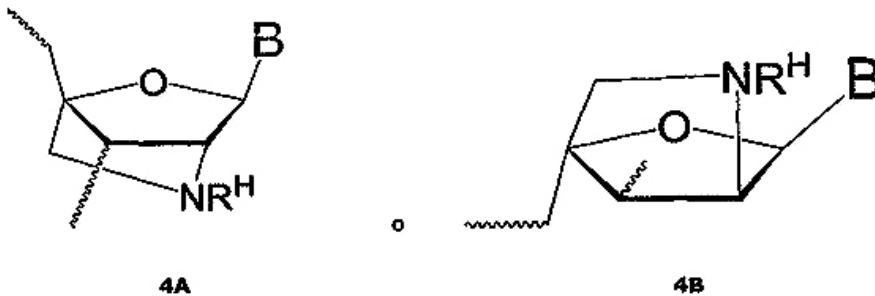
**Esquema 3**



en la que B es tal como se ha definido anteriormente.

Preferentemente, la unidad de tio-ANB se encuentra en su forma beta-D, es decir, que presenta la estructura mostrada en 3A, anteriormente. De manera similar, la unidad amino-ANB puede presentar la estructura química mostrada en el Esquema 4, a continuación:

**Esquema 4**

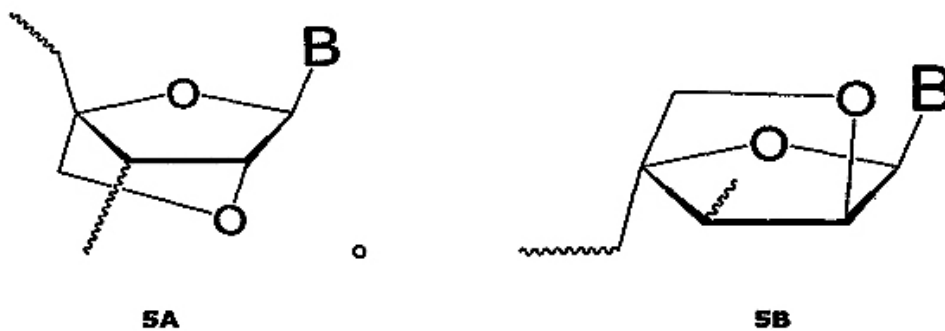


en la que B y  $R^H$  son tal como se ha definido anteriormente.

Preferentemente, la unidad amino-ANB se encuentra en su forma beta-D, es decir, presenta la estructura mostrada en 4A, anteriormente.

La unidad de oxi-ANB presenta la estructura química mostrada en el Esquema 5, a continuación:

**Esquema 5**



en la que B es tal como se ha definido anteriormente.

Preferentemente, la unidad de oxi-ANB se encuentra en su forma beta-D, es decir, presenta la estructura mostrada en 5A, anteriormente.

Tal como se ha indicado anteriormente, B es una base nitrogenada que puede ser de origen natural o no natural.

5 Entre los ejemplos específicos de bases nitrogenadas se incluyen adenina (A), citosina (C), 5-metilcitosina (MeC), isocitosina, pseudoisocitosina, guanina (G), timina (T), uracilo (U), 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 5-propinil-6, 5-metilthiazoluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, 2,6-diaminopurina, 7-propin-7-deaza-adenina, 7-propin-7-deaza-guanina y 2-cloro-6-aminopurina.

## 10 Grupos terminales

Entre los ejemplos específicos de grupos terminales se incluyen grupos terminales seleccionados de entre el grupo que consiste de hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, prot-O-, act-O-, mercapto, prot-S-, act-S-, alquiltio C<sub>1-6</sub>, amino, prot-N(R<sup>H</sup>)-, act-N(R<sup>H</sup>)-, mono- o di-(alquil C<sub>1-6</sub>)amino, alcoxi C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido, alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido, alquenilo C<sub>2-6</sub> opcionalmente sustituido, alquenilo C<sub>2-6</sub> opcionalmente sustituido, alquilo C<sub>2-6</sub> opcionalmente sustituido, alquilo C<sub>2-6</sub> opcionalmente sustituido, monofosfato, incluyendo monofosfato protegido, monotiofosfato, incluyendo monotiofosfato protegido, difosfato, incluyendo difosfato protegido, ditiofosfato, incluyendo ditiofosfato protegido, trifosfato, incluyendo trifosfato protegido, tritiofosfato, incluyendo tritiofosfato protegido, en el que Prot es un grupo de protección para -OH, -SH y -NH(R<sup>H</sup>) y Act es un grupo de activación para -OH, -SH y -NH(R<sup>H</sup>), y R<sup>H</sup> es hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>.

Entre los ejemplos de grupos de protección de fosfato se incluyen S-acetiltioetilo (SATE) o S-pivaloitioetilo (t-butil-SATE).

25 Entre los ejemplos todavía adicionales de grupos terminales se incluyen intercalantes de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, ligandos, carboxi, sulfono, hidroximetilo, Prot-O-CH<sub>2</sub>-, Act-O-CH<sub>2</sub>-, aminometilo, Prot-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-, Act-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-, carboximetilo, sulfonometilo, en donde Prot es un grupo de protección para -OH, -SH y -NH(R<sup>H</sup>), y Act es un grupo de activación para -OH, -SH y -NH(R<sup>H</sup>), y R<sup>H</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1-6</sub>.

Entre los ejemplos de grupos de protección para los grupos -OH y -SH se incluyen tritilo sustituido, tal como 4,4'-dimetoxitritiloxi (DMT), 4-monometoxitritiloxi (MMT), tritiloxi, 9-(9-fenil)xanteniloxi (pixilo) opcionalmente sustituido, metoxitetrahidro-piraniloxi (mthp) opcionalmente sustituido, sililoxi, tal como trimetilsililoxi (TMS), triisopropilsililoxi (TIPS), terc-butildimetilsililoxi (TBDMS), trietilsililoxi y fenildimetilsililoxi, terc-butil-éteres, acetales (incluyendo dos grupos hidroxilo), aciloxi, tal como acetilo o acetilos sustituidos con halógenos, por ejemplo cloroacetiloxi o fluoroacetiloxi, isobutiriloxi, pivaloiloxi, benzoiloxi y benzoilos sustituidos, metoximetiloxi (MOM), éteres bencilicos o bencil-éteres sustituidos, tales como 2,6-diclorobenciloxi (2,6-Cl<sub>2</sub>BzI). Además, en el caso de que Z o Z\* sea hidroxilo, pueden protegerse mediante la unión a un soporte sólido, opcionalmente mediante un conector.

40 Entre los ejemplos de grupos de protección de amina se incluyen fluorenilmetoxycarbonilamino (Fmoc), terc-butiloxycarbonilamino (BOC), trifluoroacetilamino, aliloxycarbonilamino (alloc, AOC), Z-benciloxycarbonilamino (Cbz), benciloxycarbonilamino sustituido, tal como 2-cloro-benciloxycarbonilamino (2-ClZ), monometoxitritilamino (MMT), dimetoxitritilamino (DMT), ftaloilamino y 9-(9-fenil)xantenilamino (pixilo).

45 El grupo de activación preferentemente media en los acoplamientos con otros residuos y/o monómeros nucleótidos y tras completarse el acoplamiento, el grupo de activación típicamente se convierte en un enlace entre nucleósidos. Entre los ejemplos de dichos grupos de activación se incluyen O-fosforamidita opcionalmente sustituida, O-fosfortriéster opcionalmente sustituido, O-fosforodiéster opcionalmente sustituido, H-fosfonato opcionalmente sustituido y O-fosfonato opcionalmente sustituido. En el presente contexto, el término "fosforamidita" se refiere a un

50 grupo de fórmula  $-P(OR^x)-N(R^y)_2$ , en la que  $R^x$  se refiere a un grupo alquilo opcionalmente sustituido, por ejemplo metilo, 2-cianoetilo o bencilo, y cada  $R^y$  se refiere a grupos alquilo opcionalmente sustituidos, por ejemplo etilo o isopropilo, o el grupo  $-N(R^y)_2$  forma un grupo morfolino ( $-N(CH_2CH_2)_2O$ ).  $R^x$  preferentemente se refiere a 2-cianoetilo y los dos  $R^y$  preferentemente son idénticos y se refieren a isopropilo. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, una fosforamidita particularmente preferente es N,N-diisopropil-O-(2-cianoetil)-fosforamidita.

55 Los grupos terminales más preferentes son hidroxilo, mercapto y amino, en particular hidroxilo.

### Terapia y composiciones farmacéuticas

60 Tal como se ha explicado inicialmente, los oligonucleótidos de la invención constituyen fármacos adecuados con propiedades mejoradas. El diseño de un fármaco potente y seguro requiere el ajuste fino de diversos parámetros, tales como afinidad/especificidad, estabilidad en líquidos biológicos, incorporación celular, modo de acción, propiedades farmacocinéticas y toxicidad.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido según la invención y a un diluyente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, dicho portador es solución salina o solución salina tamponada.

- 5 En un aspecto todavía adicional, la presente invención se refiere a un oligonucleótido según la presente invención para la utilización como medicamento.

10 Tal como se entenderá, la dosis es dependiente de la gravedad y sensibilidad del estado de enfermedad que debe tratarse, y el curso de tratamiento dura entre varios días y varios meses, o hasta que se consigue la curación o la disminución del estado de enfermedad. Pueden calcularse los programas de administración óptimos para mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Las dosis óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los oligonucleótidos individuales. Generalmente puede estimarse basándose en las EC<sub>50</sub> que se ha observado que resultan eficaces en modelos animales in vitro e in vivo. En general, la dosis es de entre 0,01 mg y 1 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una o más veces al día, semana, mes o año, o incluso 15 una vez cada 2 a 10 años, o mediante infusión continua durante horas hasta durante varios meses. Las tasas de repetición para la administración pueden estimarse basándose en los tiempos de residencia y las concentraciones del fármaco medidos en los líquidos o tejidos corporales. Tras el tratamiento con éxito, puede resultar deseable someter al paciente a terapia de mantenimiento para evitar la recurrencia del estado de enfermedad.

## 20 Composiciones farmacéuticas

Tal como se ha indicado anteriormente, la invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende por lo menos un oligonucleótido de la invención como un ingrediente activo. Debe entenderse que la 25 composición farmacéutica según la invención comprende opcionalmente un portador farmacéutico y que la composición farmacéutica comprende opcionalmente compuestos adicionales, tales como compuestos quimioterapéuticos, compuestos antiinflamatorios, compuestos antiviricos y/o compuestos inmunomoduladores.

Los oligonucleótidos de la invención pueden utilizarse "sin modificación" o en forma de una diversidad de sales farmacéuticamente aceptables. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "sales farmacéuticamente 30 aceptables" se refiere a sales que conservan la actividad biológica deseada de los oligonucleótidos identificados en la presente memoria y muestran efectos toxicológicos no deseados mínimos. Pueden formarse ejemplos no limitativos de dichas sales con sales orgánicas de aminoácido y de adición de base formadas con cationes metálicos tales como cinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio, sodio, potasio y similares, o con un catión formado de amonio, N,N-dibenciltilen-diamina, D-glucosamina, tetraetilamonio o etilendiamina.

En una realización de la invención, el oligonucleótido puede encontrarse en forma de un profármaco. Los oligonucleótidos son iones cargados negativamente. Debido a la naturaleza lipofílica de las membranas celulares, la 35 incorporación celular de los oligonucleótidos se encuentra reducida en comparación con equivalentes neutros o lipofílicos. Este "impedimento" de la polaridad puede evitarse mediante la utilización del enfoque de profármaco (ver, por ejemplo, Crooke R.M., 1998, en: Crooke S.T. Antisense Research and Application, Springer-Verlag, Berlin, Alemania, vol. 131, páginas 103-140).

Los agentes de unión y adyuvantes farmacéuticamente aceptables pueden comprender parte del fármaco formulado.

45 Los ejemplos de métodos de administración de los agentes terapéuticos indicados en la presente memoria, así como datos de las formulaciones y sales farmacéuticas, se describen bien en otros sitios, por ejemplo en la solicitud provisional de patente US nº 60/838.710 y nº 60/788.995, que se incorporan como referencia en la presente memoria, y las solicitudes de patente danesa, nº PA 2006 00615, que se incorpora también como referencia en la 50 presente memoria.

Entre las composiciones farmacéuticas de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una diversidad de componentes, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes. La administración de fármaco en el tejido tumoral puede 55 incrementarse mediante la administración mediada por portador, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, liposomas catiónicos, ciclodextrinas, derivados de porfirina, dendrímeros de cadena ramificada, polietilenimina, polímeros, nanopartículas y microesferas (Dass C.R., J Pharm Pharmacol 54(1):3-27, 2002). Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma de administración unitaria, pueden prepararse siguiendo técnicas convencionales bien conocidas de la industria farmacéutica. Entre dichas técnicas se incluyen la etapa de asociar los ingredientes activos con el portador o portadores o excipiente o excipientes 60 farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima los ingredientes activos con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos, o ambos, y después, en caso necesario, conformando el producto. Las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de entre muchas formas de administración posibles, tales como, aunque sin limitarse a ellas, tabletas, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos y supositorios. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse en forma de suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden 65

contener además sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión puede contener además estabilizadores. Los compuestos de la invención pueden conjugarse además con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo aspirina, ibuprofeno, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

En otra realización, las composiciones de la invención pueden contener uno o más complejos de oligonucleótidos, con diana en un primer microARN, y uno o más compuestos oligonucleótidos adicionales con diana en un segundo microARN diana. Pueden utilizarse dos o más compuestos combinados, conjuntamente o secuencialmente.

Los compuestos dados a conocer en la presente memoria resultan útiles para muchas aplicaciones terapéuticas, tal como se ha indicado anteriormente. En general, entre los métodos terapéuticos de la invención se incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido en un mamífero, particularmente un ser humano. En una realización determinada, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más compuestos de la invención, y (b) uno o más agentes quimioterapéuticos. En el caso de que se utilicen con los compuestos de la invención, dichos agentes quimioterapéuticos pueden utilizarse individualmente, secuencialmente o en combinación con otro u otros de dichos agentes quimioterapéuticos o en combinación con radioterapia. Todos los agentes quimioterapéuticos conocidos por el experto en la materia se incorporan en la presente memoria como tratamientos de combinación con compuesto según la invención. También pueden combinarse en composiciones de la invención otros agentes activos, tales como fármacos antiinflamatorios, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, fármacos y corticoesteroides antiinflamatorios no esteroideos, fármacos antivíricos y fármacos inmunomoduladores. Pueden utilizarse dos o más compuestos combinados, conjuntamente o secuencialmente.

Son ejemplos de indicaciones terapéuticas que pueden tratarse con las composiciones farmacéuticas de la invención:

| microARN | Posibles indicaciones médicas                    |
|----------|--------------------------------------------------|
| miR-122  | hipercolesterolemia, hepatitis C, hemocromatosis |

En un aspecto todavía adicional, la presente invención se refiere a la utilización de un oligonucleótido según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste de: aterosclerosis, hipercolesterolemia e hiperlipemia; trastornos metabólicos.

La invención se refiere además a oligonucleótidos según la invención para la utilización en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste de: aterosclerosis, hipercolesterolemia e hiperlipemia; trastornos metabólicos;

#### Enfermedades infecciosas

Hsa-miR122 está indicado en la infección de la hepatitis C y de esta manera pueden utilizarse oligonucleótidos según la invención con diana en miR-122 para tratar la infección de hepatitis C.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en todavía otro aspecto la presente invención se refiere a la utilización de un oligonucleótido según la invención o un conjugado del mismo para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad infecciosa, así como a un método para el tratamiento de una enfermedad infecciosa, comprendiendo dicho método la administración de un oligonucleótido según la invención o un conjugado del mismo, o una composición farmacéutica según la invención en un paciente que lo requiere.

#### Enfermedades metabólicas

Una enfermedad metabólica es un trastorno causado por la acumulación de sustancias químicas producidas naturalmente en el cuerpo. Estas enfermedades habitualmente son graves, algunas incluso potencialmente letales. Otras pueden enlentecer el desarrollo físico o provocar retardo mental. La mayoría de niños con estos trastornos al principio no manifiestan signos evidentes de enfermedad. El cribado adecuado al nacer con frecuencia puede revelar estos problemas. Con el diagnóstico y tratamiento precoces, las enfermedades metabólicas con frecuencia pueden controlarse eficazmente.

En todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un oligonucleótido según la invención o un conjugado del mismo para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad metabólica, así como a un método para el tratamiento de una enfermedad metabólica, comprendiendo dicho método la administración de un oligonucleótido según la invención o un conjugado del mismo, o una composición farmacéutica según la invención en un paciente que lo requiere.

#### Trastornos hepáticos

En todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un oligonucleótido según la invención o un conjugado del mismo para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno hepático, así como a un método para el tratamiento de un trastorno hepático, comprendiendo dicho método la administración de un oligonucleótido según la invención o un conjugado del mismo, o una composición farmacéutica según la invención en un paciente que lo requiere.

En una realización preferente de la invención, el trastorno hepático se selecciona de entre el grupo que consiste de atresia biliar, síndrome de Alagille, deficiencia de antitripsina alfa-1, tirosinemia, hepatitis neonatal y enfermedad de Wilson.

## Otros usos

Los oligonucleótidos de la presente invención pueden utilizarse como reactivos de investigación para el diagnóstico, la terapéutica y la profilaxis. En investigación, el oligonucleótido puede utilizarse para inhibir específicamente la síntesis de genes diana en células y animales experimentales, facilitando de esta manera el análisis funcional de la diana o una valoración de su utilidad como diana para la intervención terapéutica. En el diagnóstico los oligonucleótidos pueden utilizarse para detectar y cuantificar la expresión de la diana en células y tejidos mediante transferencia northern, hibridación *in situ* o técnicas similares. Para la terapéutica, un animal o un ser humano que se sospecha que presenta una enfermedad o trastorno que puede tratarse mediante la modulación de la expresión de la diana se trata mediante la administración de compuestos oligonucleótidos según la presente invención. Se proporcionan además métodos de tratamiento de un animal, en particular un ratón y una rata, y de tratamiento de un ser humano que se sospecha que presenta o es propenso a presentar una enfermedad o condición asociada a la expresión de la diana, mediante la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más de los compuestos o composiciones de oligonucleótidos de la invención.

### Utilización terapéutica de oligonucleótidos con diana en miR-122a

En la sección de Ejemplos se demuestra que un ANB-antimiR™, tal como SPC3372, con diana en miR-122a, reduce los niveles plasmáticos de colesterol. Por lo tanto, otro aspecto de la invención es la utilización de los oligonucleótidos anteriormente indicados con diana en miR-122a a modo de medicina.

Todavía otro aspecto de la invención es la utilización de los oligonucleótidos anteriormente indicados con diana en miR-122a para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los niveles plasmáticos incrementados de colesterol. El experto en la materia apreciará que los niveles plasmáticos incrementados de colesterol no son deseables, ya que incrementan el riesgo de diversas condiciones, por ejemplo la aterosclerosis.

Todavía otro aspecto de la invención es la utilización de los oligonucleótidos anteriormente indicados con diana en miR-122a para la regulación positiva de los niveles de ARNm de Nrdg3, Aldo A, Bckdk o CD320.

## Realizaciones adicionales:

Las realizaciones a continuación pueden combinarse con otras realizaciones de la invención tal como se indican en la presente memoria:

1. El oligonucleótido de la invención presenta la unidad de secuencia siguiente (SEC ID nº 99) y una letra mayúscula identifica la base nitrogenada de una unidad de ANB, o un conjugado del mismo (SEC ID nº 82 a nº 89)  $^{Me}C_cAttGTc_a^{Me}Ca^{Me}Ct^{Me}C^{Me}C$ , en la que una letra minúscula identifica una base nitrogenada de una unidad de ADN y una letra mayúscula identifica la base nitrogenada de una unidad de ANB, o un conjugado de las mismas.

2. La invención proporciona el oligonucleótido según las realizaciones anteriores o un conjugado de los mismos, en los que el oligonucleótido comprende por lo menos un grupo de enlace entre nucleósidos que difiere del fosfodiéster.

3. El oligonucleótido según la realización 2 o un conjugado del mismo, en el que dicho grupo de enlace entre nucleósidos, que difiere del fosfodiéster, es fosforotioato. 4. El oligonucleótido según la realización 3 o un conjugado del mismo, en el que todos los grupos de enlace entre nucleósidos son fosforotioato.

5. El oligonucleótido según cualquiera de las 6 realizaciones o un conjugado del mismo, en el que dichas unidades de ANB se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste de unidades de tio-ANB,

6. El oligonucleótido según la realización 5 o un conjugado del mismo, en el que dichas unidades de ANB se encuentran en la forma beta-D.

7. El oligonucleótido según la realización 6 o un conjugado del mismo, en el que dichas unidades de ANB son unidades de oxi-ANB en la forma beta-D.

8. El oligonucleótido según cualquiera de las realizaciones anteriores o un conjugado del mismo para la utilización como medicamento.

9. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido según cualquiera de las realizaciones 1 a 6 o un conjugado del mismo y un portador farmacéuticamente aceptable.

10. La composición según la realización 9, en la que dicho portador es solución salina o solución salina tamponada.

11. Un método para el tratamiento del cáncer, que comprende la etapa de administrar un oligonucleótido según cualquiera de las realizaciones 1 a 6 o un conjugado del mismo, o una composición según la realización 9.

12. Utilización de un oligonucleótido según cualquiera de las realizaciones 1 a 6 o un conjugado del mismo, o una composición según la realización 9 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de niveles plasmáticos incrementados de colesterol.

5 13. Utilización de un oligonucleótido según cualquiera de las realizaciones 1 a 6 o un conjugado del mismo, o una composición según la realización 9 para la regulación positiva de los niveles de ARNm de Nrdg3, Aldo A, Bckdk o CD320.

## PARTE EXPERIMENTAL

### 10 **Ejemplo 1: síntesis de monómeros**

Los bloques constructivos de monómero de ANB y derivados del mismo se prepararon siguiendo procedimientos publicados y referencias citadas en los mismos; ver, por ejemplo, el documento nº WO 03/095467 A1 y D.S. Pedersen, C. Rosenbohm, T. Koch, Preparation of LNA Phosphoramidites, Synthesis 6:802-808, 2002.

### 15 **Ejemplo 2: síntesis de oligonucleótidos**

Se sintetizaron oligonucleótidos utilizando el enfoque de fosforamidita en un sintetizador Expedite 8900/MOSS (sistema de síntesis de múltiples oligonucleótidos) a escala de 1 mmol o de 15 mmoles. Para la síntesis a escala más grande se utilizó un Akta Oligo Pilot (GE Healthcare). Al final de la síntesis (DMT-on), los oligonucleótidos se escindieron del soporte sólido utilizando amonio acuoso durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente y se desprotegeron adicionalmente durante 4 horas a 65°C. Los oligonucleótidos se purificaron mediante HPLC de fase inversa (RP-HPLC). Tras la eliminación del grupo DMT, los oligonucleótidos se caracterizaron mediante AE-HPLC, RP-HPLC y CGE y y la masa molecular se confirmó adicionalmente mediante ESIMS. Ver posteriormente para más información.

#### Preparación del ANB-soporte sólido

Preparación del ANB-succinil-hemíéster

30 Se disolvieron en DCM (35 ml) monómero 5'-O-Dmt-3'-hidroxi-ANB (500 mg), anhídrido succínico (1,2 eq.) y DMAP (1,2 eq.). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Tras las extracciones con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, pH 5,5 (2x) y solución hipersalina (1x), la capa orgánica se secó adicionalmente con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó. Se obtuvo el derivado hemíéster con un rendimiento de 95% y se utilizó sin ninguna purificación adicional.

Preparación del soporte de ANB

40 El derivado hemíéster preparado anteriormente (90 mmoles) se disolvió en una cantidad mínima de DMF, se añadió DIEA y pyBOP (90 mmoles) y se mezclaron durante 1 min. Esta mezcla preactivada se agrupó con LCAA-CPG (500 Å, tamaño de malla de 80 a 120, 300 mg) en un sintetizador manual y se agitó. Tras 1,5 horas a temperatura ambiente, se separó el soporte mediante filtración y se lavó con DMF, DCM y MeOH. Tras el secado, se determinó que la carga era de 57 mmoles/g (ver Tom Brown, Dorcas J.S. Brown. Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis. en: F.Eckstein, editor. Oligonucleotides and Analogues A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1991: 13-14).

Alargamiento del oligonucleótido

50 El acoplamiento de fosforamiditas (A(bz), G(ibu), 5-metil-C(bz), o T-β-cianoetil-fosforamidita) se llevó a cabo mediante la utilización de una solución de amidita 0,1 M protegida con 5'-O-DMT en acetonitrilo y DCI (4,5-dicianoimidazol) en acetonitrilo (0,25 M) como activador. La tiolación se llevó a cabo mediante la utilización de cloruro de xantano (0,01 M en acetonitrilo:piridina al 10%). El resto de los reactivos eran los utilizados típicamente para la síntesis de oligonucleótidos.

#### Purificación mediante RP-HPLC:

55

|           |                                            |
|-----------|--------------------------------------------|
| Columna:  | Xterra RP <sub>18</sub>                    |
| Caudal:   | 3 ml/min.                                  |
| Tampones: | acetato amónico 0,1 M, pH 8 y acetonitrilo |

Abreviaturas:

60 DMT: dimetoxitritilo  
DCI: 4,5-dicianoimidazol  
DMAP: 4-dimetilaminopiridina  
DCM: diclorometano

DMF: dimetilformamida  
 THF: Tetrahidrofurano  
 DIEA: N,N-diisopropiletilamina  
 PyBOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio  
 Bz: benzoilo  
 Ibu: isobutirilo

*Ejemplo 3: diseño de oligonucleótidos ANB anti-miR y temperaturas de fusión*

microARN diana:

miR-122a: 5'-uggagugugacaaugguguuuugu-3' SEC ID nº 1  
 miR-122a 3' a 5': 3'-uguuugugguaacagugugaggu-5' (SEC ID nº 1 orientación inversa)

Tabla 1 Secuencias de oligonucleótido ANB anti-miR y  $T_f$ :

| SEC ID nº | ID de oligo |                     | SEC ID    | Secuencia:              |              | $T_f$<br>(°C) |
|-----------|-------------|---------------------|-----------|-------------------------|--------------|---------------|
| 2         | SPC3370     | Diseño XxxX         | SEC ID 56 | 5'-cCatTgtCacActCca-3'  | Esqueleto FT | 75            |
| 3         | SPC3372     | Diseño XxxX         | SEC ID 57 | 5'-ccAttGtcAcaCtcCa-3'  | Esqueleto FT | 69            |
| 4         | SPC3375     | Gápmo               | SEC ID 58 | 5'-CCAAttgtcacacTCCa-3' | Esqueleto FT | 69            |
| 5         | SPC3549     | 15-mero             | SEC ID 59 | 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3'   | Esqueleto FT | 78            |
| 6         | SPC3550     | Control desapareado | SEC ID 60 | 5'-CcAttCTgaCcCtAC-3'   | Esqueleto FT | 32            |
| 7         | SPC3373     | Control desapareado | SEC ID 61 | 5ccAttGtcTca AtcCa-3'   | Esqueleto FT | 46            |
| 8         | SPC3548     | 13-mero             | SEC ID 62 | 5'-AttGTcaCaCtCC-3'     | Esqueleto FT |               |

minúscula: ADN; mayúscula: ANB (todas las C de ANB se encontraban metiladas); subrayados: no correspondencia

Las temperaturas de fusión se evaluaron para la secuencia miR-122a madura, utilizando un oligonucleótido de ARN de miR-122a sintético con enlaces fosforotioato.

El dúplex oligo ANB anti-miR/miR-122a se diluyó a 3  $\mu$ M en 500  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de ARNasa, que seguidamente se mezcló con 500 ml de 2x tampón de dimerización (conc. final oligo/dúplex 1,5  $\mu$ M, 2x tampón Tm: NaCl 200 mM, EDTA 0,2 mM, NaP 20 mM, pH 7,0, DEPC tratado para eliminar las ARNasas). La mezcla en primer lugar se calentó a 95 grados durante 3 minutos, después se dejó que se enfriase hasta la temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos.

Tras la incubación a TA, se midió la  $T_f$  en un espectrofotómetro de UV/VIS Lambda 40 con programador térmico de Peltier PTP6 utilizando software PE Templab (Perkin Elmer). Se elevó gradualmente la temperatura de 20°C a 95°C y después se bajó nuevamente a 20°C, registrando en continuo la absorción a 260 nm. Se utilizó la primera derivada y los máximos locales tanto de fusión como de hibridación para evaluar el punto de fusión/hibridación ( $T_f$ ); ambos deberían proporcionar valores de  $T_f$  similares/iguales. Para la primera derivada se utilizaron 91 puntos para calcular la pendiente.

Mediante la sustitución del oligonucleótido antimir y la molécula de ARN complementario, el ensayo anteriormente indicado puede utilizarse para determinar la  $T_f$  de otros oligonucleótidos, tales como los oligonucleótidos según la invención.

Sin embargo, en una realización, la  $T_f$  puede obtenerse con una molécula de ADN complementario (enlaces fosforotioato). Típicamente la  $T_f$  medida para una molécula de ADN complementaria es aproximadamente 10°C más baja que la  $T_f$  con un complemento de ARN equivalente. Por lo tanto, la  $T_f$  medida utilizando el complemento de ADN puede utilizarse en casos en los que el dúplex presenta una  $T_f$  muy elevada.

Mediciones de temperatura de fusión ( $T_f$ ):

| Oligo contra complemento de ARN miR-122 | $T_f$ |
|-----------------------------------------|-------|
| SPC3372 + miR-122a, ARN                 | 69°C  |
| SPC3648 + miR-122a, ARN                 | 74°C  |
| SPC3649 + miR-122a, ARN                 | 79°C  |

| oligo contra complemento de ADN | $T_f$ |
|---------------------------------|-------|
| SPC3372 + 122R, ADN             | 57°C  |

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| oligo contra complemento de ADN | $T_f$ |
| SPC3649 + 122R, ADN             | 66°C  |

Se reconoce que para los oligonucleótidos con una  $T_f$  muy elevada, los ensayos de  $T_f$  anteriormente indicados pueden resultar insuficientes para determinar la  $T_f$ . En este caso, la utilización de una molécula complementaria de ADN fosforotioado puede reducir adicionalmente la  $T_f$ .

La utilización de formamida es rutinaria en el análisis de la hibridación de oligonucleótidos (ver Hutton, NAR 4(10):3537-3555, 1977). En el ensayo anteriormente indicado, la inclusión de formamida al 15% típicamente reduce la  $T_f$  en aproximadamente 9°C, y la inclusión de formamida al 50% típicamente reduce la  $T_f$  en aproximadamente 30°C. Utilizando estas concentraciones, por lo tanto, resulta posible determinar la  $T_f$  comparativa de un oligonucleótido frente a la de su molécula de ARN complementaria (fosfodiéster), incluso en el caso de que la  $T_f$  del dúplex sea, por ejemplo, superior a 95°C (en ausencia de formamida).

Para oligonucleótidos con una  $T_f$  muy alta, un método alternativo para determinar la  $T_f$  es realizar titulaciones y hacerlos migrar en un gel para ver las cadenas sencillas versus los dúplex y a partir de las concentraciones y proporciones determinar la  $K_d$  (la constante de disociación), que se relaciona con  $\Delta G$  y también  $T_f$ .

#### **Ejemplo 4: estabilidad de los oligonucleótidos de ANB en plasma humano o de rata**

Se sometió a ensayo la estabilidad de los oligonucleótidos de ANB en plasma de seres humanos o ratas (también podría ser plasma de ratón, mono o perro). A 45  $\mu$ l de plasma se añadieron 5  $\mu$ l de oligonucleótido de ANB (a una concentración final de 20  $\mu$ M). Los oligonucleótidos de ANB se incubaron en plasma durante tiempos de entre 0 y 96 horas a 37°C (el plasma se sometió a ensayo para actividad de nucleasa durante hasta 96 horas y no mostraba diferencias en el patrón de corte de la nucleasa).

En el tiempo indicado, la muestra se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido. Se diluyeron 2  $\mu$ l (equivalentes a 40 pmoles) de oligonucleótido de ANB en plasma mediante la adición de 15  $\mu$ l de agua y 3  $\mu$ l de 6x pigmento de carga (Invitrogen). Como marcador se utilizó una escalera de 10 pb (Invitrogen, USA 10821-015). A 1  $\mu$ l de escalera se añadió 1  $\mu$ l de 6x pigmento de carga y 4  $\mu$ l de agua. Se mezclaron las muestras, se calentaron a 65°C durante 10 min. y se cargaron en un gel pretratado (acrilamida al 16%, UREA 7 M, 1x TBE, pretratado con 50 vatios durante 1 h) y se migraron con 50-60 vatios durante 2½ horas. A continuación, se tiñó el gel con 1x SyBR oro (sondas moleculares) en 1x TBE durante 15 min.

Las bandas se visualizaron utilizando un Phosphorimager de BioRad.

#### **Ejemplo 5: modelo in vitro: cultivo celular**

El efecto de los oligonucleótidos de ANB sobre la expresión (cantidad) de los ácidos nucleicos diana puede someterse a ensayo en cualquiera de entre una diversidad de tipos celulares, con la condición de que el ácido nucleico diana se encuentre presente a niveles medibles. La diana puede expresarse endógenamente o mediante transfección transitoria o estable de un ácido nucleico codificante de dicho ácido nucleico.

El nivel de expresión de ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente utilizando, por ejemplo, ensayos de análisis de transferencia northern (incluyendo la transferencia northern de microARN), PCR cuantitativa (incluyendo la qPCR de microARN) y ensayos de protección frente a ribonucleasas. Los tipos celulares siguientes se proporcionan con fines ilustrativos, aunque pueden utilizarse rutinariamente otros tipos celulares, con la condición de que la diana se expresa en el tipo celular seleccionado.

Se cultivaron células en el medio apropiado tal como se indica posteriormente y se mantuvieron a 37°C bajo una humedad de 95%-98% y con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se subcultivaron rutinariamente 2 a 3 veces a la semana.

**15PC3:** La línea celular de cáncer de próstata humano 15PC3 fue una amable donación de Dr. F. Baas, Neurozintulgen Laboratory, AMC, Países Bajos y se cultivó en DMEM (Sigma) + suero de feto bovino (SFB) al 10% + Glutamax I + gentamicina.

**PC3:** La línea celular de próstata humana PC3 se obtuvo de la ATCC y se cultivó en F12 de Coon con glutamina (Gibco) + FBS al 10% + gentamicina.

**518A2:** La línea celular de cáncer de melanoma humano 518A2 fue una amable donación de Dr. B. Jansen, Section of Experimental Oncology, Molecular Pharmacology, Department of Clinical Pharmacology, Universidad de Viena y se cultivó en DMEM (Sigma) + suero de feto bovino (SFB) al 10% + Glutamax I + gentamicina.

HeLa: la línea celular de carcinoma cervical se cultivó en MEM (Sigma) que contenía suero de feto bovino al 10% más gentamicina a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>.

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

DU-145: La línea celular de próstata humano DU-145 se obtuvo de la ATCC y se mantuvo en RPMI con Glutamax + SFB al 10%.

10 RCC-4 +/-VHL: la línea celular de cáncer renal humano RCC4 transfectada establemente con plásmido que expresaba VHL o con plásmido vacío se obtuvo de ECACC y se mantuvo siguiendo las instrucciones del fabricante.

786-0: La línea celular de carcinoma de células renales humanas 786-0 se obtuvo de la ATCC y se mantuvo siguiendo las instrucciones del fabricante.

15 HUVEC: La línea celular endotelial de la vena umbilical humana, HUVEC, se obtuvo de Camcrex y se mantuvo en medio EGM-2.

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

U87MG: La línea celular de glioblastoma humano U87MG se obtuvo de la ATCC y se mantuvo siguiendo las instrucciones del fabricante.

25 B16: La línea celular de melanoma murino B16 se obtuvo de la ATCC y se mantuvo siguiendo las instrucciones del fabricante.

LNCap: La línea celular de próstata humano LNCap se obtuvo de la ATCC y se mantuvo en RPMI con Glutamax + SFB al 10%.

30 Huh-7: Línea hepática humana, de tipo epitelial, cultivada en MEM de Eagles con SFB al 10%, Glutamax-I 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales y gentamicina 25 µg/ml.

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

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

#### 40 **Ejemplo 6: modelo in vitro. Tratamiento con oligonucleótido antisentido de ANB anti-miR**

La línea celular Huh-7 expresante de miR122a se transfectó con ANB anti-miR a concentraciones de 1 y 100 nM siguiendo el protocolo optimizado de Lipofectamina-2000 (LF2000, Invitrogen) (indicado a continuación).

45 Se cultivaron células Huh-7 en MEM de Eagles con SFB al 10%, Glutamax-I 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales y gentamicina 25 µg/ml. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (300.000 células en cada pocillo) en un vol. total de 2,5 ml el día antes de la transfección. El día de la transfección se preparó una solución que contenía LF2000 diluido en Optimem (Invitrogen) (1,2 ml de Optimem + 3,75 µl de LF2000 en cada pocillo: final: 2,5 µg de LF2000/ml, vol. tot. final: 1,5 ml).

50 También se diluyeron oligonucleótidos de ANB (ANB anti-miR) en Optimem. 285 ml de Optimem + 15 ml de oligonucleótido ANB (solución madre de oligonucleótidos 10 µM para una concentración final de 100 nM y 0,1 µM para una concentración final de 1 nM). Las células se lavaron una vez en Optimem y después se añadieron a cada pocillo 1,2 ml de mezcla Optimem/LF2000. Las células se incubaron durante 7 min. a temperatura ambiente en la mezcla de LF2000, en la que seguidamente se añadieron 300 µl de solución de oligonucleótidos en Optimem.

60 Las células se incubaron adicionalmente durante cuatro horas con oligonucleótido y Lipofectamina-2000 (en un incubador celular habitual a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Después de estas cuatro horas, se retiró la mezcla de medio y se añadió el medio completo habitual. Se dejaron las células en crecimiento durante 20 horas adicionales. Las células se recolectaron en Trizol (Invitrogen) 24 horas después de la transfección. Se extrajo el ARN siguiendo un protocolo estándar con Trizol siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen), especialmente para conservar el microARN en la extracción del ARN total.

#### 65 **Ejemplo 7: modelos in vitro e in vivo. Análisis de la inhibición con oligonucleótido de la expresión de miR mediante PCR cuantitativa específica de 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, USA) utilizando un kit de qRT-PCR específico de miR-122a, y cebadores mirVana (Ambion, USA) y miR-122a (Ambion, USA). El procedimiento se llevó a cabo siguiendo el protocolo del fabricante.

## 5 Resultados:

El diseño del nuevo oligonucleótido ANB anti-miR específico de miR-122a (es decir SPC3349 (también denominado SPC 3549)) resultó más eficiente en la inhibición de miR-122a a 1 nM en comparación con los modelos de diseño anteriores, incluyendo motivos "cada tercero" y "gápmo" (SPC3370, SPC3372 y SPC3375) a 100 nM. No se encontró que el control desapareado inhibiese miR-122a (SPC3350). Se muestran los resultados en la fig. 1.

### **Ejemplo 8: evaluación de la especificidad de inactivación de ANB antagomir utilizando el perfil de expresión de micromatriz de ARNmi.**

#### 15 A) Marcaje de ARN para el perfilado de micromatrices de ARNmi

Se extrajo el ARN total utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) y el extremo 3' se marcó utilizando ARN ligasa de T4 y conector de ARN marcado con Cy3 o Cy5 (5'-PO<sub>4</sub>-rUrUrU-Cy3/dT-3' o 5'-PO<sub>4</sub>-rUrUrU-Cy5/dT-3'). Las reacciones de marcaje contenían 2 a 5 µg de ARN total, conector de ARN 15 µM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,8), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM, polietilenglicol al 16% y 5 unidades de ARN ligasa de T4 (Ambion, USA) y se incubaron a 30°C durante 2 horas, seguido de la inactivación por calor de la ARN ligasa de T4 a 80°C durante 5 minutos.

#### B) Hibridación de micromatrices y lavados post-hibridación

Las sondas de captura de oligonucleótidos modificados con ANB que comprendían sondas para todos los ARNmi anotados de ratón (*Mus musculus*) y humanos (*Homo sapiens*) en la base de datos de microARN miRBase versión 7.1, incluyendo un grupo de sondas de control positivo y negativo se obtuvieron de Exiqon (Exiqon, Dinamarca) y se utilizaron para imprimir micromatrices para el perfilado de ARNmi. Las sondas de captura contenían un conector 5'-terminal modificado con amino en C6 y se diseñaron para presentar una T<sub>f</sub> de 72°C frente a ARNmi diana complementarios mediante ajuste del contenido de ANB y la longitud de las sondas de captura. Las sondas de captura se diluyeron hasta una concentración final de 10 mM en tampón de fosfato sódico 150 mM (pH 8,5) y se aplicaron en puntos por cuadruplicado en portaobjetos Codelink (Amersham Biosciences) utilizando el aplicador de matrices MicroGrid II de BioRobotics bajo una humedad de 45% y a temperatura ambiente. Los portaobjetos aplicados se post-procesaron tal como recomienda el fabricante.

Se hibridó el 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%, 1 µg/µl de ADN de esperma de arenque y formamida al 38%. Los portaobjetos hibridados se lavaron tres veces en 2x SSC, SDS al 0,025% a 65°C, seguido de tres veces en 0,08x SSC y finalmente tres veces en 0,4x SSC a temperatura ambiente.

#### C) Escaneo de matrices, análisis de imágenes y procesamiento de datos

Las micromatrices se escanearon utilizando el escáner ArrayWorx (Applied Precision, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las imágenes escaneadas se importaron en TIGR Spotfinder versión 3.1 (Saeed et al., 2003) para la extracción de las intensidades de punto medias y las medianas de intensidades locales de fondo, excluyendo los puntos con intensidades inferiores a la mediana de fondo local + 4x desviaciones estándar. Se normalizaron las intensidades correlacionadas con el fondo, utilizando el paquete de normalización estabilizador de la varianza versión 1.8.0 (Huber et al., 2002) para R (www.r-project.org). Las intensidades de las réplicas de puntos se promediaron utilizando Microsoft Excel. Las sondas que mostraban un coeficiente de varianza > 100% se excluyeron de los análisis posteriores de los datos.

### **Ejemplo 9: detección de microARN mediante hibridación in situ. Detección de microARN en secciones de tejido fijadas en formalina e incluidas en parafina, mediante hibridación in situ.**

#### 55 **A) Preparación de las secciones fijadas en formalina e incluidas en parafina para la hibridación in situ**

Se recuperaron muestras incluidas en parafina de los archivos y se cortaron en secciones de 5 a 10 mm y se montaron en portaobjetos cargados positivamente utilizando la técnica de flotación. Se almacenaron los portaobjetos a 4°C hasta la realización de los experimentos in situ.

#### 60 **B) Hibridación in situ**

Las secciones sobre los portaobjetos se desparafinaron en xileno y después se rehidrataron mediante una serie de dilución de etanol (de 100% a 25%). Se sumergieron los portaobjetos en agua tratada con DEPC y se sometieron a tratamiento de HCl y glicina al 0,2%, se fijaron nuevamente en formaldehído al 4% y se trataron con anhídrido acético/trietanolamina; los portaobjetos se enjuagaron en varios lavados de 1X PBS entre tratamientos. Se

prehibridaron los portaobjetos en solución de hib. (formamida al 50%, 5X SSC, 500 mg/ml de ARNt de levadura, 1X Denhardt) a 50°C durante 30 min. A continuación, se añadieron 3 pmoles de una sonda de ANB marcada con FITC (Exiqon, Dinamarca) complementaria a cada ARNm seleccionado a la solución de hib. y se hibridaron durante una hora a una temperatura inferior en 20°C a 25°C a la  $T_f$  predicha de la sonda (típicamente de entre 45°C y 55°C, dependiendo de la secuencia del ARNm). Tras los lavados en 0,1X y 0,5X SSC a 65°C, se llevó a cabo la reacción de amplificación de la señal de tiramida utilizando el kit de fluorescencia (FITC) Genpoint (DakoCytomation, Dinamarca) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Finalmente, los portaobjetos se montaron con solución de ProLong oro. Se dejó que transcurriese la reacción de fluorescencia durante 16 a 24 h antes de documentar la expresión del ARNm seleccionado utilizando un microscopio de epifluorescencia.

#### Detección de microARN mediante hibridación in situ de preparación completa de embriones de pez cebra, *Xenopus* y ratón

Todas las etapas de lavado e incubación se llevaron a cabo en tubos Eppendorf de 2 ml. Los embriones se fijaron durante la noche a 4°C en paraformaldehído al 4% en PBS y posteriormente se transfirieron a una serie gradada (MeOH al 25% en PBST (PBS que contenía Tween-20 al 0,1%), MeOH al 50% en PBST, MeOH al 75% en PBST) hasta metanol al 100% y se almacenaron a -20°C durante hasta varios meses. El primer día de la hibridación in situ, los embriones se rehidrataron mediante incubaciones sucesivas durante 5 minutos en MeOH al 75% en PBST, MeOH al 50% en PBST, MeOH al 25% en PBST y PBST al 100% (4x5 min.).

Se trataron embriones de pez, ratón y *Xenopus* con proteinasa K (10 µg/ml en PBST) durante 45 min. a 37°C, se fijaron nuevamente durante 20 min. en paraformaldehído al 4% en PBS y se lavaron 3x 5 min. con PBST. Tras un lavado corto en agua, se bloqueó la actividad endógena de fosfatasa alcalina mediante incubación de los embriones en trietanolamina 0,1 M y anhídrido acético al 2,5% durante 10 minutos, seguido de un lavado corto en agua y 5x lavados de 5 min. en PBST. A continuación, se transfirieron los embriones a tampón de hibridación (formamida al 50%, 5x SSC, Tween al 0,1%, ácido cítrico 9,2 mM, 50 µg/ml de heparina y 500 µg/ml de ARN de levadura) durante 2 a 3 horas a la temperatura de hibridación. La hibridación se llevó a cabo en tampón de hibridación precalentado fresco que contenía 10 nM de sonda de AND marcada con 3'DIG (Roche Diagnostics) complementaria a cada ARNm seleccionado. Los lavados post-hibridación se llevaron a cabo a la temperatura de hibridación mediante incubaciones sucesivas durante 15 min. en HM- (tampón de hibridación sin heparina y ARN de levadura), 75% de HM-/25% 2x SSCT (SSC que contenía Tween-20 al 0,1%), 50% de HM-/50% 2x SSCT, 25% de HM-/75% 2x SSCT, 100% 2x SSCT y 2x 30 min. en 0,2X SSCT.

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

Tras los lavados post-anticuerpo, los embriones se lavaron 3x 5 min. en tampón de tinción (HCl de tris 100 mM, pH 9,5, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, NaCl 100 mM, Tween-20 al 0,1%). La tinción se llevó a cabo en tampón provisto de 4,5 µl/ml de NBT (Roche, solución madre 50 mg/ml) y 3,5 µl/ml de BCIP (Roche, solución madre 50 mg/ml). La reacción se detuvo con EDTA 1 mM en PBST y los embriones se almacenaron a 4°C. Los embriones se montaron en solución de Murray (benzoato de bencilo: alcohol bencílico 2:1) mediante una serie creciente de metanol (MeOH al 25% en PBST, MeOH al 50% en PBST, MeOH al 75% en PBST y MeOH al 100%) antes de la obtención de las imágenes.

#### **Ejemplo 10: modelo in vitro. Aislamiento y análisis de la expresión de ARNm (aislamiento del ARN total y síntesis de ADNc para el análisis del ARNm)**

Se aisló el ARN total utilizando el minikit RNeasy (Qiagen) o utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen). Para el aislamiento del ARN total utilizando el minikit RNeasy (Qiagen), las células se lavaron con PBS y tampón de lisis celular (RTL, Qiagen) complementado con mercaptoetanol al 1% añadido directamente a los pocillos. Tras unos cuantos minutos, se procesaron las muestras siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para el análisis in vivo de la expresión del ARNm, en primer lugar se homogeneizaron las muestras de tejido utilizando un homogeneizador Retsch 300MM y se aisló el ARN total utilizando el reactivo Trizol o el minikit RNeasy tal como ha descrito el fabricante.

Se llevó a cabo la síntesis de primera cadena (ADNc a partir del ARNm) utilizando el kit de transcriptasa inversa OmniScript o transcriptasa inversa de M-MLV (esencialmente tal como indica el fabricante (Ambion)) siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen). Al utilizar la transcriptasa inversa OmniScript, 0,5 µg de ARN total en cada muestra se ajustaron a 12 µl y se mezclaron con 0,2 µl de poli(dT)<sub>12-18</sub> (0,5 µg/µl) (Life Technologies), 2 ml 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 de la incubación a 37°C durante 60 min. y la inactivación por calor a 93°C durante 5 min.

Al llevar a cabo la síntesis de primera cadena utilizando decámeros aleatorios y transcriptasa inversa de M-MLV (esencialmente tal como indicaba el fabricante (Ambion)), se ajustaron 0,25 µg de ARN total de cada muestra a 10,8 µl en H<sub>2</sub>O. Se añadieron 2 µl de decámeros y 2 µl de mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno). Se calentaron las muestras a 70°C durante 3 min. y se enfriaron inmediatamente en agua helada y se añadieron 3,25 µl de una mezcla que contenía 2 µl de 10x tampón RT, 1 µl de transcriptasa inversa de M-MLV y 0,25 µl de inhibidor de ARNasa. Se sintetizó el ADNc a 42°C durante 60 min. seguido de la etapa de inactivación por calor a 95°C durante 10 min. y finalmente se enfrió a 4°C. El ADNc puede utilizarse además para la cuantificación del ARNm mediante, por ejemplo, PCR cuantitativa en tiempo real.

La expresión del ARNm puede someterse a ensayo mediante una diversidad de modos conocidos de la técnica. Por ejemplo, los niveles de ARNm pueden cuantificarse mediante, por ejemplo, análisis de transferencia northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva, ensayo de protección frente a ribonucleasas (EPR) o mediante PCR en tiempo real. La PCR cuantitativa en tiempo real actualmente resulta preferente. El análisis del ARN puede llevarse a cabo en ARN celular total o en ARNm.

Los métodos de aislamiento de ARN y de análisis de ARN tales como el análisis de transferencia northern son rutinarios en la técnica y se enseñan en, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons.

La PCR cuantitativa en tiempo real puede llevarse a cabo convenientemente utilizando 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 y se enseña en, por ejemplo, Heid et al., Real time quantitative PCR, Genome Research 6: 986-994.

#### ***Ejemplo 11: incorporación de oligonucleótido de ANB y eficacia in vivo.***

Estudio in vivo: Se trataron seis grupos de animales (5 ratones en cada grupo) de la manera siguiente. Los animales del grupo 1 recibieron inyecciones i.v. de 0,2 ml de solución salina en 3 días sucesivos; el grupo 2 recibió 2,5 mg/kg de SPC3372; 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 SPC 3373 (oligonucleótido ANB desapareado-anti-miR<sup>TM</sup>), todos de la misma manera. Todas las dosis se calcularon a partir de los pesos corporales el día 0 de cada animal.

Antes de la administración (día 0) y 24 horas después de la última dosis (día 3), se recolectó sangre retroorbital en tubos que contenían EDTA y la fracción plasma se recolectó y se almacenó congelada a -80°C para el análisis del colesterol. Todos los hígados del sacrificio se diseccionaron y una parte se cortó en cubos de 5 mm y se sumergió en 5 volúmenes de solución RNAlater helada. Una segunda parte de congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó para las criosecciones.

Se extrajo el ARN total de las muestras de hígado tal como se ha indicado anteriormente y se analizó para los niveles de miR-122a mediante QPCR específica de microARN. La figura 5 muestra una clara respuesta a dosis obtenida con SPC3372 con una IC<sub>50</sub> de aprox. 3-5 mg/kg, mientras que no se detectó inhibición de miR-122a utilizando el antagonista de ANB no correspondiente SP3373 para miR-122a.

#### ***Ejemplo 12: respuesta a dosis de ANB-antimiR-122a in vivo en ratones C57/BL/J hembra.***

Estudio in vivo: Se trataron diez grupos de animales (C57/BL6 hembra; 3 ratones en cada grupo) de la manera siguiente. En los animales del grupo 1 se inyectaron 0,2 ml de solución salina i.p. el día 0, el día 2 y el día 4. Los grupos 2 a 10 recibieron dosis i.p. de tres conc. diferentes (25 mg/kg, 5 mg/kg y 1 mg/kg) de ANB antimiR-122a/SPC3372 (grupos 2 a 4), ANB antimiR-122a/SPC3548 (grupos 5 a 7) o ANB antimiR-122a/SPC3549 (grupos 8 a 10); las secuencias de ANB antimiR-122a se proporcionan en la Tabla 1. Los tres oligonucleótidos de ANB antimiR-122a presentaban como diana miR-122a específicamente hepático. Las dosis se calcularon a partir de los pesos corporales el día 0 de cada animal.

Los animales se sacrificaron 48 horas después de la última dosis (día 6); se recolectó sangre retroorbital en tubos que contenían EDTA y se obtuvo la fracción plasma y se almacenó congelada a -80°C para el análisis del colesterol. Todos los hígados del sacrificio se diseccionaron y una parte se cortó en cubos de 5 mm y se sumergió en 5 volúmenes de solución RNAlater helada. Una segunda parte de congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó para las criosecciones.

Se extrajo el ARN total de las muestras de hígado utilizando el reactivo Trizol siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, USA) y se analizaron para los niveles de miR-122a mediante QPCR específica de microARN siguiendo las recomendaciones del fabricante (Ambion, USA). La figura 2 demuestra una clara respuesta a dosis obtenida con las tres moléculas de ANB antimiR122a (SPC3372, SPC3548 y SPC3549). Tanto SPC3548 como SPC3549 mostraron una eficacia significativamente mejorada in vivo en el silenciamiento de miR-122a (tal como se

observa a partir de los niveles reducidos de miR-122a) en comparación con SPC3372, siendo SPC3549 el más potente (IC<sub>50</sub> de aprox. 1 mg/kg).

Se repitió el ejemplo anteriormente indicado utilizando SPC3372 y SPC3649 utilizando 5 ratones en cada grupo y los datos agrupados (un total de ocho ratones en cada grupo) se muestran en la figura 2b.

#### **Ejemplo 12a: transferencia northern.**

Transferencia northern específica de microARN que muestra el bloqueo incrementado de miR-122 por SPC3649 en comparación con SPC3372 en hígados de ratón tratados con ANB-antimiR.

Oligos utilizados en el presente ejemplo:

|                                                |                |
|------------------------------------------------|----------------|
| SPC3649: 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3' (SEC ID nº 59)  | Diseño nuevo   |
| SPC3372: 5'-CcAttGtcAcaCtcCa-3' (SEC ID nº 57) | Diseño antiguo |

Los presentes inventores decidieron evaluar el efecto de SPC3649 sobre los niveles de ARNm de miR-122 en los hígados de ratones tratados con SPC3649. Se administraron los ANB-anti-miR SPC3649 y SPC3372 en ratones mediante tres inyecciones i.p. cada dos días durante un periodo de seis días a las dosis indicadas y se sacrificaron 48 horas después de la última dosis. Se extrajo el ARN total de los hígados. Se evaluaron los niveles de miR-122 mediante transferencia northern específica de microARN (figura 6).

El tratamiento de los ratones normales con SPC3649 resultó en una reducción dependiente de la dosis drásticamente mejorada de miR122. Se llevó a cabo una transferencia northern específica de microARN comparando SPC3649 y SPC3372 (figura 6). SPC3649 bloqueó por completo miR-122 tanto a la dosis de 5 como de 25 mg/kg, tal como se aprecia por la ausencia de miR-122 de cadena sencilla maduro y únicamente la presencia de la banda de dúplex de ANB-antimiR y miR-122. En la comparación de la banda del dúplex y la banda de madura en la transferencia northern, SPC3649 aparentemente resulta igualmente eficiente a 1 mg/kg que SPC3372 a 25 mg/kg.

#### **Ejemplo 13: evaluación de los niveles de colesterol en plasma en ratones tratados con ANB anti-miR122**

Se midió el nivel del colesterol total en plasma utilizando un ensayo colorimétrico Cholesterol CP de ABX Pentra. Se midió el colesterol tras la hidrólisis y oxidación enzimáticas (2, 3). Se añadieron 21,5 µl de agua a 1,5 µl de plasma. Se añadieron 250 µl de reactivo y dentro de los 5 min. posteriores se midió el contenido de colesterol a una longitud de onda de 540 nm. Las mediciones en cada animal se realizaron por duplicado. Se sometió a ensayo la sensibilidad y linealidad con un compuesto de control (control de ABX Pentra N) diluido 2 veces. Se determinó el nivel de colesterol restando el fondo y se expresó respecto a los niveles de colesterol en suero de ratones tratados con solución salina.

La figura 3 demuestra un nivel marcadamente reducido de colesterol plasmático en los ratones que recibieron SPC3548 y SPC3549 en comparación con el control de solución salina el día 6.

#### **Ejemplo 14: evaluación de los niveles de ARNm de miR-122a diana en ratones tratados con ANB anti-miR-122a**

Los animales de control de solución salina y tratados con diferentes ANB-antimiR-122a se sacrificaron 48 horas después de la última dosis (día 6) y se extrajo el ARN total de las muestras de hígado utilizando el reactivo Trizol siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, USA). Se evaluaron los niveles de ARNm mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real para dos genes diana miR-122a, Bckdk (cetoácido deshidrogenasa quinasa de cadena ramificada, ENSMUSG00000030802) y aldolasa A (aldoA, ENSMUSG00000030695), respectivamente, así como para GAPDH como control, utilizando ensayos Taqman siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, USA). Las figuras 4a y 4b demuestran una clara regulación positiva dependiente de la dosis de los dos genes diana de miR-122a, Bckdk y AldoA, respectivamente, como respuesta al tratamiento con las tres moléculas de ANB anti-miR122a (SPC3372, SPC3548 y SPC3549). En contraste, los ensayos de qPCR de control de GAPDH no revelaron ninguna diferencia en los niveles de ARNm de GAPD en los ratones tratados con ANB-antimiR-122a en comparación con los animales de control de solución salina (fig. 4c). Los niveles de ARNm de Bckdk y AldoA eran significativamente más altos en los ratones tratados con SPC3548 y SPC3549 que en ratones tratados con SPC3372 (figs. 4a y 4b), demostrando de esta manera su eficacia in vivo mejorada.

#### **Ejemplo 15: duración de acción in vivo de oligonucleótidos de ANB.**

Estudio in vivo: se trataron dos grupos de animales (21 ratones en cada grupo) de la manera siguiente. En los animales de grupo 1 se inyectaron i.v. 0,2 ml de solución salina en 3 días sucesivos; el grupo 2 recibió 25 mg/kg de SPC3372 de la misma manera. Todas las dosis se calcularon a partir de los pesos corporales el día 0 de cada animal.

Tras la última dosis (día 3), se sacrificaron 7 animales de cada grupo el día 9, el día 16 y el día 23, respectivamente. Antes de lo anterior, en cada día, se había recolectaron sangre retroorbital en tubos que contenían EDTA y se había obtenido la fracción plasma y se había almacenado bajo congelación a -80°C para el análisis del colesterol de cada día. Todos los hígados del sacrificio se diseccionaron y una parte se cortó en cubos de 5 mm y se sumergió en 5 volúmenes de solución RNAlater helada. Una segunda parte de congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó para las crio secciones.

Se extrajo el ARN total de las muestras de hígado tal como se ha indicado anteriormente y se analizó para los niveles de miR-122a mediante QPCR específica de microARN. La figura 7 (día de sacrificio 9, 16 o 23, que corresponden a las semanas de sacrificio 1, 2 o 3 después de la última dosis) demuestra una inhibición de dos veces en los ratones que habían recibido SPC3372 en comparación con el control de solución salina, y esta inhibición todavía podía detectarse el día 16, mientras que el día 23, los niveles de mi122a alcanzaban los del grupo de solución salina.

#### **Ejemplo 16: duración de acción in vivo de oligonucleótidos de ANB.**

Estudio in vivo: se trataron dos grupos de animales (21 ratones en cada grupo) de la manera siguiente. En los animales de grupo 1 se inyectaron i.v. 0,2 ml de solución salina en 3 días sucesivos; el grupo 2 recibió 25 mg/kg de SPC3372 de la misma manera. Todas las dosis se calcularon a partir de los pesos corporales el día 0 de cada animal.

Tras la última dosis (día 3), se sacrificaron 7 animales de cada grupo el día 9, el día 16 y el día 23, respectivamente. Antes de lo anterior, en cada día, se había recolectaron sangre retroorbital en tubos que contenían EDTA y se había obtenido la fracción plasma y se había almacenado bajo congelación a -80°C para el análisis del colesterol de cada día. Todos los hígados del sacrificio se diseccionaron y una parte se cortó en cubos de 5 mm y se sumergió en 5 volúmenes de solución RNAlater helada. Una segunda parte de congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó para las crio secciones.

Se extrajo el ARN total de las muestras de hígado tal como se ha indicado anteriormente y se analizó para los niveles de miR-122a mediante QPCR específica de microARN. La figura 8 demuestra una inhibición de dos veces en los ratones que habían recibido SPC3372 en comparación con el control de solución salina, y esta inhibición todavía podía detectarse el día 16, mientras que el día 23 los niveles de miR-122a se aproximaban a los del grupo de solución salina.

*Respecto a los Ejemplos 17 a 22, se aplicaron los procedimientos siguientes:*

Se administró SPC3372 por vía intravenosa en ratones NMRI utilizando dosis diarias de entre 2,5 y 25 mg/kg durante tres días consecutivos. Los animales se sacrificaron 24 horas, 1, 2 o 3 semanas después de la última dosis. Se recolectaron los hígados, se dividieron en trozos y se sumergieron en solución RNAlater (Ambion) o se congelaron instantáneamente. Se extrajo el ARN con reactivo Trizol siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen) del tejido en RNAlater, excepto en que el ARN precipitado se lavó en etanol al 80% y no se agitó mediante vórtex. El ARN se utilizó para la qPCR TaqMan del ARNm siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems) o transferencia northern (ver posteriormente). Los trozos congelados instantáneamente se crio seccionaron para las hibridaciones in situ.

Además, respecto a las figuras 9 a 14, SPC3372 se denomina ANB-antimiR y SPC3372 (el control desapareado) se denomina "mm" en lugar de utilizar el número SPC.

#### **Ejemplo 17: inducción de ARNm de diana miR-122a dependiente de la dosis mediante inhibición con SPC3372 de miR-122a**

Los ratones se trataron con diferentes dosis de SPC3372 durante tres días consecutivos, tal como se ha indicado anteriormente, y se sacrificaron 24 horas después de la última dosis. El ARN total extraído del hígado se sometió a qPCR. Los genes con sitio diana miR-122 predicho y que se había observado que estaban regulados positivamente según el análisis de micromatrices se investigaron para la inducción dependiente de la dosis mediante el incremento de las dosis de SPC3372 utilizando qPCR. El ARN hepático total de 2 a 3 ratones de cada grupo sacrificados 24 horas después de la última dosis se sometió a qPCR para los genes indicados. En la figura 9 se muestran los niveles de ARNm respecto al grupo de solución salina, n=2-3 (2,5 a 12,5 mg/kg/día: n=2, sin SD). Se muestra también el control desapareado (mm, SPC3373).

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

Se observó una clara inducción dependiente de la dosis de los genes miR-122 diana tras el tratamiento con diferentes dosis de SPC3372.

**Ejemplo 18: inducción transitoria de ARNm diana miR-122a tras el tratamiento de SPC3372**

Se trataron ratones NMRI hembra con 25 mg/kg/día de SPC3372 conjuntamente con el control de solución salina durante tres días consecutivos y se sacrificaron 1, 2 o 3 semanas después de la última dosis, respectivamente. Se extrajo el ARN de los hígados y se investigaron mediante qPCR los niveles de ARNm de los ARNm de la diana miR-122a predicha; datos seleccionados mediante micromatrices se investigaron mediante qPCR. Se analizaron tres animales de cada grupo.

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

Se observó una inducción transitoria seguido de una restauración de los niveles de expresión normales análogamente a la restauración de los niveles normales de miR-122a (figura 10).

Se normalizaron los niveles de ARNm respecto a los niveles de GAPDH individuales y a la media del grupo tratado con solución salina en cada punto temporal individual. Se incluyen también los valores de los animales sacrificados 24 horas después de la última dosis. Se muestra la media y la desviación estándar, n=3 (24 h n=3).

**Ejemplo 19: inducción de Vldlr en el hígado mediante el tratamiento con SPC3372**

Se investigaron para la inducción de Vldlr las mismas muestras hepáticas de ARN tal como en el ejemplo anterior.

Se observó una regulación positiva transitoria tras el tratamiento de SPC3372, tal como con los demás ARNm de miR-122a diana predicho (figura 11).

**Ejemplo 20: estabilidad del dúplex miR-122a/SPC3372 en plasma de ratón**

Se sometió a ensayo la estabilidad de SPC3372 y el dúplex SPC3372/miR-122a en plasma de ratón a 37°C durante 96 horas. Se muestra en la figura 12 un PAGE teñido con SYBR-oro.

SPC3372 era completamente estable durante 96 horas. El dúplex SPC3372/miR-122a se truncó inmediatamente (degradación de la región de miR-122a de cadena sencilla no cubierta por SPC3372) aunque posteriormente se mantuvo completamente estable durante 96 horas.

El hecho de que un dúplex SPC3372/miR-122 preformado muestre estabilidad en suero durante 96 horas conjuntamente con la elevada estabilidad térmica del dúplex de la molécula SPC3372 apoya la idea de los presentes inventores de que la inhibición de miR-122a por SPC3372 se debe a la formación de dúplex estables entre las dos moléculas, la cual también se ha informado en cultivo celular (Naguibneva et al., 2006).

**Ejemplo 21: secuestro de miR-122a maduro por SPC3372 conduce a la formación de dúplex**

El ARN hepático también se sometió a transferencia northern del microARN. En la figura 13 se muestra una membrana sondeada con una sonda específica de miR-122a (panel superior) y se sondeó nuevamente con una sonda específica de Let-7 (panel inferior). Con la sonda miR-122 pudieron detectarse dos bandas, una correspondiente a miR-122 maduro y una correspondiente a un dúplex de SPC3372 y miR-122.

Para confirmar el silenciamiento de miR-122, las muestras de ARN hepático se sometieron a análisis de transferencia northern del ARN pequeño, que demostró niveles significativamente reducidos de miR-122 maduro detectable, corroborando los resultados de RT-PCR en tiempo real de los presentes inventores. A título comparativo, los niveles del control let-7a no resultaron alterados. Resulta interesante que los presentes inventores observaron una acumulación dependiente de la dosis de una banda desplazada del heterodúplex miR-122/SPC3372, sugiriendo que SPC3372 no presenta como diana miR-122 para la degradación, sino que se une al microARN, dificultando estéricamente de esta manera la función del mismo.

Se llevó a cabo un análisis de transferencia northern de la manera siguiente:

la preparación de las membranas para el northern se realizó tal como se indica en Sempere et al., 2002, excepto por las modificaciones siguientes: ARN total, 10 mg en cada carril, en tampón de carga de formamida (formamida al 47,5%, EDTA 9 mM, azul bromofenol al 0,0125%, xileno cianol al 0,0125%, SDS al 0,0125%), se cargaron en un gel de poliacrilamida Novex TBE-Urea desnaturizante al 15% (Invitrogen) sin precalentamiento del ARN. El ARN se transfirió electroforéticamente a una membrana de transferencia de hibridación GeneScreen plus (PerkinElmer) a 200 mA durante 35 min. Las membranas se sondearon con oligonucleótidos modificados con ANB marcados con <sup>32</sup>P complementarios de los microARN maduros\*. Los oligonucleótidos de ANB se marcaron y se hibridaron con la membrana tal como se describe en Válczi et al., 2004, excepto por las modificaciones siguientes: Las soluciones de prehibridación y de hibridación contenían formamida al 50%, SDS al 0,5%, 5x SSC, 5x solución de Denhardt y 20 µg/ml de ADN de esperma de arenque desnaturizado y fragmentado. Las hibridaciones se llevaron a cabo a 45°C.

Las membranas se visualizaron mediante escaneo en un escáner Storm 860. La señal de la membrana de fondo se restó de las señales radioactivas originadas de las bandas de ARNm. Los valores de las señales de miR-122 se corrigieron para diferencias de carga basándose en la señal de let-7a. Para determinar la magnitud de las señales radioactivas, se utilizó el sistema Decade Marker (Ambion) siguiendo las recomendaciones del proveedor.

**Ejemplo 22: secuestro de miR-122a por SPC3372 conjuntamente con la distribución de SPC3372 evaluada mediante hibridación in situ de secciones hepáticas**

Se sometieron criosecciones hepáticas de los animales tratados a hibridaciones in situ para la detección y localización de miR-122 y SPC3372 (figura 14). Una sonda complementaria a miR-122 pudo detectar miR-122a. Una segunda sonda era complementaria a SPC3372. Se muestra en la figura 14 una superposición en verde de la distribución y cantidades aparentes de miR-122a y SPC3372 y en azul, la tinción nuclear DAPI, a una magnificación de 10x. Las magnificaciones de 100x revelan la distribución intracelular de miR-122a y SPC3372, dentro de las células hepáticas de ratón.

Las secciones hepáticas de los animales de control de solución salina mostraron un patrón de fuerte tinción de miR-122 en toda la sección hepática, mientras que las secciones de ratones tratados con SPC3372 mostraron un patrón de tinción parcheada significativamente reducida. En contraste, se detectó fácilmente molécula SPC3372 en el hígado tratado con SPC3372, pero no en el hígado de control de solución salina, no tratado. Una magnificación más elevada localizó miR-122a en el citoplasma dentro de los hepatocitos, en donde el patrón in situ de miR-122 se encontraba claramente compartimentalizado, mientras que la molécula SPC3372 se encontraba distribuida uniformemente en todo el citoplasma.

**Ejemplo 23: análisis de micromatrices**

Los presentes inventores llevaron a cabo un perfil de expresión génica de las muestras de ARN total procedentes de ratones tratados con solución salina ANB-antimiR-122 y de control de ANB desapareado, 24 horas después de la última dosis utilizando matrices Affymetrix Mouse Genome 430 2.0. El análisis de los datos de las matrices reveló 455 transcritos que se encontraban regulados positivamente en los hígados de ratones tratados con ANB-antimiR en comparación con los controles de solución salina y de ANB desapareado, mientras que 54 transcritos se encontraban regulados negativamente (fig. 15a). Pudo identificarse en la base de datos un total de 415 transcritos regulados positivamente y 53 regulados negativamente. Los presentes inventores seguidamente examinaron las regiones 3' no traducidas (RNT) de los ARNm expresados diferencialmente, para la presencia de la secuencia de 6 nt CACTCC, correspondiente al complemento inverso de la región núcleo de nucleótidos 2 a 7 en el miR-122 maduro. El número de transcritos con por lo menos una secuencia de reconocimiento de miR-122 era de 213 (51%) de entre los transcritos regulados positivamente y de 10 (19%) de entre los transcritos regulados negativamente, mientras que la frecuencia en una población de secuencias aleatorias era de 25%, implicando que un grupo significativo de los ARNm regulados positivamente representa dianas de miR-122 directas en el hígado (fig. 15b).

El tratamiento de ANB-antimiR mostró una reducción máxima de los niveles de miR-122 a las 24 horas, una reducción de 50% tras una semana y controles de solución salina correspondientes a las tres semanas de la última dosis de ANB (Ejemplo 12, "diseño antiguo"). Lo anterior coincidió con un número marcadamente reducido de genes expresados diferencialmente entre los dos grupos de ratones en los puntos temporales posteriores. En comparación con los 509 ARNm 24 horas después de la última dosis de ANB, los presentes inventores identificaron 251 genes expresados diferencialmente tras una semana, aunque sólo 18 genes tres semanas después del tratamiento (figs. 15c y 15d). En general, los genes resultaron regulados positivamente 24 horas después del tratamiento de ANB-antimiR y revirtieron a los niveles de control durante las siguientes dos semanas (fig. 15d).

En conclusión, una gran parte de los genes regulados positivamente/desreprimidos tras el tratamiento de ANB-antimiR son dianas de miR-122, indicando un efecto muy específico de bloqueo de miR-122. Además, los genes regulados positivamente/desreprimidos se aproximan a los niveles normales 3 semanas después del final del tratamiento, lo que sugiere un efecto terapéutico relativamente prolongado, aunque sin embargo no provocan una alteración permanente, es decir el efecto es reversible.

**MÉTODOS:**

Perfilado de expresión génica en ratones tratados con ANB-antimiR.

Se compararon los perfiles de expresión de los hígados de ratones tratados con solución salina y con ANB-antimiR. Se trataron ratones NMRI hembra con 25 mg/kg/día de ANB-antimiR conjuntamente con el control de solución salina durante tres días consecutivos y se sacrificaron 24 h, 1, 2 o 3 semanas después de la última dosis. Además, se obtuvieron los perfiles de expresión de los hígados de ratones tratados con el oligonucleótido de control de ANB desapareado 24 h después de la última dosis. Se analizaron tres ratones de cada grupo, rindiendo un total de 21 perfiles de expresión. Se midió la calidad y la concentración del ARN utilizando un bioanalizador Agilent 2100 y un Nanodrop ND-1000, respectivamente. Se procesó el ARN total siguiendo las instrucciones del kit de síntesis de

ADNc GeneChip Expression 3'Amplification Reagents OneCycle (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) para producir ADNc de doble cadena. Lo anterior se utilizó como molde para generar ARNc marcado con biotina siguiendo las instrucciones del fabricante. Se fragmentaron quince microgramos de ARNc marcado con biotina, formando cadenas de entre 35 y 200 bases de longitud, de las que se hibridaron 10 microgramos en matrices Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 durante la noche en un horno de hibridación GeneChip 6400 utilizando procedimientos estándares. Las matrices se lavaron y se tiñeron en un GeneChip Fluidics Station 450. El escaneo se llevó a cabo utilizando el GeneChip Scanner 3000 y el análisis de las imágenes se llevó a cabo utilizando el software operativo de GeneChip. La normalización y el análisis estadístico se llevaron a cabo utilizando el paquete de software LIMMA para el entorno de programación R 27. Las sondas informadas como ausentes por el software GCOS en todas las hibridaciones se eliminaron de la base de datos. Además, se aplicó un filtro de intensidad a la base de datos para eliminar las sondas que mostraban intensidades de fondo corregido inferiores a 16. Se normalizaron los datos utilizando la normalización de cuantiles<sup>28</sup>. Se evaluó la expresión diferencial utilizando un método de modelo lineal. Se ajustaron los valores de P para ensayos múltiples utilizando las correcciones de Benjamini y Hochberg. Los ensayos se consideraron significativos en el caso de que los valores de p ajustados fueran <0,05. La agregación y visualización de los datos de matrices de Affymetrix se llevaron a cabo utilizando el software MultiExperiment Viewer 29.

#### Predicción de sitios diana

Se extrajeron de la base de datos Ensembl (versión 41) los transcritos con RNT 3' anotadas, utilizando la herramienta de exploración de datos EnsMart 30 y se realizaron búsquedas para la presencia de la secuencia CACTCC, que es el complemento inverso del núcleo de nucleótidos 2 a 7 en la secuencia de miR-122 madura. A modo de control de fondo, se realizó una búsqueda en un grupo de 1.000 secuencias con una longitud de 1.200 nt, correspondientes a la longitud media de RNT 3' de los transcritos regulados positiva y negativamente 24 h después de la última dosis de ANB-antimiR, para las correspondencias con el núcleo de miR-122 de 6 nucleótidos. Lo anterior se llevó a cabo 500 veces y se utilizó el recuento medio para la comparación.

#### ***Ejemplo 24. La inhibición dependiente de la dosis de miR-122 en hígado de ratón por ANB-antimiR resulta potenciada en comparación con la inhibición por antagomir de miR-122.***

Se trataron ratones NMRI hembra con las dosis indicadas de ANB-antimiR (SPC3372) conjuntamente con un control desapareado (mm, SPC3373), solución salina y antagomir (SPC3595) durante tres días consecutivos y se sacrificaron 24 horas después de 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 respecto al grupo tratado con solución salina. Los genes con el sitio diana miR-122 predicho y regulado positivamente en el perfilado de expresión (AldoA, Nrdg3, Bckdk y CD320) mostraron una desrepresión dependiente de la dosis mediante el incremento de la dosis de ANB-antimiR medidas mediante qPCR.

La desrepresión fue consistentemente más alta en todos los ARNm diana de miR-122 sometidos a ensayo (AldoA, Bckdk, CD320 y Nrdg3, figuras 17, 18, 19 y 20) en ratones tratados con ANB-antimiR en comparación con los ratones tratados con antagomir. Lo anterior también se observó al analizar la inhibición de miR-122 mediante qPCR específica de miR-12 (figura 16). Por lo tanto, los ANB-antimiR proporcionan una inhibición funcional más potente de miR-122 que la dosis correspondiente de antagomir.

#### ***Ejemplo 25. Inhibición de miR-122 por ANB-antimiR en ratones hipercolesterolémicos conjuntamente con reducción del colesterol y desrepresión del ARNm diana de miR-122.***

Se alimentaron ratones C57BL/6J hembra con dieta rica en grasas durante 13 semanas antes de iniciar el tratamiento con SPC3649. Lo anterior resultó en un peso incrementado a 30-35 g en comparación con el peso de los ratones normales, que era algo inferior a 20 g, según las mediciones de peso realizadas al inicio del tratamiento con ANB-antimiR. Los ratones bajo dieta rica en grasas mostraron un nivel de colesterol plasmático significativamente incrementado de aproximadamente 130 mg/dl, convirtiendo de esta manera a los ratones en hipercolesterolémicos en comparación con el nivel normal de aproximadamente 70 mg/dl. Los ratones tanto hipercolesterolémicos como normales fueron tratados i.p. dos veces a la semana con 5 mg/kg de SPC3649 y el control desapareado correspondiente SCP3744 durante un periodo de estudio de 5½ semanas. Se extrajeron muestras de sangre semanalmente y se midió el colesterol total plasmático durante el curso completo del estudio. Tras sacrificar los ratones, se prepararon muestras de hígado y de sangre para la extracción del ARN total, la cuantificación del ARNm i y el ARNm, la evaluación de los niveles de transaminasas séricas y la histología del hígado.

El tratamiento de los ratones hipercolesterolémicos con SPC3649 resultó en una reducción del colesterol total plasmático de aproximadamente 30% en comparación con los ratones de control de solución salina tras 10 días y se mantuvieron a este nivel durante todo el estudio (figura 21). El efecto no fue tan pronunciado en los ratones bajo dieta normal. En contraste, el control desapareado SPC3744 no afectó a los niveles plasmáticos de colesterol en ratones hipercolesterolémicos o de control.

La cuantificación de la inhibición con miR-122 y la desrepresión del ARNm del gen diana miR-122 (AldoA y Bckdk) tras el tratamiento a largo plazo con SPC3649 reveló un perfil comparable tanto en ratones hipercolesterolémicos como normales (figuras 22, 23 y 24), demostrando de esta manera la potencia de SPC3649 en el antagonismo de miR-122 en ambos grupos animales. El ensayo qPCR de miR-122 indicaba que también el control desapareado SPC3744 presentaba un efecto sobre los niveles de miR-122 en los hígados de ratones tratados, aunque en menor medida que SPC3649. Lo anterior podría ser una reducción asociada a la qPCR del tallo-bucle. Es consistente con esta interpretación que el tratamiento de ratones con el control desapareado SPC3744 no resultó en ninguna desrepresión funcional de los genes diana miR-122 directos (figuras 23 y 24) ni en reducción del colesterol plasmático (figura 21), lo que implica que el antagonismo mediado por SPC3649 de miR-122 es altamente específico in vivo.

Se evaluaron los enzimas hepáticos en hígados de ratones hipercolesterolémicos y normales tras el tratamiento a largo plazo con SPC3649. No se detectaron cambios en los niveles de las alanina y aspartato aminotransferasas (ALT y AST) en los ratones hipercolesterolémicos tratados con SPC3649 en comparación con los ratones de control de solución salina (figuras 25 y 26). Se observó un nivel ALT posiblemente elevado en ratones normales tras el tratamiento a largo plazo con SPC3649 (figura 26).

#### **Ejemplo 26. Métodos de realización del experimento y análisis de ANB-antimiR/hipercolesterolemia:**

##### **Ratones y dosis**

Se utilizaron ratones C57BL/6J hembra (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 permitiese que los ratones recibiesen un volumen de inyección intraperitoneal de 10 ml/kg.

En el estudio de obesidad inducido por dieta, los ratones recibieron una dieta rica en grasas (60EN%) (D12492, Research Diets) durante 13 semanas para incrementar su nivel sanguíneo de colesterol antes de iniciar la administración. Se prolongó el régimen de dosificación hasta 5½ semanas de 5 mg/kg de ANB-antimiR™ dos veces a la semana. Se recolectó plasma sanguíneo una vez a la semana durante todo el periodo de administración. Tras completar el experimento, se sacrificaron los ratones y se extrajo el ARN de los hígados para el análisis posterior. Además se recogió e l suero para el análisis de los enzimas hepáticos.

##### **Extracción del ARN total**

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

##### **RT-PCR cuantitativa específica de microARN.**

Se cuantificaron los niveles de microARN de miR-122 y de let-7a con el ensayo de microARN TaqMan (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de TI se diluyó diez veces en agua y posteriormente se utilizó para la amplificación mediante PCR en tiempo real siguiendo las instrucciones del fabricante. Una serie de dilución de ADNc de dos veces del ARN total hepático de un animal tratado con solución salina o una reacción de ADNc de células transfectadas simuladamente (utilizando 2,5 veces más ARN total que en las muestras) sirvió como estándar para garantizar un rango lineal (Ct versus el número de copia relativo) de la amplificación. Para la amplificación se utilizó un instrumento de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 o 7900.

##### **RT-PCR cuantitativa**

La cuantificación del ARNm de los genes seleccionados se llevó a cabo utilizando ensayos TaqMan estándares (Applied Biosystems). La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo con decámeros aleatorios, 0,5 µg de ARN total y el enzima TI de M-MLV de Ambio siguiendo un protocolo estándar. El ADNc de primera cadena se diluyó seguidamente 10 veces en agua libre de nucleasas antes de la adición a la mezcla de reacción de RT-PCR. Una serie de dilución de ADNc de dos veces del ARN total hepático de un animal tratado con solución salina o una reacción de ADNc de células transfectadas simuladamente (utilizando 2,5 veces más ARN total que en las muestras) sirvió como estándar para garantizar un rango lineal (Ct versus el número de copia relativo) de la amplificación. Para la amplificación se utilizó un instrumento de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 o 7900.

##### **Mediciones metabólicas**

Inmediatamente antes del sacrificio se recogió sangre del seno retroorbital en tubos recubiertos con EDTA, seguido del aislamiento de la fracción plasmática. Se analizó el colesterol total plasmático utilizando ABX Pentra Cholesterol CP (Horiba Group, Horiba ABX Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Medición de enzimas hepáticas (ALT y AST)

Se preparó suero de cada ratón individual de la manera siguiente: se almacenaron las muestras de sangre a temperatura ambiente durante 2 h antes de la centrifugación (10 min., 3.000 rpm a temperatura ambiente). Tras la centrifugación, se recolectó el suero y se congeló a -20°C.

Se llevó a cabo la medición de ALT y AST en placas de 96 pocillos utilizando reactivos de ALT y AST de ABX Pentra siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras de suero se diluyeron 2,5 veces con H<sub>2</sub>O y cada muestra se sometió a ensayo por duplicado. Tras la adición de 50 µl de muestra diluida o estándar (multical de ABX Pentra) a cada pocillo, se añadieron a cada pocillo 200 µl de mezcla de reactivo AST o ALT a 37°C. Se llevaron a cabo mediciones cinéticas durante 5 min. con un intervalo de 30 s a 340 nm y 37°C utilizando un espectrofotómetro.

**Ejemplo 27. Modulación de la replicación de la hepatitis C con ANB-antimiR (SPC3649)**

Oligos utilizados en el presente ejemplo (mayúscula: ANB, minúscula: ADN, las C de ANB son metilo y los ANB preferentemente son B-D-oxi (o subíndice después del residuo de ANB):

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>SPC3649</b> (ANB-antimiR con diana en miR-122, en la síntesis a escala reducida inicial se denominaba SPC3549)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 5'- <sup>A</sup> s <sup>S</sup> ss <sup>G</sup> s ss ss s s s s s <sup>S</sup> 5'- <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> c <sup>o</sup> tt <sup>o</sup> T <sup>o</sup> ca <sup>m</sup> C <sup>o</sup> a <sup>m</sup> C <sup>o</sup> <sub>t</sub> <sup>m</sup> C <sup>om</sup> C <sup>o</sup> -3'                                                                                                                                                                    |
| <b>SPC3648</b> (ANB-antimiR con diana en miR-122, en la síntesis a escala reducida inicial se denominaba SPC3548)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 5'- <sup>A</sup> s <sup>o</sup> tt <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> ca <sup>m</sup> C <sup>o</sup> a <sup>m</sup> C <sup>o</sup> t <sup>m</sup> C <sup>om</sup> C <sup>o</sup> -3' ss <sup>G</sup> s ss ss s s s s s                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>SPC3550</b> (control desapareado 4 nt respecto a SPC3649) SEC ID nº 63                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 5'- <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> c <sub>s</sub> <sup>S</sup> <sup>o</sup> A <sub>s</sub> <sup>o</sup> t <sub>s</sub> <sup>S</sup> <sup>o</sup> t <sub>s</sub> <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> T <sub>s</sub> <sup>o</sup> g <sub>s</sub> a <sub>s</sub> <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> c <sub>s</sub> <sup>m</sup> C <sub>s</sub> <sup>o</sup> t <sub>s</sub> <sup>S</sup> <sup>o</sup> A <sub>s</sub> <sup>om</sup> C <sup>o</sup> -3' |
| <b>2'OMe anti-122:</b> Oligo modificado con 2'OMe de longitud completa (23 nt) complementario de miR-122                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>2'OMe Ctrl:</b> control con modificación 2'OMe desorganizado                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

Se ha demostrado que la replicación del virus de la hepatitis C (VHC) resulta facilitada por miR-122 y en consecuencia, la antagonización de miR-122 se ha demostrado que afecta a la replicación del VHC en un modelo celular de hepatoma in vitro. Los presentes inventores evaluaron la eficacia de SPC3649 en la reducción de la replicación del VHC en el modelo celular basado en Huh-7. Las diferentes moléculas de ANB-antimiR conjuntamente con un oligonucleótido 2'OMe antisentido y desorganizado se transfectaron en células Huh-7, y se dejó que el VHC se replicase durante 48 horas. Las muestras del ARN total extraído de las células Huh-7 se sometieron a análisis de transferencia northern.

**Ejemplo 28 Oligonucleótido antisentido ANB-antimiR™ potenciado con diana en miR-21**

Secuencia de miR-21 madura del miRBase del Sanger Institute:

>hsa-miR-21 MIMAT0000076  
UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (SEC ID n° 4)

>mmu-miR-21 MIMAT0000530  
UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (SEC ID n° 64)

Secuencia de los compuestos:

|         |            |                                                                   |
|---------|------------|-------------------------------------------------------------------|
| SPC3521 | miR-21     | 5'-FAM TCAGtctgataaGCTa-3' (diseño de gápmero) -(SEC ID nº 65)    |
| SPC3870 | miR-21(mm) | 5'-FAM TCCgtcttagaaGATa-3' -(SEC ID nº 66)                        |
| SPC3825 | miR-21     | 5'-FAM TcTgtCAGaTaCgAT-3' (diseño nuevo) (SEC ID nº 67)           |
| SPC3826 | miR-21(mm) | 5'-FAM TcAgTCTGaTaAgCT-3'-(SEC ID nº 68)                          |
| SPC3827 | miR-21     | 5'-FAM TcAgTCTGaTaAgCT-3' (diseño nuevo mejorado) -(SEC ID nº 69) |

Todos los compuestos presentaban un esqueleto totalmente o prácticamente totalmente tiolado, además de un marcaje FAM en el extremo 5'.

Se ha demostrado que miR-21 se encuentra regulado positivamente tanto en el glioblastoma (Chan et al., Cancer Research 65(14):6029-6033, 2005) y Ørum et al. Cancer Research 65(16):7065, 2005) y por lo tanto se ha considerado un microARN potencialmente 'oncogénico'. Chan et al. también demuestran inducción de apoptosis en las células de glioblastoma mediante la antagonización de miR-21 con oligonucleótidos antisentido 2'OMe o modificados con ANB. Por lo tanto, los agentes que antagonizan miR-21 presentan el potencial de convertirse en terapéuticos para el tratamiento del glioblastoma y otros tumores sólidos, tales como el cáncer de mama. Los presentes inventores presentan un oligonucleótido modificado con ANB mejorado con diana en miR-21, un ANB-

antimiR™, con propiedades inesperadamente buenas de inhibición de miR-21 adecuadas para los fines terapéuticos anteriormente indicados.

- 5 Son vías de administración terapéutica adecuadas, por ejemplo, las inyecciones intracraneales en glioblastomas, las inyecciones intratumorales en el glioblastoma y el cáncer de mama, así como la administración sistémica en el cáncer de mama.

*Inhibición de miR-21 en la línea celular de glioblastoma U373 y en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.*

- 10 Se evaluó la eficacia del ANB-antimir™ actual mediante la transfección a diferentes concentraciones, conjuntamente con oligonucleótidos de control, en las líneas celulares U373 y MCF-7 que es conocido que expresan miR-21 (o también otras líneas celulares que expresan miR-21). Se llevó a cabo la transfección utilizando un protocolo estándar con lipofectamina-2000 (Invitrogen). Veinticuatro horas después de la transfección se recolectaron las células y se extrajo el ARN total utilizando el protocolo de Trizol (Invitrogen). La evaluación de los niveles de miR-21, según el tratamiento y concentración utilizados, mediante RT-PCR en tiempo real de tallo-bucle específica de miR-21 (Applied Biosystems), o alternativamente mediante análisis de transferencia northern no reactivos específicos de miR-21. Los niveles de miR-21 detectados en comparación con el control de vehículo reflejan el potencial inhibidor del ANB-antimir™.

- 20 *Inhibición funcional de miR-21 mediante evaluación de la regulación positiva del gen diana miR-21.*

- 25 Se investigó el efecto del antagonismo de miR-21 mediante clonación de la secuencia diana miR-21 de correspondencia perfecta tras un sistema de informador estándar de luciferasa de *Renilla* (entre la secuencia codificante y la RNT 3', psiCHECK-2, Promega); ver el Ejemplo 29. El constructo de informador y ANB-antimir™ se cotransfectó en líneas celulares expresantes de miR-21 (p. ej. U373 o MCF-7). Se recolectaron las células 24 horas después de la transfección en tampón de lisis pasiva y se midió la actividad de luciferasa siguiendo un protocolo estándar (Promega, sistema de ensayo de informador de luciferasa dual). Se utilizó la inducción de la actividad de luciferasa para demostrar el efecto funcional de la antagonización de miR-21 por parte de ANB-antimir™.

- 30 ***Ejemplo 29: ensayo de informador de luciferasa para evaluar la inhibición funcional de microARN por ANB-antimir y otros oligos con diana en microARN: generalización del diseño nuevo y del diseño nuevo mejorado como diseño preferente para el bloqueo de la función del microARN***

- 35 Oligos utilizados en el presente ejemplo (mayúscula: ANB; minúscula: ADN) para evaluar el efecto desrepresor de ANB-antimir sobre el informador de luciferasa con la secuencia diana de microARN clonada mediante el bloqueo del microARN respectivo:

|                                                    |                              |
|----------------------------------------------------|------------------------------|
| diana: hsa-miR-122a MIMAT0000421                   |                              |
| uggagugugacaaugguguuugu                            |                              |
| Cribado en línea celular HUH-7 que expresa miR-122 |                              |
| nº de oligo, microARN diana, secuencia de oligo    | Diseño                       |
| 3962: miR-122 5'-ACAAacaccattgtcacacTCCA-3'        | Complemento completo, hueco  |
| 3965: miR-122 5'-acaaacACCATTTGTcactcca-3'         | Complemento completo, bloque |
| 3972: miR-122 5'-acAaaCacCatTgtCacActCca-3'        | Complemento completo, ANB_3  |
| 3549 (3649): miR-122 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3'         | Diseño nuevo                 |
| 3975: miR-122 5'-CcAtTGTcaCACtCC-3'                | Diseño nuevo mejorado        |
| diana: hsa-miR-19b MIMAT0000074                    |                              |
| ugugcaaaauccaugcaaaacuga                           |                              |
| línea celular HeLa cribada que expresa miR-19b     |                              |
| nº de oligo, microARN diana, secuencia de oligo    | Diseño                       |
| 3963: miR-19b 5'-TCAGtttgcattgattgCACA-3'          | Complemento completo, hueco  |
| 3967: miR-19b 5'-tcagttTfGCATGGattgcaca-3'         | Complemento completo, bloque |
| 3973: miR-19b 5'-tcAgtTtGcaTggAttTgcAca-3'         | Complemento completo, ANB_3  |
| 3560: miR-19b 5'-TgCatGGatTtGcAC-3'                | Diseño nuevo                 |
| 3976: miR-19b 5'-TgCaTGGatTTGcAC-3'                | Diseño nuevo mejorado        |
| diana: hsa-miR-155 MIMAT0000646                    |                              |
| uuaaugcuaaucgugauagggg                             |                              |
| cribado en línea celular 518A2 que expresa miR-155 |                              |
| nº de oligo, microARN diana, secuencia de oligo    | Diseño                       |
| 3964: miR-155 5'-CCCCtatcacgattagcaTTAA-3'         | Complemento completo, hueco  |
| 3968: miR-155 5'-cccctaTCACGATTtagcattaa-3'        | Complemento completo, bloque |
| 3974: miR-155 5'-cCccTatCacGatTagCatTaa-3'         | Complemento completo, ANB_3  |

|                                      |                       |
|--------------------------------------|-----------------------|
| 3758: miR-155 5'-TcAcgATtaGcAtTA-3'  | Diseño nuevo          |
| 3818: miR-155 5'-TcAcGATtaGCAAtTA-3' | Diseño nuevo mejorado |

SEC ID nº tal como anteriormente.

Se construyó un plásmido informador (psiCheck-2, Promega) codificante de las variantes tanto de *Renilla* como de luciérnaga de la luciferasa, de manera que la RNT 3' de la luciferasa de *Renilla* incluyese una única copia de una secuencia totalmente complementaria al ARNmi investigado.

Las células que expresaban endógenamente los ARNmi investigados (Huh-7 para miR-122a, HeLa para miR-19b, 518A2 para miR-155) se cotransfectaron con ANB-antimiR u otros oligonucleótidos ligantes de miR (el complemento completo, es decir de longitud completa) y el plásmido informador de microARN diana correspondiente utilizando Lipofectamina-2000 (Invitrogen). La transfección y la medición de la actividad de luciferasa se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (kit de Lipofectamina-2000 de Invitrogen/luciferasa dual de Promega) utilizando 150.000 a 300.000 células en cada pocillo de placas de 6 pocillos. Para compensar las variables densidades celulares y eficiencias de transfección, la señal de la luciferasa de *Renilla* se normalizó con la señal de la luciferasa de luciérnaga. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Inesperadamente, el diseño nuevo y el diseño nuevo mejorado fueron los mejores inhibidores funcionales para los tres microARN diana: miR-155, miR-19b y miR-122 (figuras 27, 28 y 29). Se resumen los resultados en la Tabla 3 a continuación.

Resumen de los resultados:

Tabla 3. Grado de desrepresión de la función endógena de miR-155, miR-19b y miR-122a por diversos diseños de ANB-antimiR.

| Diseño                       | miR-155 | miR-19b    | miR-122a   |
|------------------------------|---------|------------|------------|
| Diseño nuevo mejorado        | ***     | ***        | no data    |
| Diseño nuevo                 | ***     | ***        | ***        |
| Complemento completo, ANB_3  | **      | ***        | **         |
| Complemento completo, bloque | **      | **         | **         |
| Complemento completo, hueco  | *       | no signif. | no signif. |

#### Referencias

- Abelson, J.F. et al. 2005. Science 310: 317-20.  
 Bartel, D.P. 2004. Cell 116: 281-297.  
 Boehm, M., Slack, F. 2005. Science. 310:1954-7.  
 Brennecke, J. et al. 2003 Cell 113: 25-36.  
 Calin, G.A. et al. 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 15524-15529.  
 Calin, G. A. et al. 2004. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 2999-3004.  
 Calin, G.A. et al. 2005. N. Engl. J. Med. 353:1793-801  
 Chan, J.A. et al. 2005. Cancer Res. 65:6029-33.  
 Chen, C.Z., et al. 2004. Science 303: 83-86.  
 Chen, J.F., et al. 2005. Nat Genet. Dec 25, advance online publication.  
 Eis, P.S. et al. 2005. Proc Natl Acad Sci USA. 102: 3627-32.  
 Giraldez, A.J. et al. 2005. Science 308: 833-838.  
 Griffiths-Jones, S. et al. 2004. Nucleic Acids Res. 32: D109-D111.  
 Griffiths-Jones, S., et al. 2006. Nucleic Acids Res. 34: D140-4  
 He, L. et al. 2005. Nature 435: 828-833.  
 Hornstein, E. et al. 2005. Nature 438: 671-4.  
 Hutvagner, G. et al 2001. Science 293: 834-838.  
 Hutvagner, G. et al. 2004. PLoS Biology 2: 1-11.  
 Iorio, M.V. et al. 2005. Cancer Res. 65: 7065-70.  
 Jin, P. et al. 2004. Nat Cell Biol. 6: 1048-53.  
 Johnson, S.M. et al. 2005. Cell 120: 635-647.  
 Jopling, C.L. et al. 2005. Science 309:1577-81.  
 Ketting, R.F. et al. 2001. Genes Dev. 15: 2654-2659.  
 Kwon, C. et al. 2005. Proc Natl Acad Sci USA. 102: 18986-91.  
 Landthaler, M. et al. 2004. Curr. Biol. 14: 2162-2167.  
 Leaman, D. et al. 2005. Cell 121: 1097-108.  
 Lee, Y., et al. 2003. Nature 425: 415-419.  
 Li, X. and Carthew, R.W. 2005. Cell 123: 1267-77.  
 Lu, J. et al. 2005. Nature 435: 834-838.

Michael, M.Z.et al. 2003. Mol. Cancer Res. 1: 882-891.  
 Nelson, P. et al. 2003. TIBS 28: 534-540.  
 Paushkin, S., et al. 2002.Curr.Opin.Cell Biol. 14: 305-312.  
 Poy, M.N. et al. 2004. Nature 432: 226-230.  
 Wienholds, E. et al. 2005. Science 309: 310-311.  
 Yekta, S. et al. 2004. Science 304: 594-596.  
 Zhao, Y. et al. 2005. Nature 436: 214-220.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Elmen, Joacim  
 Kearney, Phil  
 Kauppinen, Sakari

15 <120> COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

<130> 2763.0140006

<140> 12/295,960 <141> 2009-08-20

20 <150> PCT/DK2007/000168  
 <151> 2007-03-30

<150> PA 2006 00478

25 <151> 2006-04-03

<150> US 60/788,995  
 <151> 2006-04-03

30 <150> PA 2006 00615  
 <151> 2006-05-01

<150> US 60/796,813  
 <151> 2006-05-01

35 <150> US 60/838,710  
 <151> 2006-08-18

<150> PA 2006 01401

40 <151> 2006-10-30

<160> 110

<170> PatentIn versión 3.3

45 <210> 1  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

50 <400> 1  
 uggaguguga caaugguguu ugu 23

<210> 2

55 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

60 ugugcaaauc caugcaaaac uga 23

<210> 3  
 <211> 22  
 <212> ARN

65 <213> Homo sapiens

|    |                                                               |    |
|----|---------------------------------------------------------------|----|
|    | <400> 3<br>uuaaugcuua ucgugauagg gg                           | 22 |
| 5  | <210> 4<br><211> 22<br><212> ARN<br><213> Homo sapiens        |    |
| 10 | <400> 4<br>uagcuuauca gacugauguu ga                           | 22 |
| 15 | <210> 5<br><211> 22<br><212> ARN<br><213> Homo sapiens        |    |
| 20 | <400> 5<br>uuuguucguu cggcucgcu ga                            | 22 |
| 25 | <210> 6<br><211> 6<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 30 | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                      |    |
| 35 | <400> 6<br>tttgca 6                                           |    |
| 40 | <210> 7<br><211> 6<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 45 | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                      |    |
| 50 | <400> 7<br>acactc 6                                           |    |
| 55 | <210> 8<br><211> 6<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 60 | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                      |    |
| 65 | <400> 9<br>cgaaca 6                                           |    |
|    | <210> 10<br><211> 6<br><212> ADN                              |    |

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 5  
 <400> 10  
 ataagc 6  
 <210> 11  
 10 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 2, 3, 4, 20, 21, 22, 23  
 20 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 <400> 11  
 acaaacacca ttgtcacact cca 23  
 25 <210> 12  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 35 <222> 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 <400> 12  
 acaaacacca ttgtcacact cca 23  
 40 <210> 13  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 50 <222> 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 <400> 13  
 55 acaaacacca ttgtcacact cca 23  
 <210> 14  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 65 <220>  
 <221> misc\_feature

<222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

5 <400> 14  
 ccattgtcac actcc 15

10 <210> 15  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

20 <400> 15  
 ccattgtcac actcc 15

25 <210> 16  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

<400> 16  
 attgtcacac tcc 13

40 <210> 17  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

<400> 17  
 tgtcacactc c 11

55 <210> 18  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13  
 <223> unidades de 2'-OME-ARN  
 5  
 <400> 18  
 ccattgtcac actcc 15  
 <210> 19  
 10 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15  
 20 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13  
 25 <223> unidades de 2'-fluoro ADN  
 <400> 19  
 ccattgtcac actcc 15  
 30 <210> 20  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 40 <222> 1, 2, 3, 4, 20, 21, 22, 23  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 <400> 20  
 tcagttttgc atggattgc aca 23  
 45 <210> 21  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14  
 55 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 <400> 21  
 60 tcagttttgc atggattgc aca 23  
 <210> 22  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

10 <400> 22  
 tcagtttgc atggattgc aca 23

15 <210> 23  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

25 <400> 23  
 tgcattgatt tgcac 15

30 <210> 24  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

40 <400> 24  
 tgcattgatt tgcac 15

45 <210> 25  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

60 <400> 25  
 catggattg cac 13

60 <210> 26  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

|    |                                     |    |
|----|-------------------------------------|----|
|    | <220>                               |    |
|    | <221> misc_feature                  |    |
|    | <222> 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11   |    |
|    | <223> Nucleótido modificado con ANB |    |
| 5  | <400> 26                            |    |
|    | tggatttgca c                        | 11 |
|    | <210> 27                            |    |
| 10 | <211> 15                            |    |
|    | <212> ADN                           |    |
|    | <213> Secuencia artificial          |    |
|    | <220>                               |    |
| 15 | <223> Oligonucleótido sintético     |    |
|    | <220>                               |    |
|    | <221> misc_feature                  |    |
|    | <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15    |    |
| 20 | <223> Nucleótido modificado con ANB |    |
|    | <220>                               |    |
|    | <221> misc_feature                  |    |
|    | <222> 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13         |    |
| 25 | <223> 2-prime-OME-ARN units         |    |
|    | <400> 27                            |    |
|    | tgcatggatt tgcac                    | 15 |
| 30 | <210> 28                            |    |
|    | <211> 15                            |    |
|    | <212> ADN                           |    |
|    | <213> Secuencia artificial          |    |
| 35 | <220>                               |    |
|    | <223> Oligonucleótido sintético     |    |
|    | <220>                               |    |
|    | <221> misc_feature                  |    |
| 40 | <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15    |    |
|    | <223> Nucleótido modificado con ANB |    |
|    | <220>                               |    |
|    | <221> misc_feature                  |    |
| 45 | <222> 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13         |    |
|    | <223> unidades de 2'-fluoro ADN     |    |
|    | <400> 28                            |    |
| 50 | tgcatggatt tgcac                    | 15 |
|    | <210> 29                            |    |
|    | <211> 22                            |    |
|    | <212> ADN                           |    |
|    | <213> Secuencia artificial          |    |
| 55 | <220>                               |    |
|    | <223> Oligonucleótido sintético     |    |
|    | <220>                               |    |
|    | <221> misc_feature                  |    |
| 60 | <222> 1, 2, 3, 4, 20, 21, 22, 23    |    |
|    | <223> Nucleótido modificado con ANB |    |
|    | <400> 29                            |    |
| 65 | cccctatcac gattagcatt aa            | 22 |

|    |                                         |    |
|----|-----------------------------------------|----|
|    | <210> 30                                |    |
|    | <211> 22                                |    |
|    | <212> ADN                               |    |
|    | <213> Secuencia artificial              |    |
| 5  | <220>                                   |    |
|    | <223> Oligonucleótido sintético         |    |
|    | <220>                                   |    |
| 10 | <221> misc_feature                      |    |
|    | <222> 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14       |    |
|    | <223> Nucleótido modificado con ANB     |    |
|    | <400> 30                                |    |
| 15 | cccctatcac gattagcatt aa                | 22 |
|    | <210> 31                                |    |
|    | <211> 22                                |    |
|    | <212> ADN                               |    |
| 20 | <213> Secuencia artificial              |    |
|    | <220>                                   |    |
|    | <223> Oligonucleótido sintético         |    |
| 25 | <220>                                   |    |
|    | <221> misc_feature                      |    |
|    | <222> 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20           |    |
|    | <223> Nucleótido modificado con ANB     |    |
|    | <400> 31                                |    |
| 30 | cccctatcac gattagcatt aa                | 22 |
|    | <210> 32                                |    |
|    | <211> 15                                |    |
| 35 | <212> ADN                               |    |
|    | <213> Secuencia artificial              |    |
|    | <220>                                   |    |
|    | <223> Oligonucleótido sintético         |    |
| 40 | <220>                                   |    |
|    | <221> misc_feature                      |    |
|    | <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15        |    |
|    | <223> Nucleótido modificado con ANB     |    |
| 45 | <400> 32                                |    |
|    | tcacgattag catta                        | 15 |
|    | <210> 33                                |    |
|    | <211> 15                                |    |
| 50 | <212> ADN                               |    |
|    | <213> Secuencia artificial              |    |
|    | <220>                                   |    |
| 55 | <223> Oligonucleótido sintético         |    |
|    | <220>                                   |    |
|    | <221> misc_feature                      |    |
|    | <222> 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15 |    |
| 60 | <223> Nucleótido modificado con ANB     |    |
|    | <400> 33                                |    |
|    | tcacgattag catta                        | 15 |
| 65 | <210> 34                                |    |
|    | <211> 13                                |    |

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13  
 10 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 <400> 34  
 acgattagca tta 13  
 15 <210> 35  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11  
 25 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 <400> 35  
 gattagcatt a 11  
 30 <210> 36  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 40 <222> 1, 3, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 45 <222> 2, 4, 5, 9, 11, 13  
 <223> unidades de 2'-OME ARN  
 <400> 36  
 tcacgattag catta 15  
 50 <210> 37  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 60 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 65 <222> 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13

|    |                                     |    |
|----|-------------------------------------|----|
|    | <223> unidades de 2'-fluoro ADN     |    |
|    | <400> 37                            |    |
| 5  | tcacgattag catta                    | 15 |
|    | <210> 38                            |    |
|    | <211> 22                            |    |
|    | <212> ADN                           |    |
| 10 | <213> Secuencia artificial          |    |
|    | <220>                               |    |
|    | <223> Oligonucleótido sintético     |    |
|    | <220>                               |    |
| 15 | <221> misc_feature                  |    |
|    | <222> 1, 2, 3, 4, 20, 21, 22, 23    |    |
|    | <223> Nucleótido modificado con ANB |    |
|    | <400> 38                            |    |
| 20 | tcaacatcag tctgataagc ta            | 22 |
|    | <210> 39                            |    |
|    | <211> 22                            |    |
|    | <212> ADN                           |    |
| 25 | <213> Secuencia artificial          |    |
|    | <220>                               |    |
|    | <223> Oligonucleótido sintético     |    |
| 30 | <220>                               |    |
|    | <221> misc_feature                  |    |
|    | <222> 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14   |    |
|    | <223> Nucleótido modificado con ANB |    |
| 35 | <400> 39                            |    |
|    | tcaacatcag tctgataagc ta            | 22 |
|    | <210> 40                            |    |
|    | <211> 22                            |    |
| 40 | <212> ADN                           |    |
|    | <213> Secuencia artificial          |    |
|    | <220>                               |    |
| 45 | <223> Oligonucleótido sintético     |    |
|    | <220>                               |    |
|    | <221> misc_feature                  |    |
|    | <222> 3, 6, 9, 12, 15, 18, 19, 21   |    |
|    | <223> Nucleótido modificado con ANB |    |
| 50 | <400> 40                            |    |
|    | tcatcatcag tctgataagc tt            | 22 |
|    | <210> 41                            |    |
| 55 | <211> 15                            |    |
|    | <212> ADN                           |    |
|    | <213> Secuencia artificial          |    |
|    | <220>                               |    |
| 60 | <223> Oligonucleótido sintético     |    |
|    | <220>                               |    |
|    | <221> misc_feature                  |    |
|    | <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15    |    |
| 65 | <223> Nucleótido modificado con ANB |    |

|    |                                                                                                                |    |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | <400> 41<br>tcagtctgat aagct                                                                                   | 15 |
| 5  | <210> 42<br><211> 15<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                                |    |
| 10 | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                                                                       |    |
| 15 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15<br><223> Nucleótido modificado con ANB  |    |
|    | <400> 42<br>tcagtctgat aagct                                                                                   | 15 |
| 20 | <210> 43<br><211> 13<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                                |    |
| 25 | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                                                                       |    |
| 30 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13<br><223> Nucleótido modificado con ANB |    |
|    | <400> 43<br>agtctgataa gct                                                                                     | 13 |
| 35 | <210> 44<br><211> 11<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                                |    |
| 40 | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                                                                       |    |
| 45 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11<br><223> Nucleótido modificado con ANB        |    |
|    | <400> 44<br>tctgataagc t                                                                                       | 15 |
| 50 | <210> 45<br><211> 15<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                                |    |
| 55 | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                                                                       |    |
| 60 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15<br><223> Nucleótido modificado con ANB         |    |
| 65 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13<br><223> unidades de 2'-OME ARN                     |    |

|    |                                                                                                         |    |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | <400> 45<br>tcagtctgat aagct                                                                            | 15 |
| 5  | <210> 46<br><211> 15<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                         |    |
| 10 | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                                                                |    |
| 15 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15<br><223> Nucleótido modificado con ANB  |    |
| 20 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13<br><223> 2-prime-fluoro ADN units            |    |
| 25 | <400> 46<br>tcagtctgat aagct                                                                            | 15 |
| 30 | <210> 47<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                         |    |
| 35 | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                                                                |    |
| 40 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 1, 2, 3, 4, 19, 20, 21, 22<br><223> Nucleótido modificado con ANB  |    |
| 45 | <400> 47<br>tctcgcgtgc cggtcgttct tt                                                                    | 22 |
| 50 | <210> 48<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                         |    |
| 55 | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                                                                |    |
| 60 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14<br><223> Nucleótido modificado con ANB |    |
| 65 | <400> 48<br>tctcgcgtgc cggtcgttct tt                                                                    | 22 |
|    | <210> 49<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                         |    |
|    | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                                                                |    |
|    | <220><br><221> misc_feature                                                                             |    |

<222> 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

5 <400> 49  
 tctcgcgtgc cgttcgtct tt 22

10 <210> 50  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

20 <400> 50  
 gtgccgttcg ttctt 15

25 <210> 51  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

<400> 51  
 gtgccgttcg ttctt 15

40 <210> 52  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

<400> 52  
 gccgttcggtt ctt 13

55 <210> 53  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

|    |                                                                                                        |    |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | <400> 53<br>cgttcgttct t                                                                               | 11 |
| 5  | <210> 54<br><211> 15<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                        |    |
| 10 | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                                                               |    |
| 15 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15<br><223> Nucleótido modificado con ANB |    |
| 20 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13<br><223> 2-prime-OME ARN units              |    |
| 25 | <400> 54<br>gtgccgttcg ttctt                                                                           | 15 |
| 30 | <210> 55<br><211> 15<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                        |    |
| 35 | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                                                               |    |
| 40 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15<br><223> Nucleótido modificado con ANB |    |
| 45 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13<br><223> unidades de 2'-fluoro ARN          |    |
| 50 | <400> 55<br>gtgccgttcg ttctt                                                                           | 15 |
| 55 | <210> 56<br><211> 16<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                        |    |
| 60 | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                                                               |    |
| 65 | <220><br><221> misc_feature<br><222> (1)...(16)<br><223> phosphorothioate linkage                      |    |
|    | <220><br><221> misc_feature<br><222> 2, 8, 14<br><223> citosina 5'-metilada modificada con ANB         |    |
|    | <220><br><221> misc_feature<br><222> 5, 11                                                             |    |

<223> Nucleótido modificado con ANB  
 <400> 56  
 ccatgtcac actcca 16  
 5  
 <210> 57  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(16)  
 <223> enlace fosforotioato  
 15  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 3, 6, 9  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 20  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 12, 15  
 <223> citosina 5'-metilada, modificada con ANB  
 25  
 <400> 57  
 ccatgtcac actcca 16  
 30  
 <210> 58  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 40  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(16)  
 <223> enlace fosforotioato  
 45  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 2, 14, 15  
 <223> LNA modified, 5-prime methylated cytosine  
 50  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 3, 13  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 55  
 <400> 58  
 ccatgtcac actcca 16  
 60  
 <210> 59  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 65  
 <220>

|    |                                                |    |
|----|------------------------------------------------|----|
|    | <221> misc_feature                             |    |
|    | <222> (1)...(15)                               |    |
|    | <223> enlace fosforotioato                     |    |
| 5  | <220>                                          |    |
|    | <221> misc_feature                             |    |
|    | <222> 1, 10, 12, 14, 15                        |    |
|    | <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB |    |
| 10 | <220>                                          |    |
|    | <221> misc_feature                             |    |
|    | <222> 3, 6, 7                                  |    |
|    | <223> Nucleótido modificado con ANB            |    |
| 15 | <400> 59                                       |    |
|    | ccattgtcac actcc                               | 15 |
|    | <210> 60                                       |    |
|    | <211> 15                                       |    |
| 20 | <212> ADN                                      |    |
|    | <213> Secuencia artificial                     |    |
|    | <220>                                          |    |
|    | <223> Oligonucleótido sintético                |    |
| 25 | <220>                                          |    |
|    | <221> misc_feature                             |    |
|    | <222> (1)...(15)                               |    |
|    | <223> enlace fosforotioato                     |    |
| 30 | <220>                                          |    |
|    | <221> misc_feature                             |    |
|    | <222> 1, 6, 10, 12, 15                         |    |
|    | <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB |    |
| 35 | <220>                                          |    |
|    | <221> misc_feature                             |    |
|    | <222> 3, 7, 14                                 |    |
|    | <223> Nucleótido modificado con ANB            |    |
| 40 | <400> 60                                       |    |
|    | ccattctgac cctac                               | 15 |
|    | <210> 61                                       |    |
| 45 | <211> 16                                       |    |
|    | <212> ADN                                      |    |
|    | <213> Secuencia artificial                     |    |
|    | <220>                                          |    |
| 50 | <223> Oligonucleótido sintético                |    |
|    | <220>                                          |    |
|    | <221> misc_feature                             |    |
|    | <222> (1)...(16)                               |    |
| 55 | <223> enlace fosforotioato                     |    |
|    | <220>                                          |    |
|    | <221> misc_feature                             |    |
|    | <222> 3, 6, 9, 12                              |    |
| 60 | <223> Nucleótido modificado con ANB            |    |
|    | <220>                                          |    |
|    | <221> misc_feature                             |    |
|    | <222> 15                                       |    |
| 65 | <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB |    |

|    |                                                                                                         |    |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | <400> 61<br>ccattgtctc aatcca                                                                           | 16 |
| 5  | <210> 62<br><211> 13<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                         |    |
| 10 | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                                                                |    |
| 15 | <220><br><221> misc_feature<br><222> (1)...(13)<br><223> enlace fosforotioato                           |    |
| 20 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 1, 4, 5<br><223> Nucleótido modificado con ANB                     |    |
| 25 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 8, 10, 12, 13<br><223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB    |    |
| 30 | <220><br><400> 62<br>attgtcacac tcc                                                                     | 13 |
| 35 | <210> 63<br><211> 15<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                         |    |
| 40 | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                                                                |    |
| 45 | <220><br><221> misc_feature<br><222> (1)..(15)<br><223> Enlace fosforotioato                            |    |
| 50 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 1, 6, 10, 12, 15<br><223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB |    |
| 55 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 3, 7, 14<br><223> Nucleótido modificado con ANB                    |    |
| 60 | <400> 63<br>ccattctgac cctac                                                                            | 15 |
| 65 | <210> 64<br><211> 22<br><212> ARN<br><213> Homo sapiens                                                 |    |
|    | <400> 64<br>uagcuauca gacugauguu ga                                                                     | 22 |
|    | <210> 65                                                                                                |    |

<211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> 1, 2, 3, 13, 14, 15  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

<400> 65  
 tcagtctgat aagcta 16  
 15

<210> 66  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 2, 3, 13, 14, 15  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

<400> 66  
 30 tccgtcttag aagata 16

<210> 67  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 3, 6, 7, 10 12, 14, 15  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

45 <400> 67  
 tctgtcagat acgat 15

<210> 68  
 <211> 15  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 55

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 3, 6, 7, 10 12, 14, 15  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 60

<400> 68  
 tcagtctgat aagct 15

<210> 69  
 65 <211> 15  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 3, 4, 6, 7, 8, 10 12, 14, 15  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 10  
 <400> 69  
 tcagtctgat aagct 15  
 <210> 70  
 15 <211> 7  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 70  
 atttgca 7  
 25 <210> 71  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 71  
 35 gatttgca 8  
 <210> 72  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 72  
 45 ggatttgca 9  
 <210> 73  
 <211> 7  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 55 <400> 73  
 cacactc 7  
 <210> 74  
 <211> 8  
 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 65

<400> 74  
 tcacactc 8  
  
 5 <210> 75  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 75  
 gtcacactc 9  
  
 15 <210> 76  
 <211> 7  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 76  
 tagcatt 7  
 25  
 <210> 77  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 77  
 ttagcatt 8  
 35  
 <210> 78  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 45  
 <400> 78  
 attagcatt 9  
  
 <210> 79  
 <211> 7  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 55  
 <400> 79  
 acgaaca 7  
  
 <210> 80  
 60 <211> 8  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 65 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 80  
 aacgaaca 8

5 <210> 81  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 81  
 gaacgaaca 9

15 <210> 82  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 3, 15  
 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 6, 9, 12  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

35 <400> 82  
 tgcattgatt tgcaca 16

40 <210> 83  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 3, 15  
 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 6, 9, 12  
 <223> Nucleótido modificado con ANB

55 <400> 83  
 tgcattgatt tgcac 15

60 <210> 84  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>  
 <221> misc\_feature

<222> 1, 13  
 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB  
  
 <220>  
 5 <221> misc\_feature  
 <222> 4, 7, 10  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
  
 <400> 84  
 10 catggatttg cac 13  
  
 <210> 85  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
  
 25 <400> 85  
 tgcattgatt tgcac 15  
  
 <210> 86  
 <211> 13  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 35  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 40  
 <400> 86  
 catggatttg cac 13  
  
 <210> 87  
 45 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 50 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 13  
 55 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 4, 5, 8, 10, 12  
 60 <223> Nucleótido modificado con ANB  
  
 <400> 87  
 catggatttg cac 13  
  
 65 <210> 88  
 <211> 15

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 3, 15  
 10 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 6, 7, 10, 12, 14  
 15 <223> Nucleótido modificado con ANB  
  
 <400> 88  
 tgcattgatt tgcac 15  
  
 20 <210> 89  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> 3, 15  
 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 35 <222> 1, 5, 7, 9, 10, 12, 14  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
  
 <400> 89  
 tgcattgatt tgcaca 16  
 40  
 <210> 90  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 50 <222> 2, 8, 14  
 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 55 <222> 5, 11  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
  
 <400> 90  
 60 ccattgtcac actcca 16  
  
 <210> 91  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <220>  
 5 <221> misc\_feature  
 <222> 2, 14  
 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB  
  
 <220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> 5, 8, 11  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
  
 <400> 91  
 15 ccattgtaac tctcca 16  
  
 <210> 92  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> 12, 15  
 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB  
  
 <220>  
 30 <221> misc\_feature  
 <222> 3, 6, 9  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
  
 <400> 92  
 35 ccattgtcac actcca 16  
  
 <210> 93  
 <211> 15  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 45  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 2, 8, 14  
 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB  
 50  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 5, 11  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 55  
 <400> 93  
 ccattgtcac actcc 15  
  
 <210> 94  
 60 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 65 <223> Oligonucleótido sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 6, 12  
 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 3, 9  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 10  
 <400> 94  
 attgtcacac tcc 13  
 <210> 95  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 12, 15  
 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB  
 25  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 3, 6, 9  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 30  
 <400> 95  
 ccattgtcac actcc 15  
 35  
 <210> 96  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 10, 13  
 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB  
 45  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 4, 7  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 50  
 <400> 96  
 attgtcacac tcc 13  
 55  
 <210> 97  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 65  
 <220>  
 <221> misc\_feature

|    |                                                |    |
|----|------------------------------------------------|----|
|    | <222> 6, 8, 10, 12                             |    |
|    | <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB |    |
|    | <220>                                          |    |
| 5  | <221> misc_feature                             |    |
|    | <222> 2, 4                                     |    |
|    | <223> Nucleótido modificado con ANB            |    |
|    | <400> 97                                       |    |
| 10 | attgtcacac tcc                                 | 13 |
|    | <210> 98                                       |    |
|    | <211> 13                                       |    |
|    | <212> ADN                                      |    |
| 15 | <213> Secuencia artificial                     |    |
|    | <220>                                          |    |
|    | <223> Oligonucleótido sintético                |    |
| 20 | <220>                                          |    |
|    | <221> misc_feature                             |    |
|    | <222> 8, 10, 12, 13                            |    |
|    | <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB |    |
| 25 | <220>                                          |    |
|    | <221> misc_feature                             |    |
|    | <222> 1, 4, 5                                  |    |
|    | <223> Nucleótido modificado con ANB            |    |
| 30 | <400> 98                                       |    |
|    | attgtcacac tcc                                 | 13 |
|    | <210> 99                                       |    |
|    | <211> 15                                       |    |
| 35 | <212> ADN                                      |    |
|    | <213> Secuencia artificial                     |    |
|    | <220>                                          |    |
|    | <223> Oligonucleótido sintético                |    |
| 40 | <220>                                          |    |
|    | <221> misc_feature                             |    |
|    | <222> 1, 10, 12, 14, 15                        |    |
|    | <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB |    |
| 45 | <220>                                          |    |
|    | <221> misc_feature                             |    |
|    | <222> 3, 6, 7                                  |    |
|    | <223> Nucleótido modificado con ANB            |    |
| 50 | <400> 99                                       |    |
|    | ccattgtcac actcc                               | 15 |
|    | <210> 100                                      |    |
| 55 | <211> 16                                       |    |
|    | <212> ADN                                      |    |
|    | <213> Secuencia artificial                     |    |
|    | <220>                                          |    |
| 60 | <223> Oligonucleótido sintético                |    |
|    | <220>                                          |    |
|    | <221> misc_feature                             |    |
|    | <222> 1, 15                                    |    |
| 65 | <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB |    |

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 4, 7, 11  
 5 <223> Nucleótido modificado con ANB  
  
 <400> 100  
 ccattgtcac actcca 16  
  
 10 <210> 101  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 20 <222> 1, 2, 14, 15  
 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 25 <222> 3, 13  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
  
 <400> 101  
 ccattgtcac actcca 16  
 30 <210> 102  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 40 <222> 2, 11  
 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 45 <222> 5, 8, 14  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
  
 <400> 102  
 50 tcacgattag cattaa 16  
  
 <210> 103  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 60 <220>  
  
 <221> misc\_feature  
 <222> 5  
 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB  
 65

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 2, 8, 11, 14  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 5  
 <400> 103  
 atcacgatta gcatta 16  
 <210> 104  
 10 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 11  
 20 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 13, 15  
 25 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 <400> 104  
 tcacgattag catata 16  
 30 <210> 105  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 40 <222> 12  
 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 45 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 14  
 <223> Nucleótido modificado con ANB  
 <400> 105  
 atcacgatta gcatta 16  
 50 <210> 106  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 60 <221> misc\_feature  
 <222> 5  
 <223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB  
 <220>  
 65 <221> misc\_feature  
 <222> 2, 8, 11, 14

|    |                                                                                                 |    |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | <223> Nucleótido modificado con ANB                                                             |    |
| 5  | <400> 106<br>gagccgaacg aacaa                                                                   | 15 |
|    | <210> 107<br><211> 13<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                |    |
| 10 | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                                                        |    |
| 15 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 3<br><223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB        |    |
| 20 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 6, 9, 12<br><223> Nucleótido modificado con ANB            |    |
| 25 | <400> 107<br>gccgaacgaa caa                                                                     | 13 |
| 30 | <210> 108<br><211> 15<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                |    |
|    | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                                                        |    |
| 35 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 5, 9, 13<br><223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB |    |
| 40 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 1, 3, 7, 11, 15<br><223> Nucleótido modificado con ANB     |    |
| 45 | <400> 108<br>gagccgaacg aacaa                                                                   | 15 |
| 50 | <210> 109<br><211> 13<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                |    |
|    | <220><br><223> Oligonucleótido sintético                                                        |    |
| 55 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 3, 7, 11<br><223> Citosina 5'-metilada, modificada con ANB |    |
| 60 | <220><br><221> misc_feature<br><222> 1, 5, 9, 13<br><223> Nucleótido modificado con ANB         |    |
| 65 | <400> 109                                                                                       |    |

## ES 2 569 558 T3

|    |                                               |    |
|----|-----------------------------------------------|----|
|    | gccgaacgaa caa                                | 13 |
|    | <210> 110                                     |    |
|    | <211> 15                                      |    |
| 5  | <212> ADN                                     |    |
|    | <213> Secuencia artificial                    |    |
|    | <220>                                         |    |
|    | <223> Oligonucleótido generado sintéticamente |    |
| 10 | <400> 110                                     |    |
|    | ccattgtcac actcc                              | 15 |

## REIVINDICACIONES

1. Oligonucleótido de fórmula:

5 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3' (SEC ID nº 99)

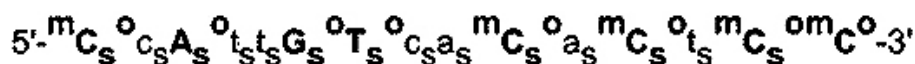
en la que una letra minúscula identifica la base nitrogenada de una unidad de ADN; una letra mayúscula identifica la base nitrogenada de una unidad de ANB y en la que las citosinas de ANB se encuentran opcionalmente metiladas.

10 2. Oligonucleótido según la reivindicación 1, en el que todos los enlaces entre nucleótidos son enlaces fosforotioato.

3. Oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que las citosinas de ANB son 5-metilcitosinas.

15 4. Oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las citosinas de ANB son unidades de beta-D-oxi-ANB.

20 5. Oligonucleótido según la reivindicación 1, de fórmula:



en la que una letra minúscula identifica una unidad de ADN y una letra mayúscula identifica una unidad de ANB; <sup>m</sup>C identifica un ANB 5-metilcitosina, el subíndice <sub>s</sub> identifica un enlace fosforotioato entre nucleósidos y en la que las unidades ANB son beta-D-oxi, tal como se identifica mediante un superíndice <sup>o</sup> después del residuo de ANB.

25 6. Conjugado que comprende el oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y por lo menos una entidad no nucleobase unida al mismo.

30 7. Conjugado según la reivindicación 6, en el que la entidad o entidades no nucleobase comprenden un esteroide, tal como colesterol.

8. Composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el conjugado según la reivindicación 6 o 7, y un diluyente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

35 9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, que comprende compuestos adicionales seleccionados de entre el grupo que consiste de compuestos quimioterapéuticos, compuestos antiinflamatorios, compuestos antiviricos y compuestos inmunomoduladores.

40 10. Oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el conjugado según la reivindicación 8 o 9, para la utilización como medicina.

11. Oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el conjugado según la reivindicación 8 o 9, para la utilización como medicamento.

45 12. Oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el conjugado según la reivindicación 8 o 9, para la utilización en el tratamiento de la hepatitis C.

13. Oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el conjugado según la reivindicación 8 o 9, para la utilización en el tratamiento de un trastorno hepático.

50 14. Oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el conjugado según la reivindicación 8 o 9, para la utilización en el tratamiento de una enfermedad metabólica.

55 15. Oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el conjugado según la reivindicación 8 o 9, para la utilización en el tratamiento de la hipercolesterolemia, la hiperlipidemia, la aterosclerosis o el colesterol plasmático incrementado.

Regulación negativa con ANB anti-miR 122a de miR-122a, en la línea celular Huh-7

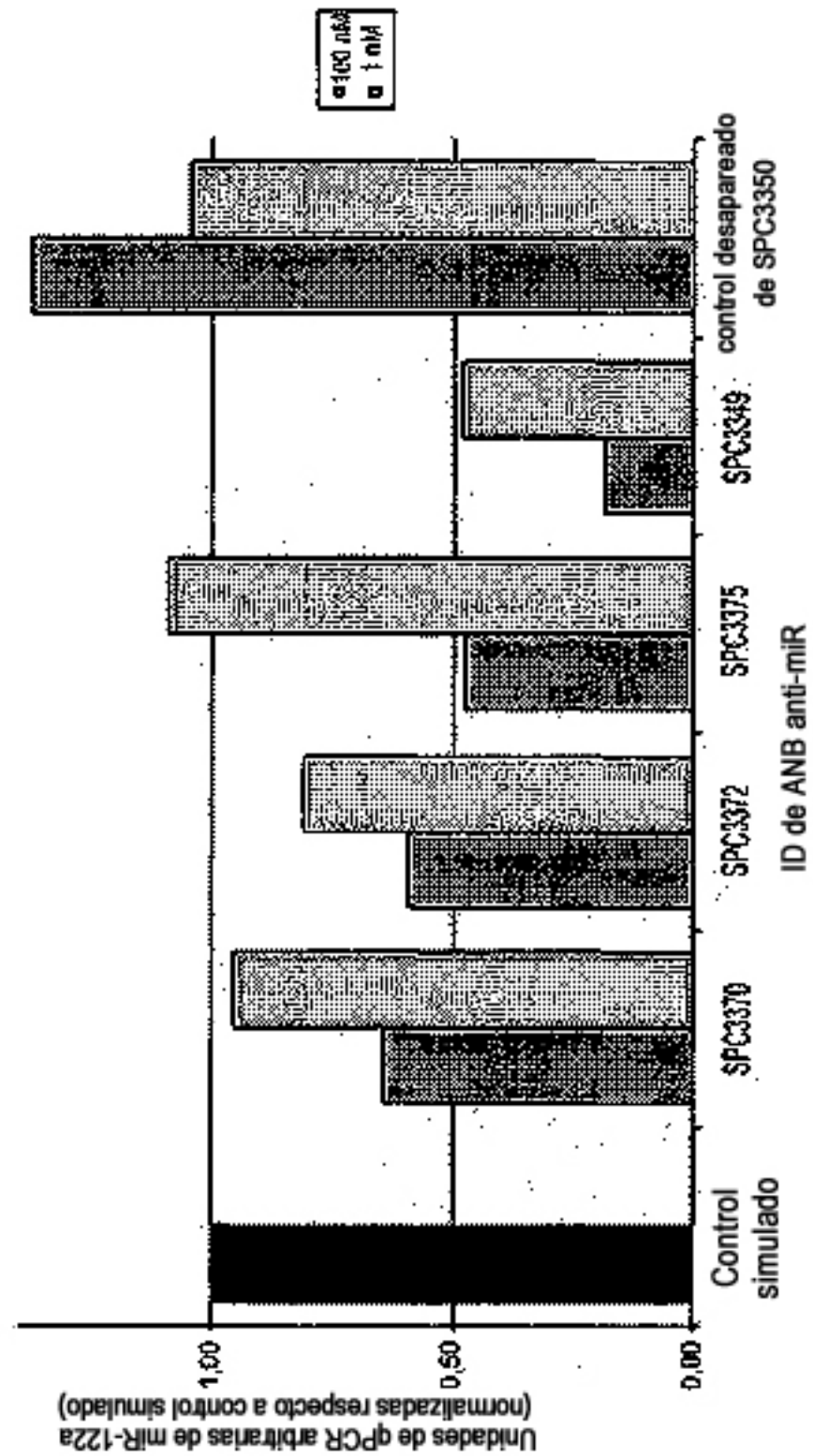


Figura 1

niveles de miR-122a en hígados de ratón tras el tratamiento con diferentes ANB-antimiR

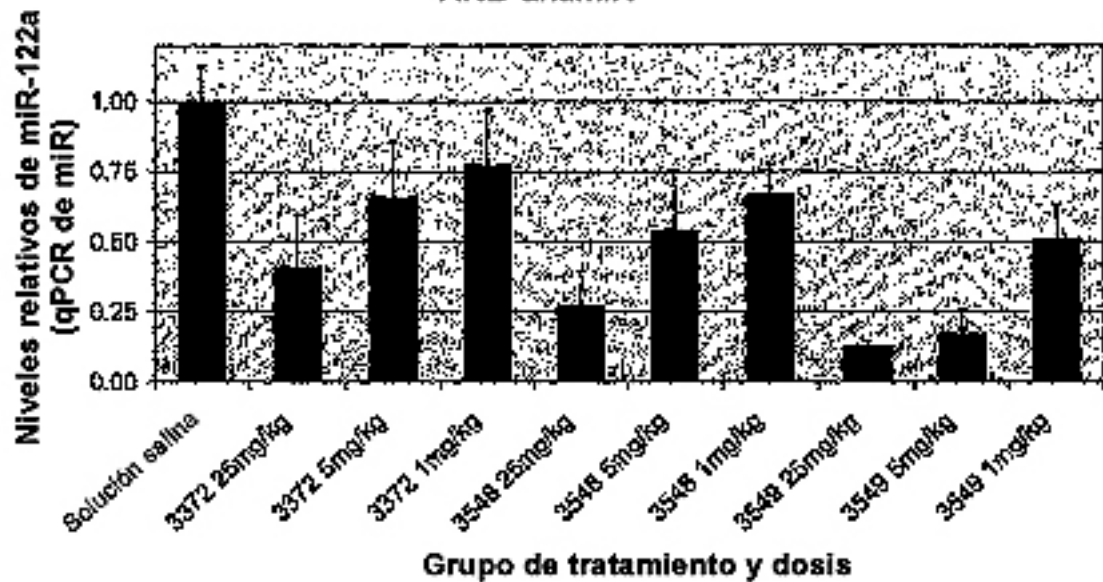


Figura 2

**Inhibición con ANB-antimiR de miR-122 in vivo, en hígado de ratón**  
(Tres dosis i.p. (Indicadas) en C57/BL6 cada dos días y sacrificio 48 h después de la última dosis, PD-06-042/-050, miR-06-014/-026, media y SD, n=8)

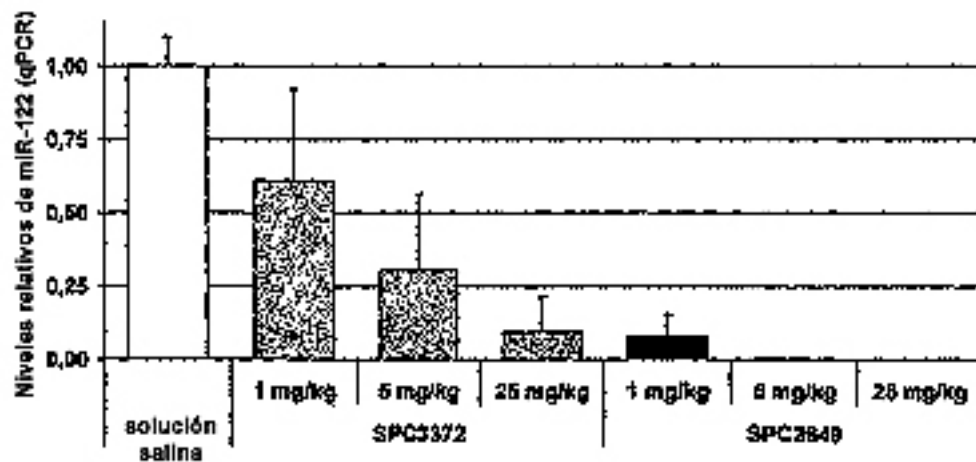


Figura 2b.

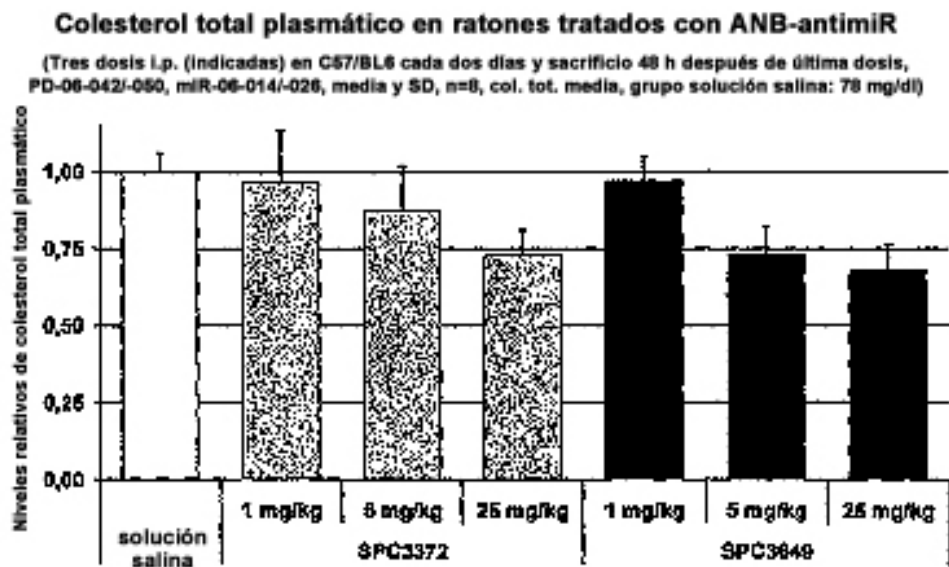
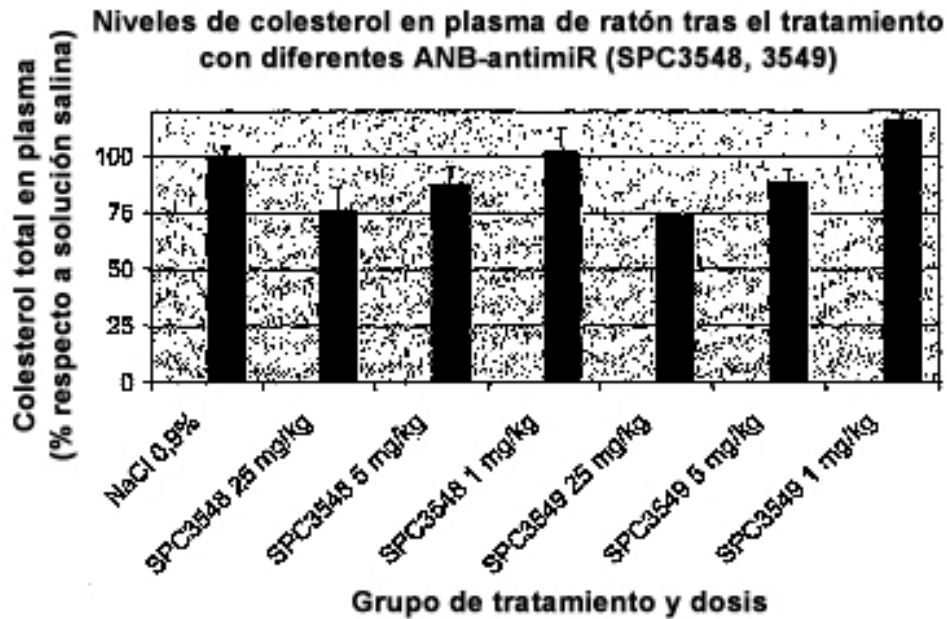
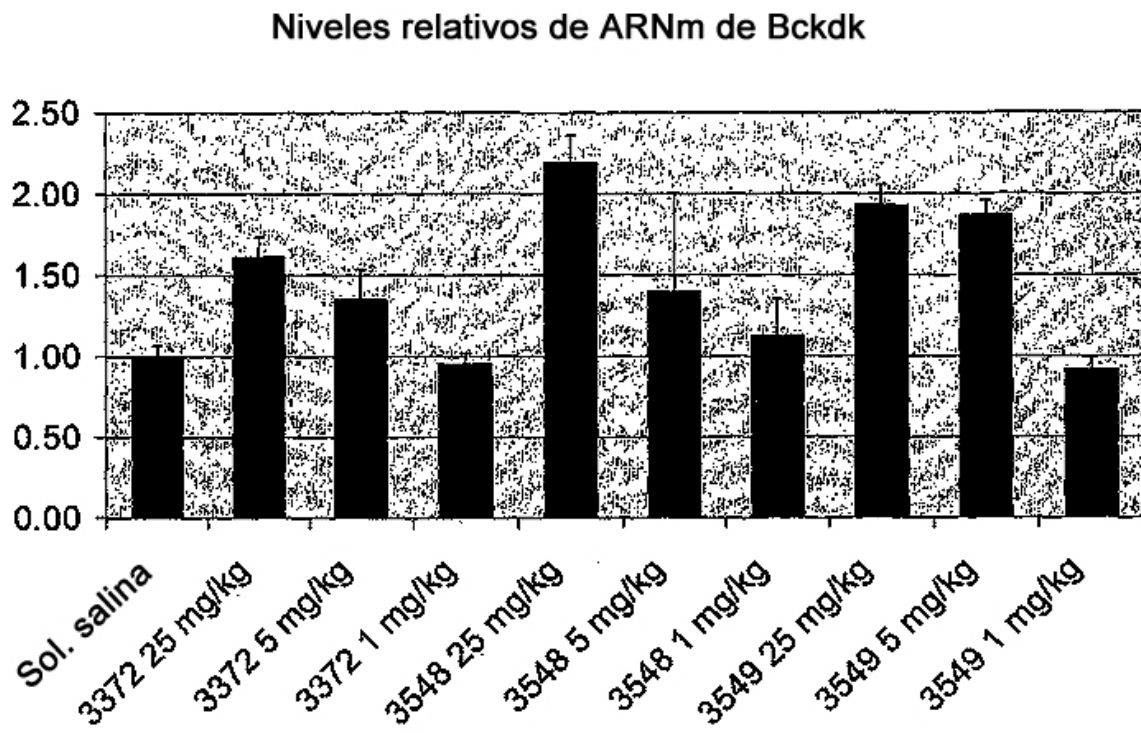


Figura 3 (A y B)



**Figura 4a**

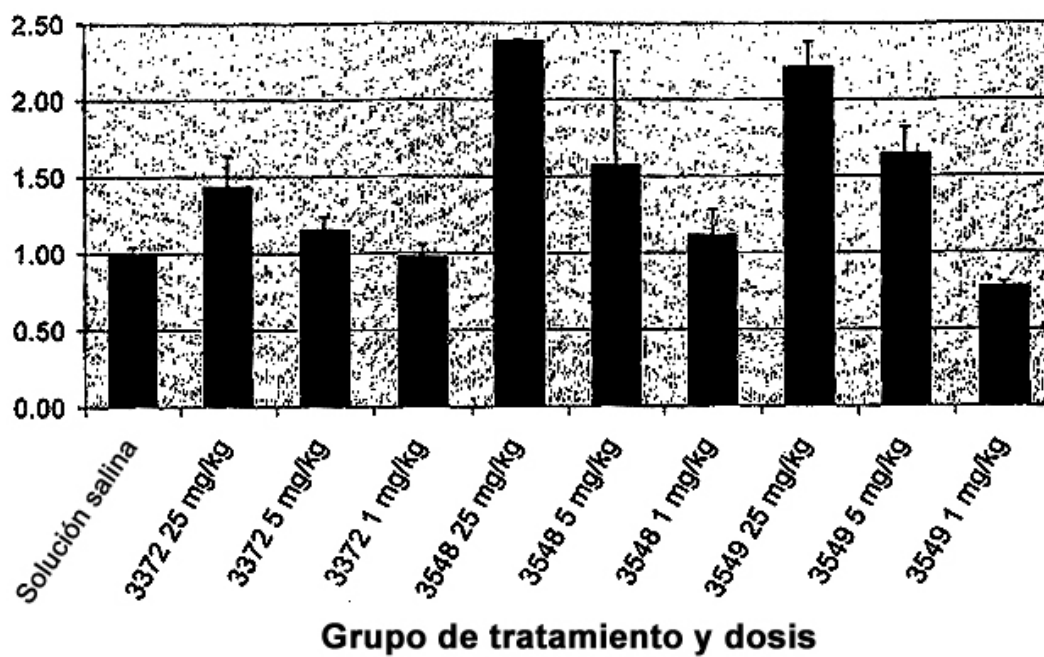


Figura 4b

# Niveles de ARNm de GAPDH

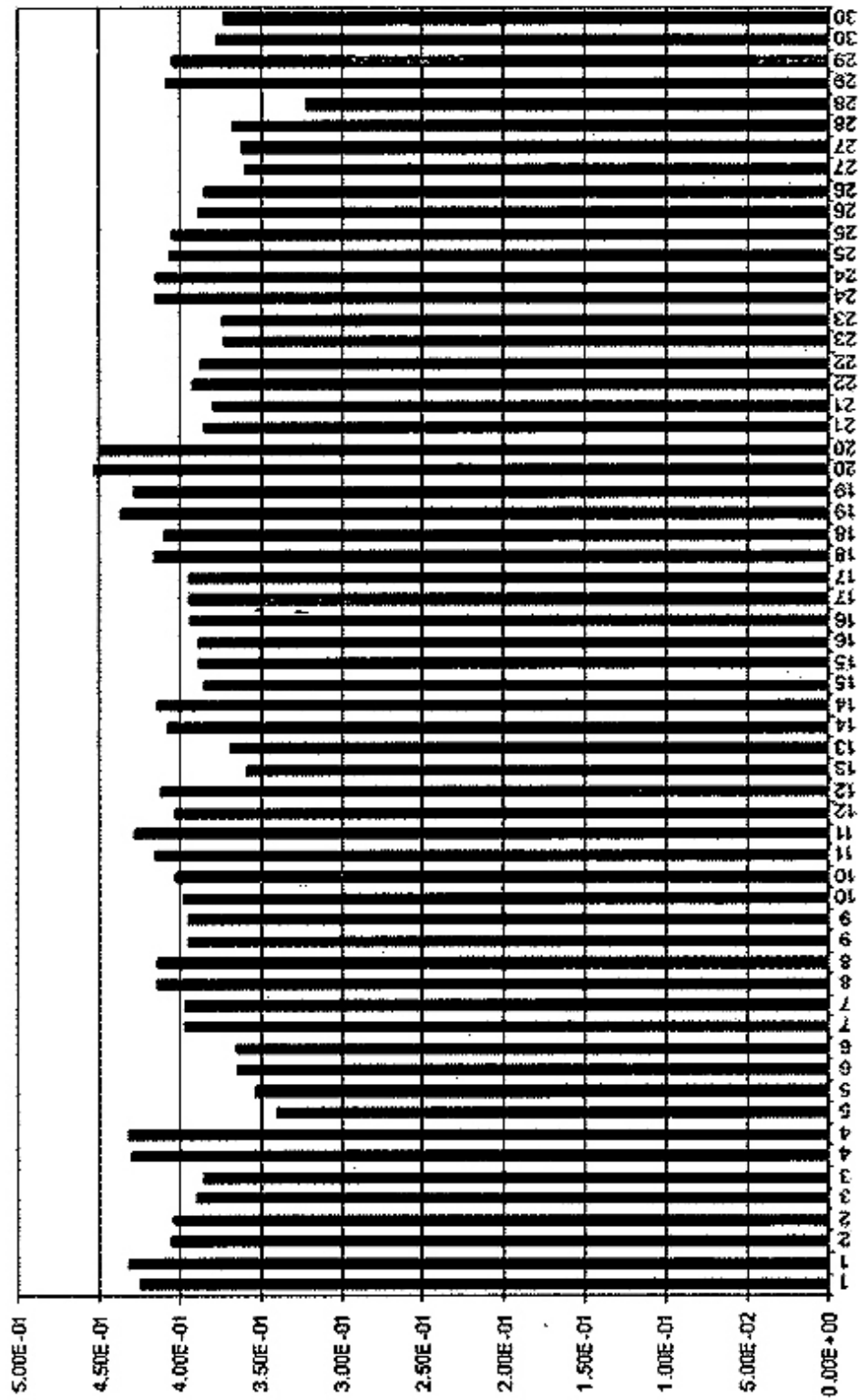


Figura 4c

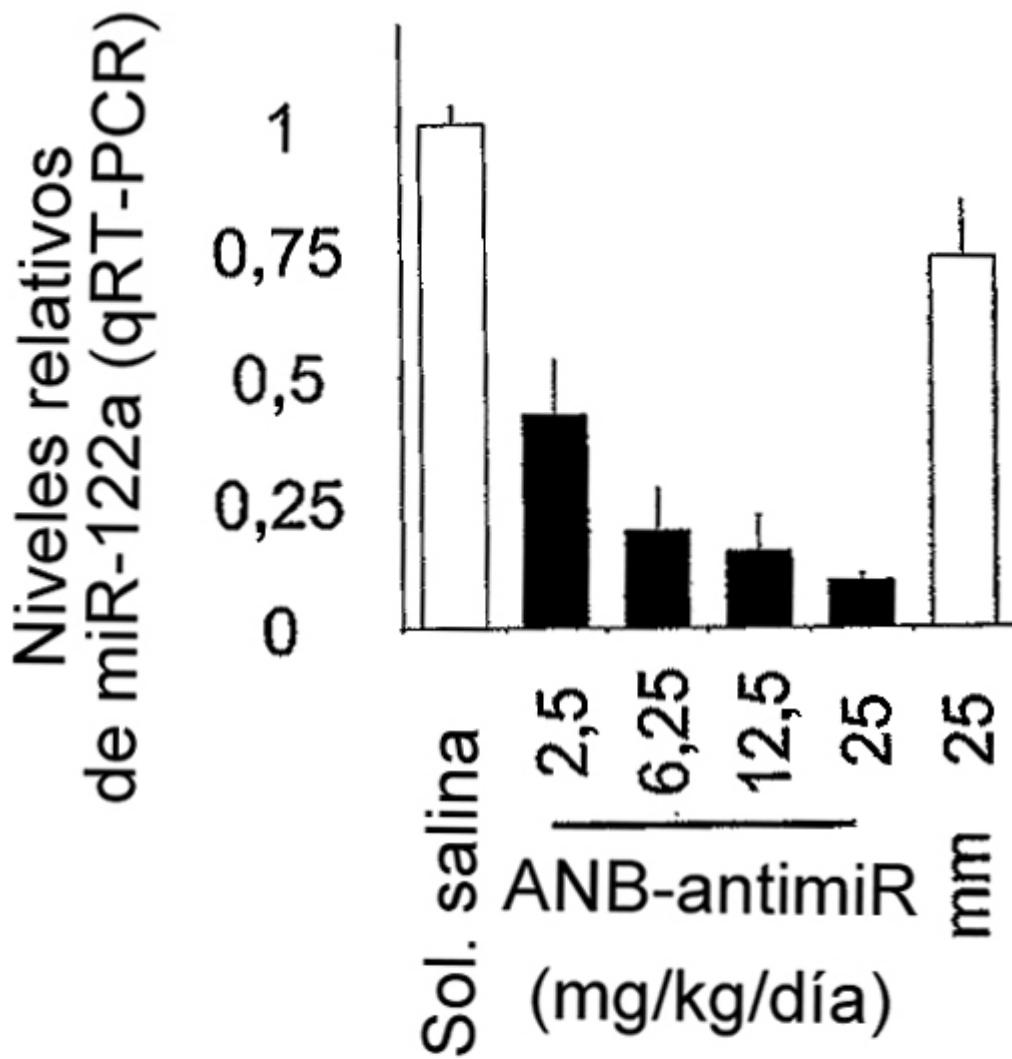


Figura 5

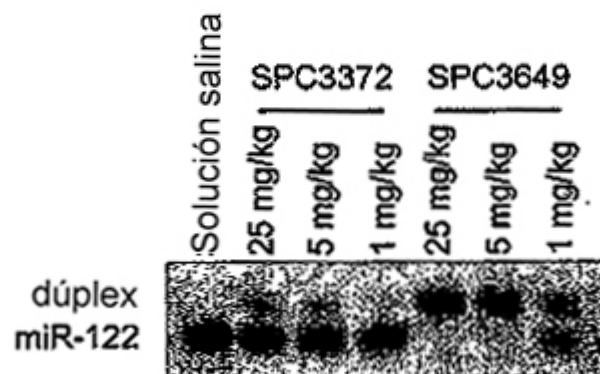
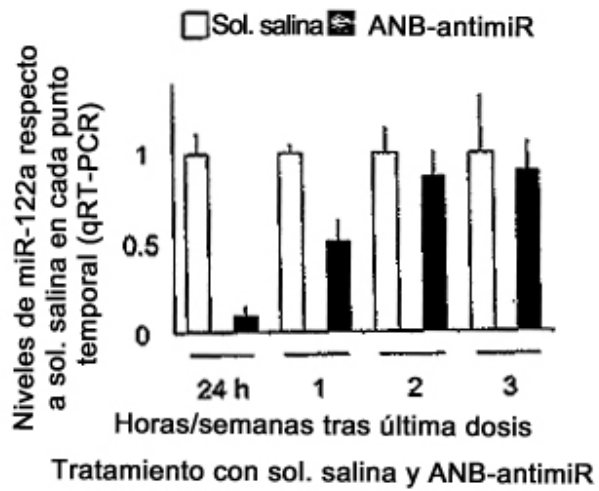
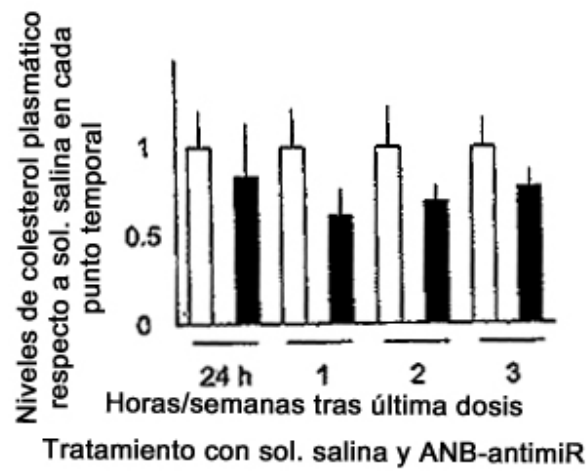


Figura 6



**Figura 7**



**Figura 8**

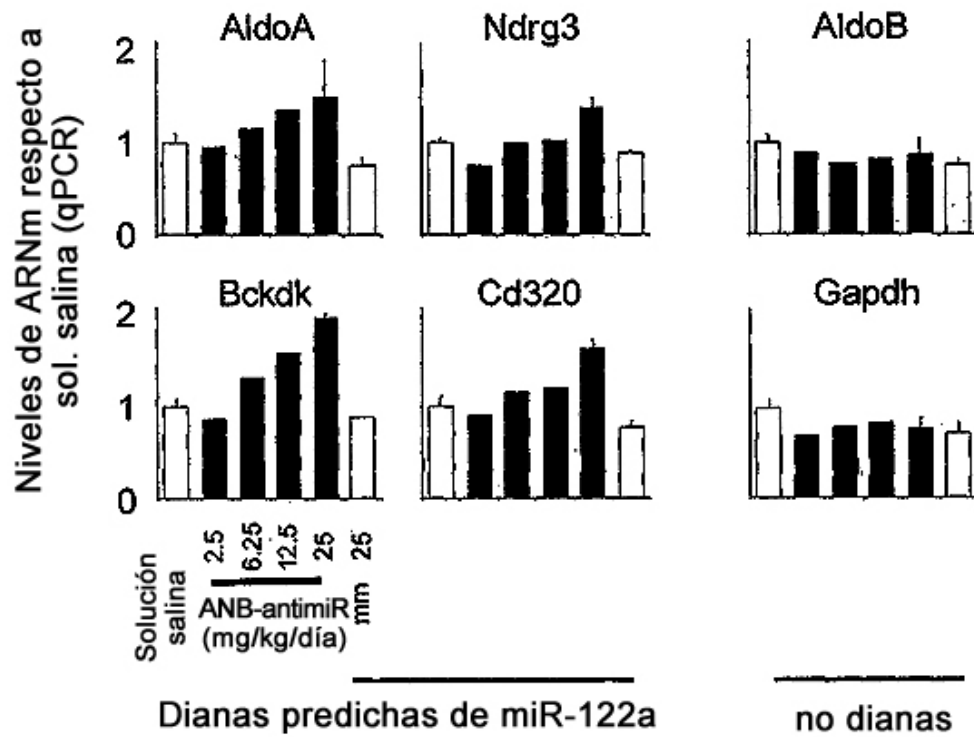


Figura 9

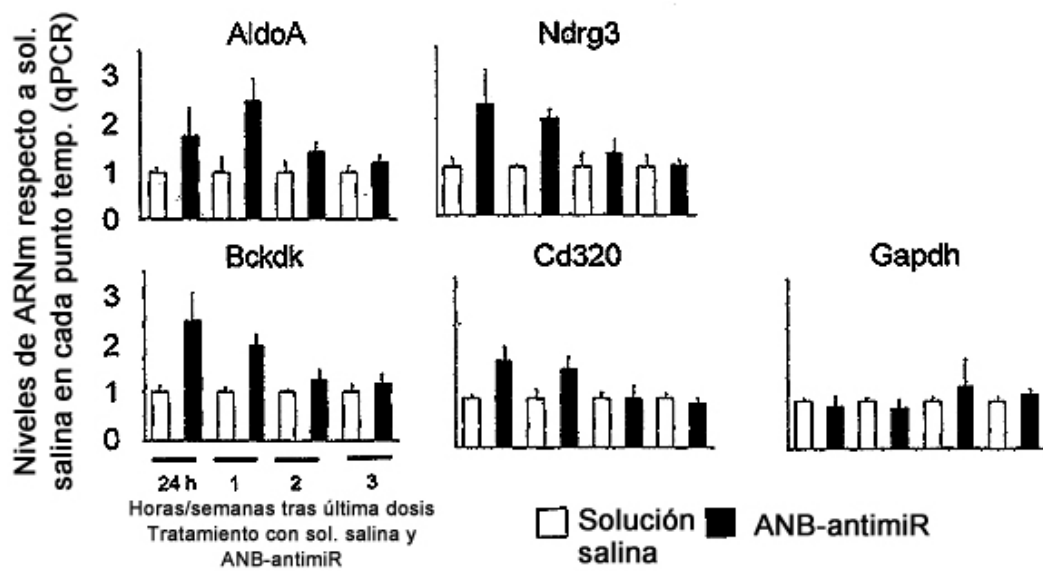
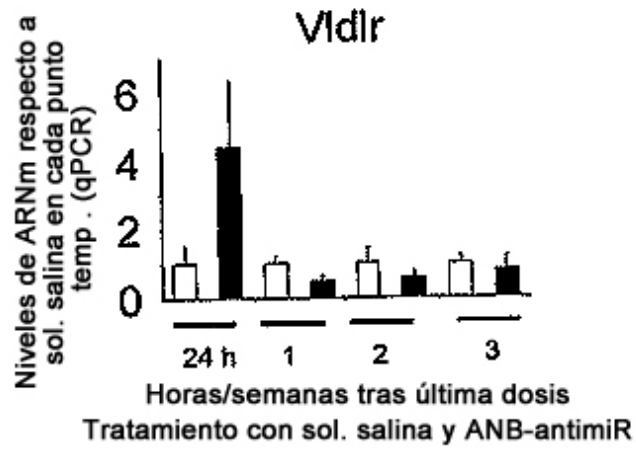
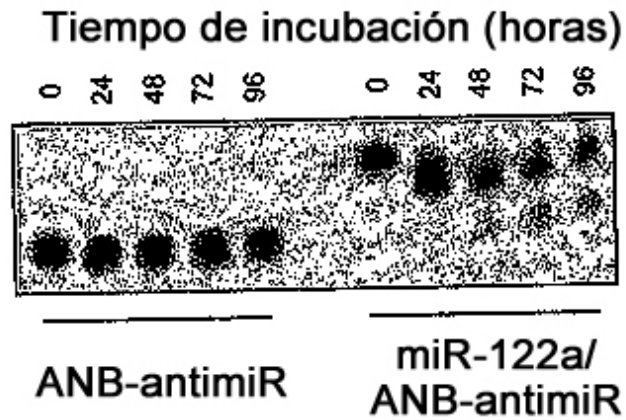


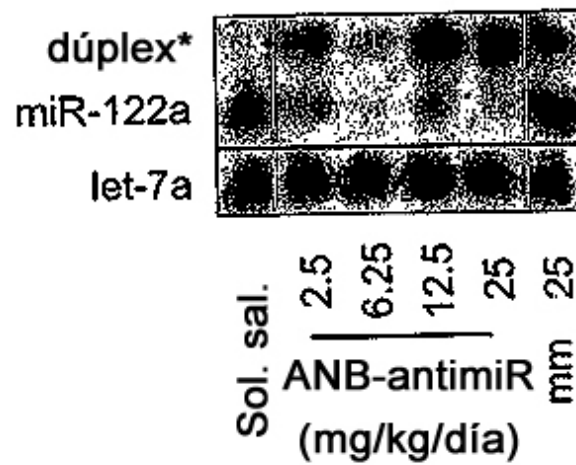
Figura 10



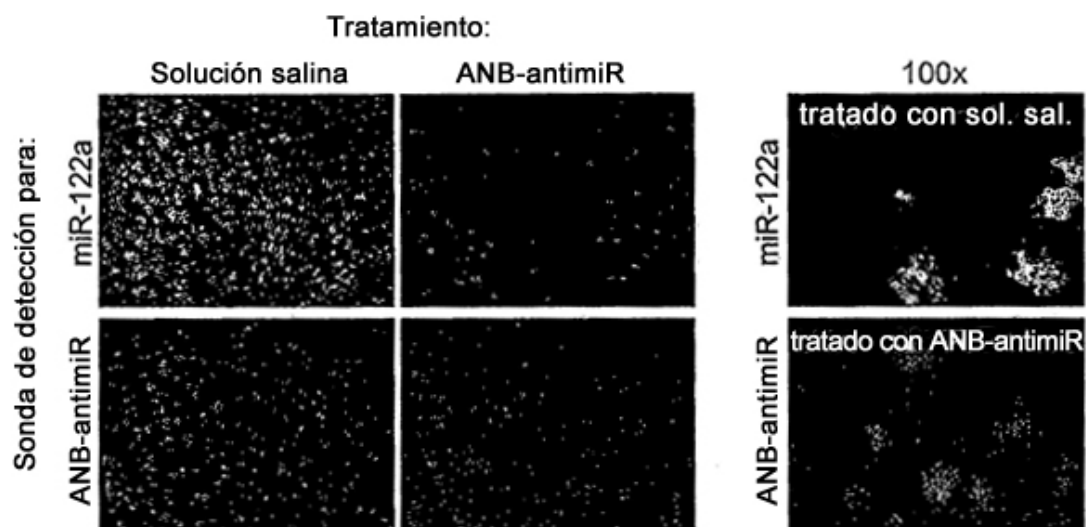
**Figura 11**



**Figura 12**



**Figura 13**



**Figura 14**

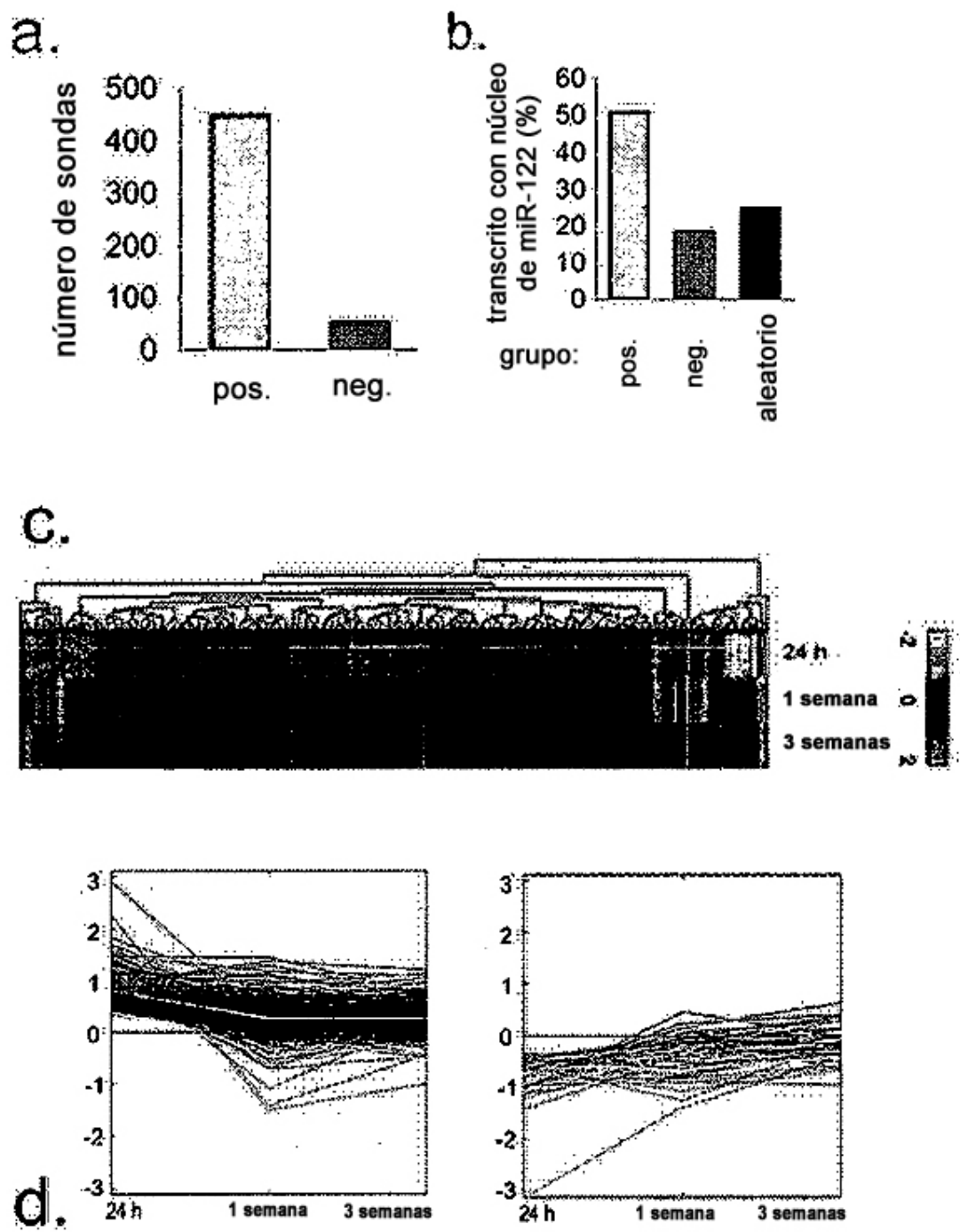
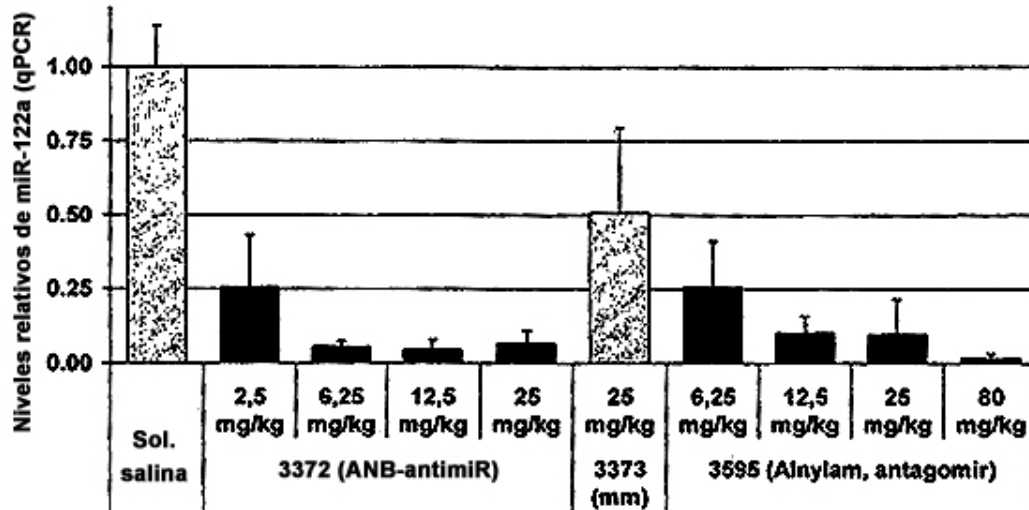


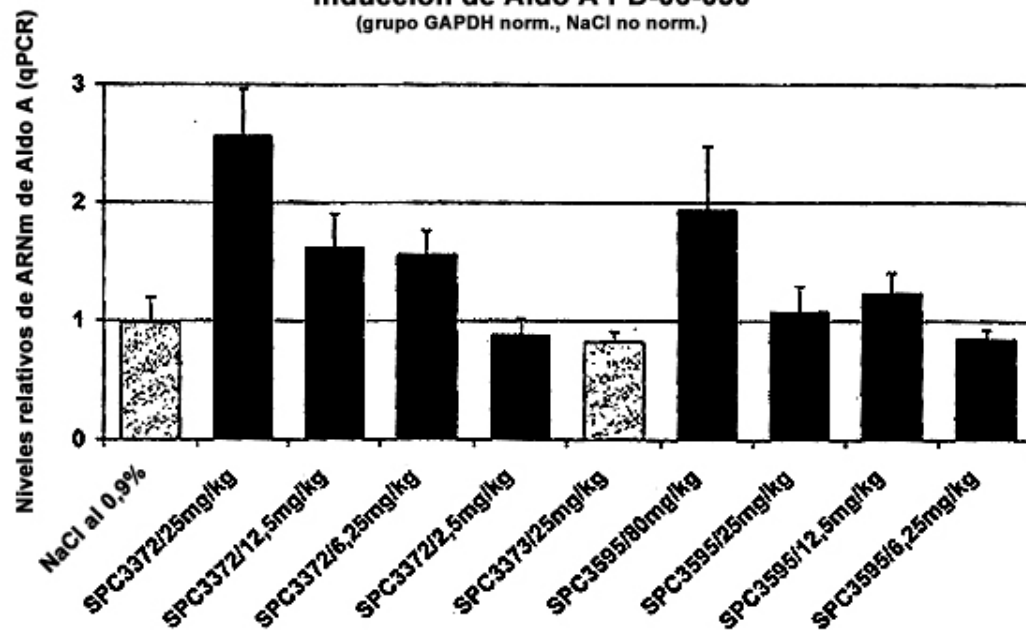
Figura 15

**Niveles de miR-122a en hígado de ratón (ANB-antimiR vs. antagomir)**



**Figura 16**

**Inducción de Aldo A PD-06-030**  
(grupo GAPDH norm., NaCl no norm.)



**Figura 17**

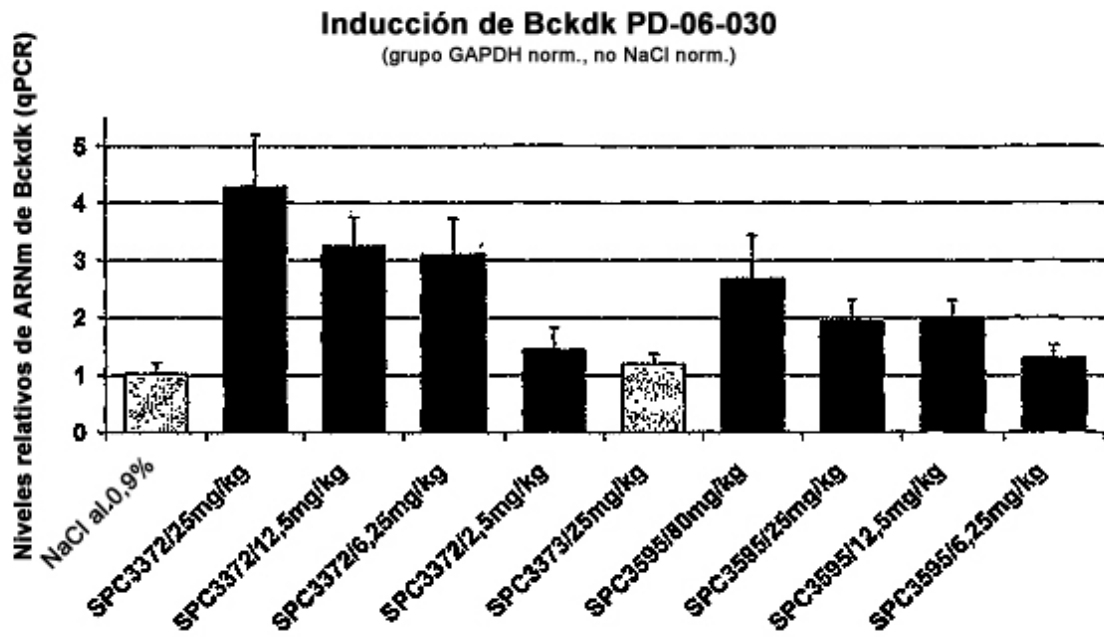


Figura 18

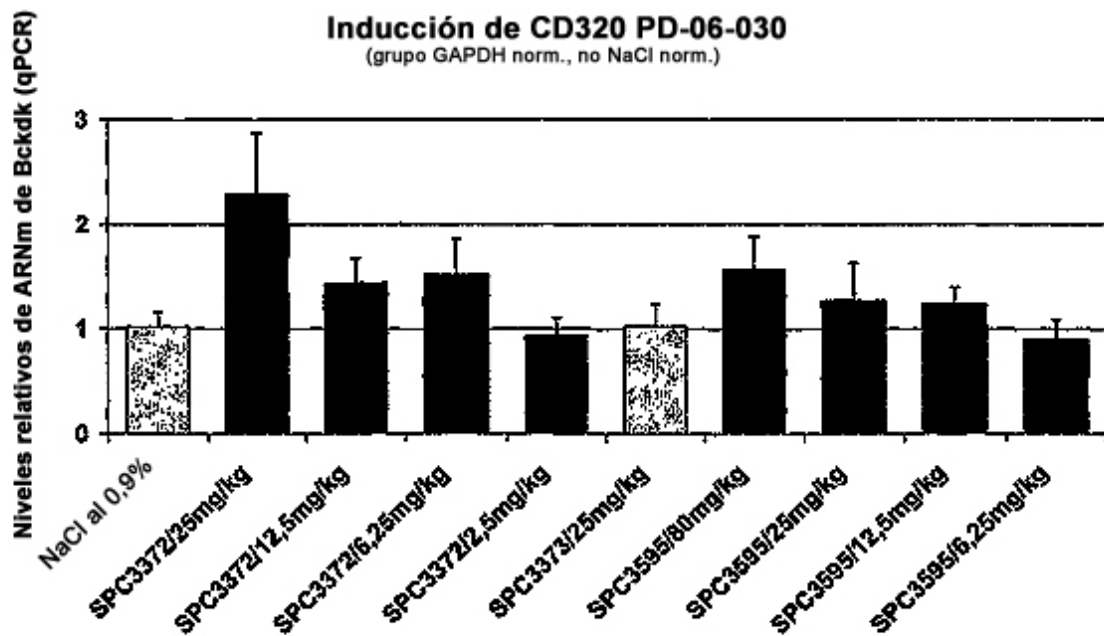


Figura 19

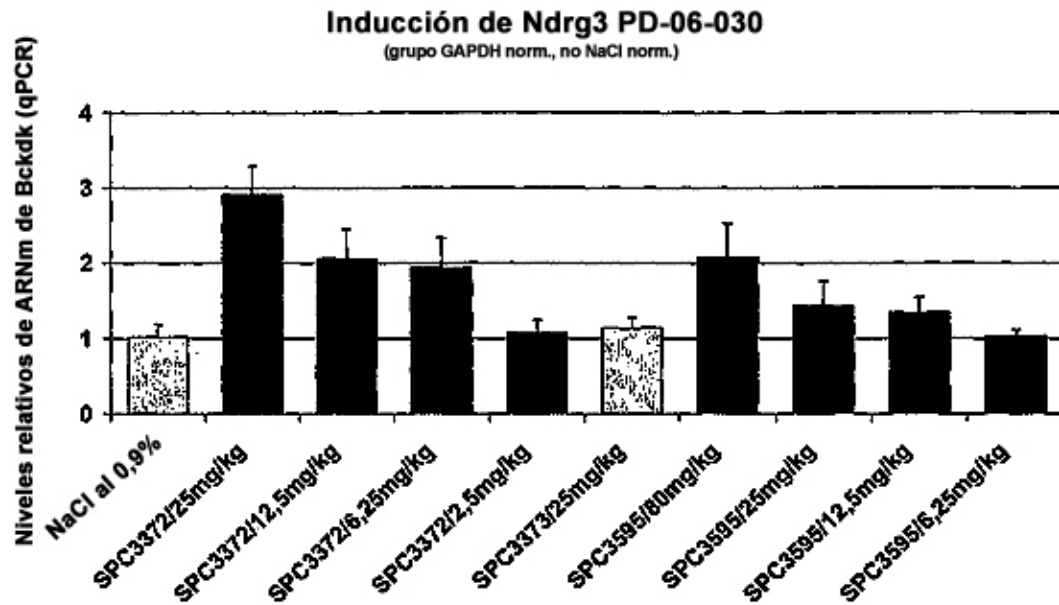


Figura 20

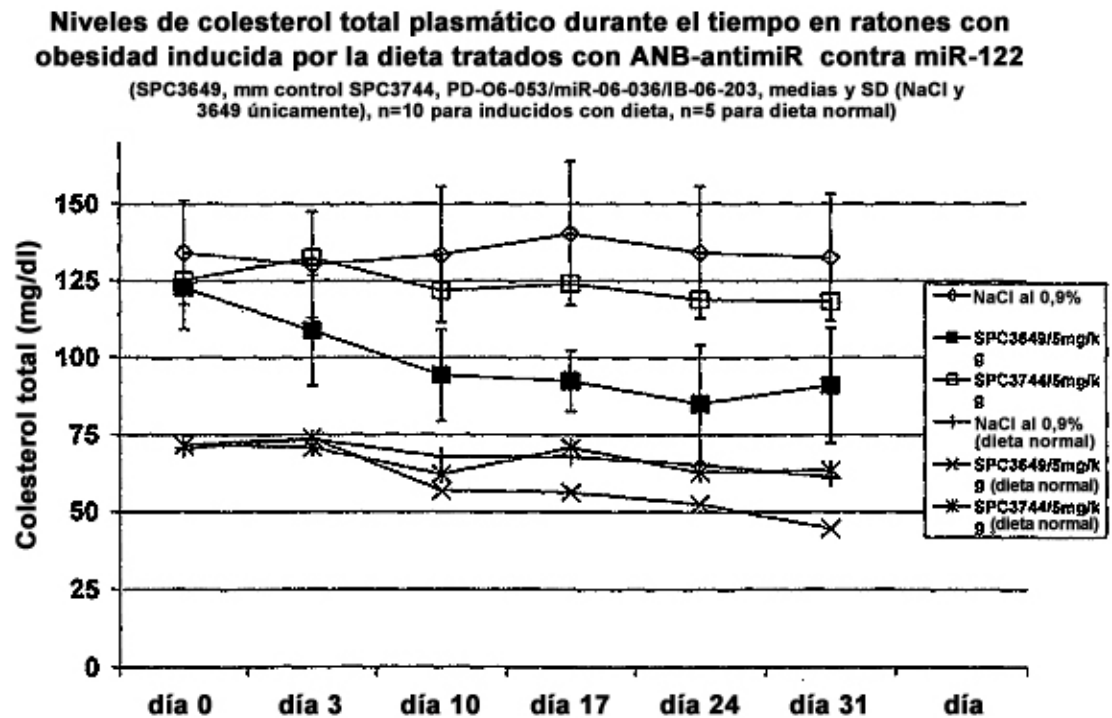


Figura 21

### Niveles de miR-122a en hígados de ratones con obesidad inducida por la dieta tras el tratamiento con ANB-antimiR

(SPC3649, mm control SPC3744, PD-06-053/miR-06-03618-06-203, media y SD, norml respecto a grupo de sol. salina, n=10 inducido por dieta, n=5 dieta norm.)

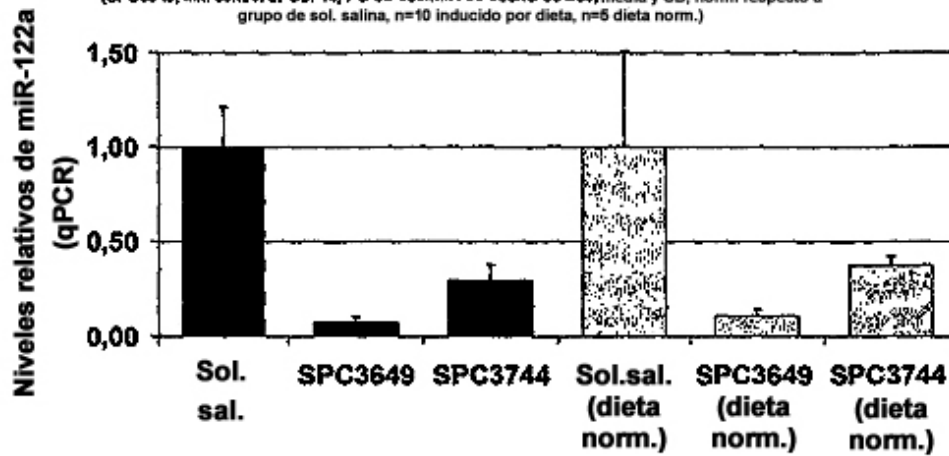


Figura 22

### Expresión de ARNm de aldolasa A en hígados de ratones con obesidad inducida por la dieta tras el tratamiento con ANB-antimiR

(SPC3649, mm control SPC3744, PD-06-053/miR-06-03618-06-203, media y SD, norm. respecto a grupo de sol. salina, n=10 inducción por dieta, n=5 dieta norm.)

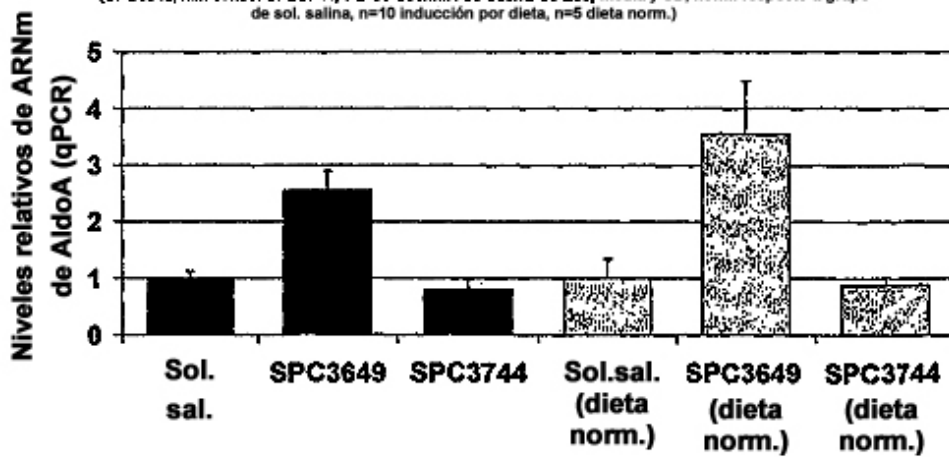


Figura 23

### Expresión de ARNm de Bckdk en hígados de ratones con obesidad inducida por la dieta tras el tratamiento con ANB-antimiR

(SPC3649, mini control SPC3744, PD-06-053/miR-06-038/08-203, media y SD, norm. respecto a grupo de sol. sal., n=10 inducido por dieta, n=5, dieta normal)

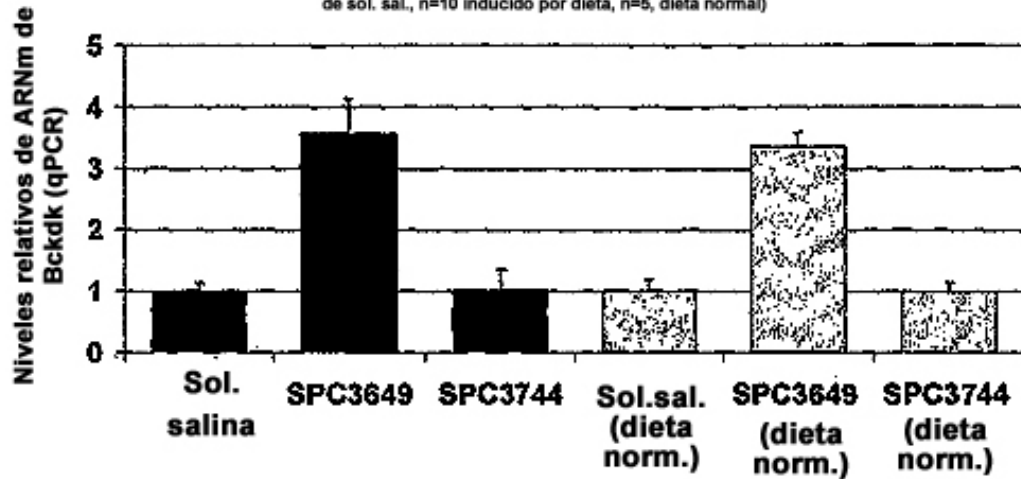


Figura 24

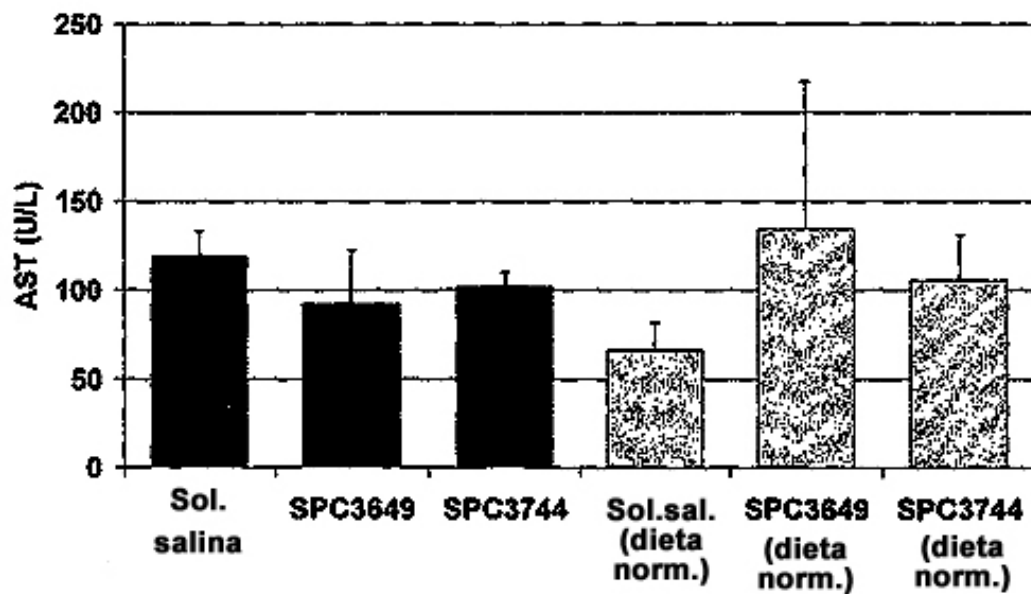


Figura 25

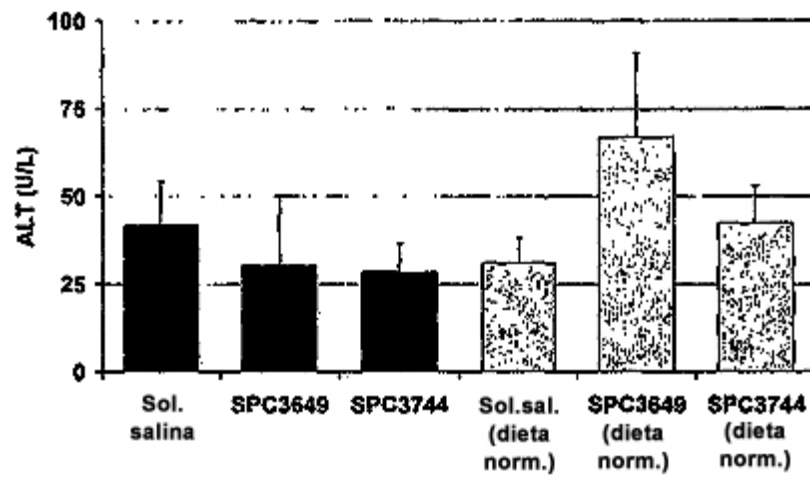


Figura 26

ANB-antimiR, 0,1 nM, células 518A2

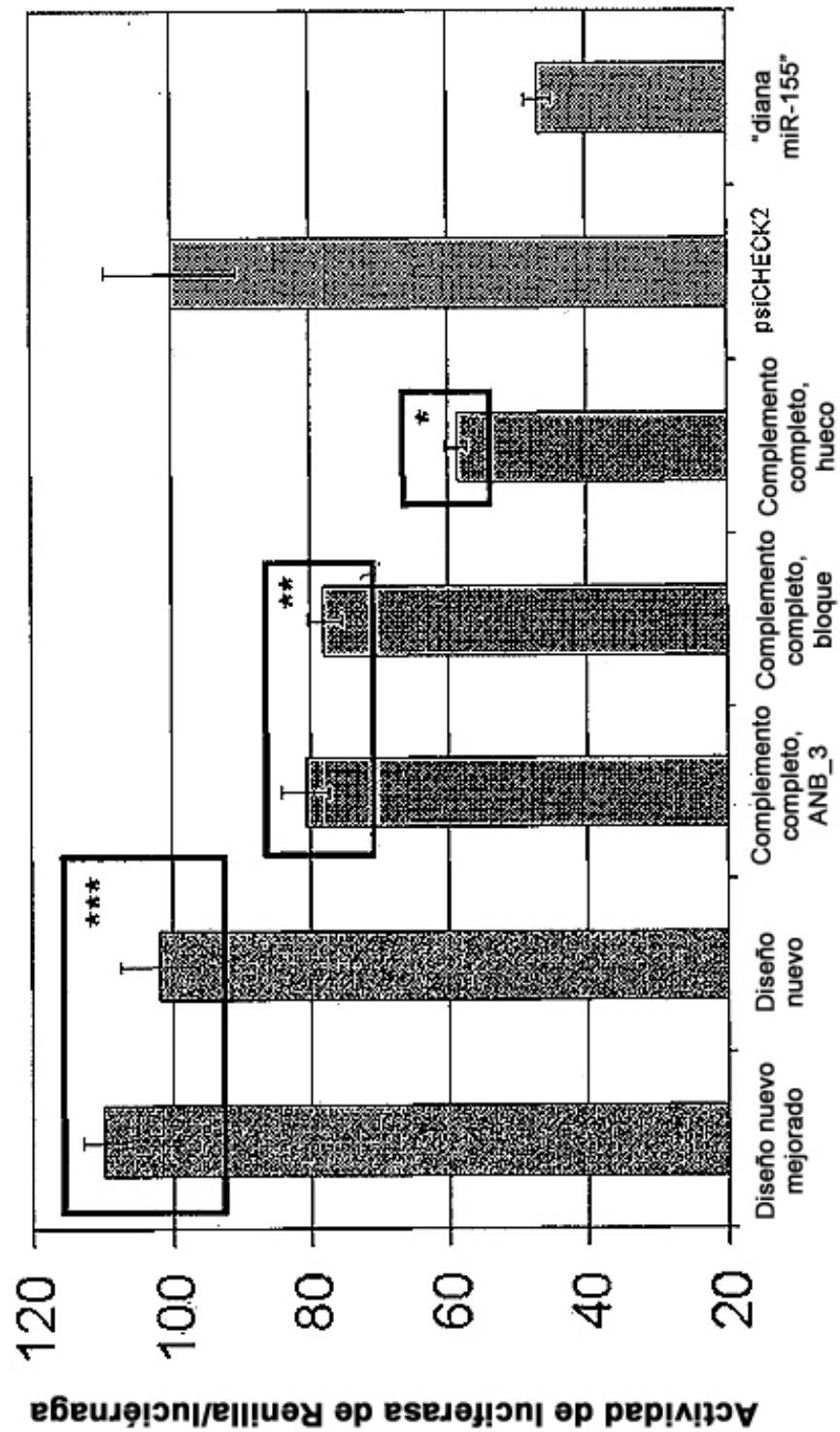


Figura 27

# ANB-antimiR 5 nM, HeLa

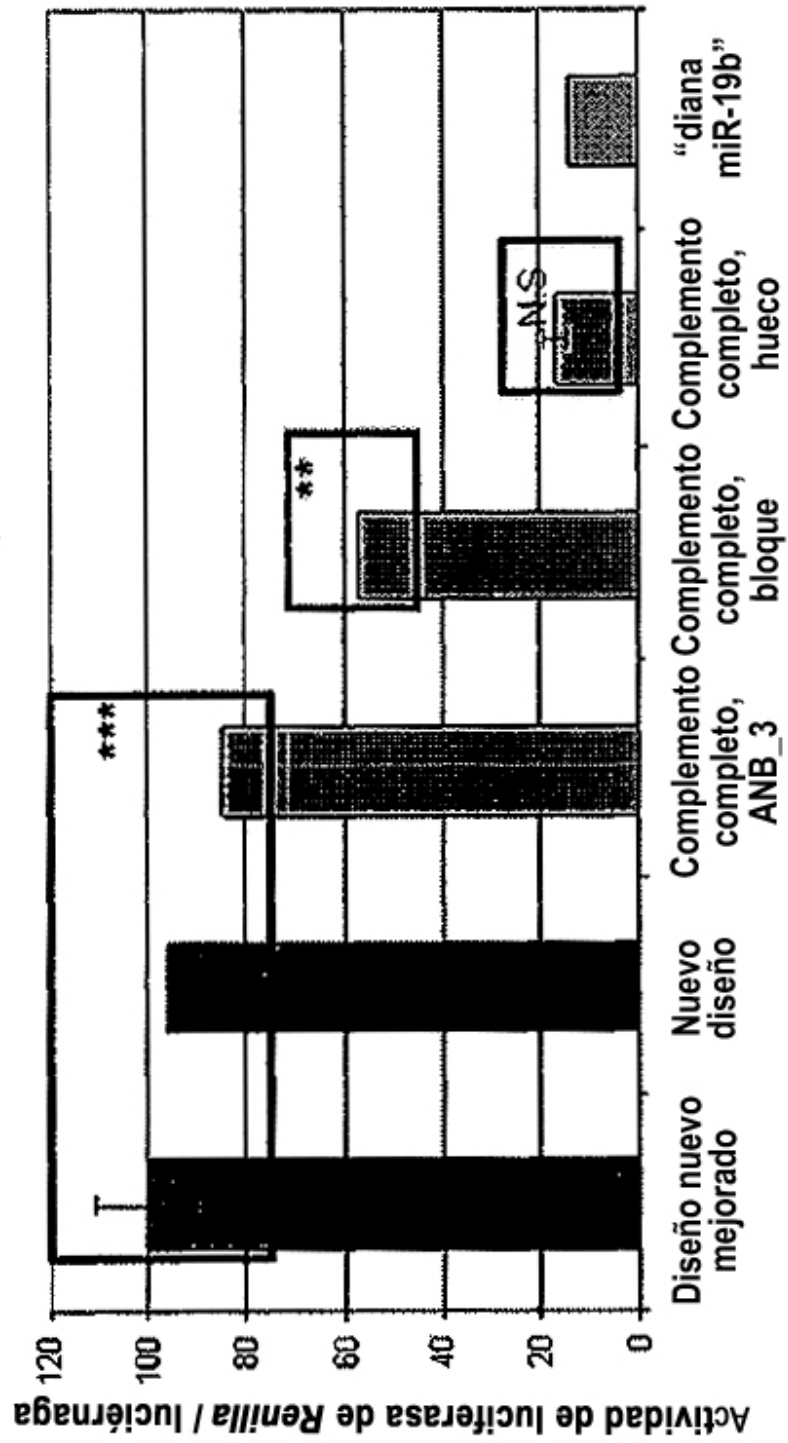


Figura 28

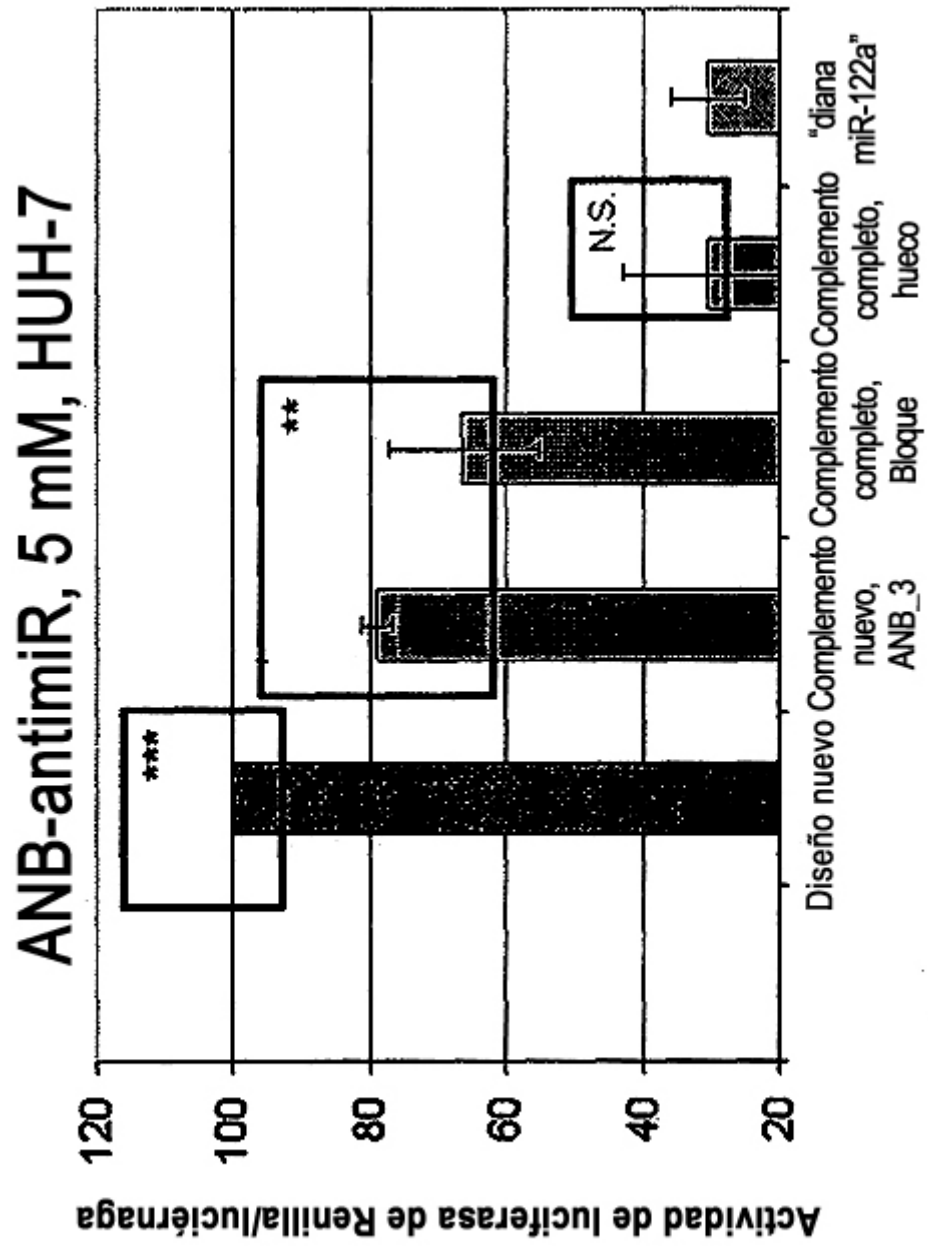
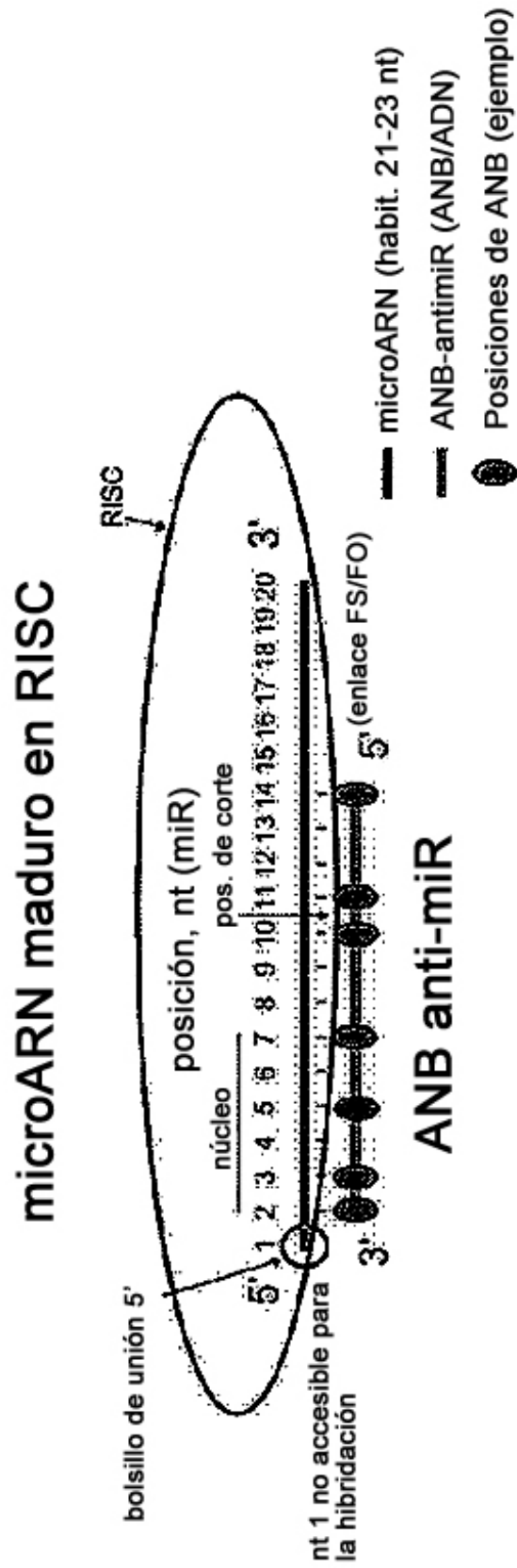


Figura 29



**Figura 30**