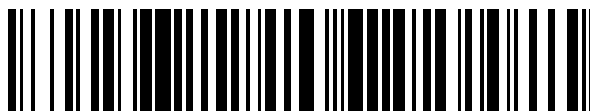


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 625**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2007 E 13172958 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2666859**

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

30 Prioridad:

03.04.2006 US 788995 P

03.04.2006 DK 200600478

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:

05.06.2019

73 Titular/es:

ROCHE INNOVATION CENTER COPENHAGEN

A/S (100.0%)

Fremtidsvej 3

2970 Hørsholm, DK

72 Inventor/es:

ELMÉN, JOACIM;

KAUPPINEN, SAKARI y

KEARNEY, PHIL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 715 625 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-miARN

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden oligonucleótidos monocatenarios que contienen LNA capaces de inhibir microARN inductores de enfermedades.

10 Antecedentes de la invención

MicroARN - Nuevos reguladores de la expresión génica

15 Los microARN (miARN) son una clase abundante de ARN endógenos cortos que actúan como reguladores postranscripcionales de la expresión génica mediante el emparejamiento por bases con sus ARNm diana. Los miARN maduros se procesan secuencialmente a partir de transcritos en horquilla más largos por las ribonucleasas RNAsa III, Drosha (Lee et al., 2003) y Dicer (Hutvagner et al. 2001, Ketting et al. 2001). Hasta la fecha, se han anotado más de 3400 miARN en vertebrados, invertebrados y plantas de acuerdo con la base de datos de microARN miRBase, compilación 7.1 en octubre de 2005 (Griffith-Jones 2004, Griffith-Jones et al., 2006) y también se han identificado 20 muchos miARN que corresponden a genes putativos.

La mayoría de miARN animales reconocen a sus sitios diana ubicados en las 3'-UTR mediante emparejamiento incompleto de bases, dando como resultado la represión transcripcional de los genes diana (Bartel 2004). Un número creciente de investigaciones demuestra que los miARN animales desempeñan papeles biológicos fundamentales en el crecimiento y la apoptosis celulares (Brennecke et al. 2003), la diferenciación del linaje hematopoyético (Chen et al. 2004), la regulación de la esperanza de vida (Boehm y Slack 2005), la diferenciación de fotorreceptores (Li y Carthew 2005), la regulación de genes de caja homeostática (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 vertebrados (Wienholds et al. 2005).

MicroARN en enfermedades humanas

35 Los miARN están implicados en una gran variedad de enfermedades en seres humanos. Una es la atrofia muscular espinal (AME), una enfermedad neurodegenerativa pediátrica provocada por niveles de proteínas reducidos o por mutaciones de pérdida de función del gen de supervivencia de las neuronas motoras (SMN) (Paushkin et al. 2002). Recientemente, se ha demostrado que una mutación en el sitio diana de miR-189 en el gen SLITRK1 humano está asociada con el síndrome de Tourette (Abelson et al. 2005), mientras que otro estudio reciente comunicó que el genoma de ARN del virus de la hepatitis C interacciona con un microARN de la célula hospedadora, el miR-122a 40 específico de hígado, para facilitar su replicación en el hospedador (Jopling et al. 2005). Otras enfermedades en las que están implicados los miARN, o su maquinaria de procesamiento, incluyen retraso mental por X frágil (FXMR) provocado por la ausencia de la proteína de retraso mental por X frágil (FMRP) (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 miARN alterados en muchos cánceres humanos. Por ejemplo, los genes de miARN miR15a y miR16-1 se eliminan o regulan negativamente en la mayoría de casos de leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (CLL), donde se ha demostrado recientemente que una firma única de 13 genes de miARN se asocia con su pronóstico y progreso (Calin et al. 2002, Calin et al. 2005). El papel de los miARN en el cáncer se ve respaldado además por el hecho de que más del 50 % de los genes de miARN humanos están ubicados en regiones genómicas asociadas con el cáncer o en sitios frágiles (Calin et al. 2004). Recientemente, un análisis sistemático de la expresión de una variedad de cánceres humanos reveló una regulación negativa general de los miARN en tumores, en comparación con los tejidos normales (Lu et al. 2005). De forma interesante, la clasificación de tumores poco diferenciados basándose en el miARN fue exitosa, mientras que los perfiles de ARNm fueron altamente imprecisos cuando se aplicaron a las mismas muestras. También se ha demostrado que los miARN están 55 desregulados en el cáncer de mama (Iorio et al. 2005), el cáncer de pulmón (Johnson et al. 2005) y el cáncer de colon (Michael et al. 2004), mientras que la agrupación de miR-17-92, que se encuentra amplificada en los linfomas de linfocitos B humanos y miR-155, que se encuentra regulado positivamente en el linfoma de Burkitt, se han anotado como los primeros oncogenes de miARN (Eis et al. 2005, He et al. 2005). Por lo tanto, los miARN humanos pueden no solo ser altamente útiles como biomarcadores para futuros diagnósticos del cáncer, sino que han surgido 60 rápidamente como dianas atractivas para la intervención en enfermedades mediante tecnologías de oligonucleótidos.

Inhibición de microARN usando oligonucleótidos monocatenarios

Se ha informado de varias estrategias con oligonucleótidos para la inhibición de los miARN. 65 El documento WO03/029459 (Tuschl) reivindica oligonucleótidos que codifican microARN y sus complementos de entre 18 - 25 nucleótidos de longitud que pueden comprender análogos de nucleótidos. Se ha sugerido el LNA como

un posible análogo de nucleótidos, aunque no se divulgan oligonucleótidos que contengan LNA. Tuschl reivindica que los oligonucleótidos de miARN pueden usarse en terapia.

5 El documento US2005/0182005 divulga un oligorribonucleótido de 2'OMe-ARN 24mero complementario a la forma más larga de miR 21 que se ha observado que reduce la represión inducida por miR 21, mientras que un oligonucleótido que contiene ADN equivalente no lo hizo. El término 2'OMe-ARN se refiere a un análogo de ARN donde hay una sustitución a metilo en la posición 2' (2'OMetilo).

10 El documento US2005/0227934 (Tuschl) se refiere a moléculas anti-miR con hasta un 50 % de restos de ADN. También comunica que se usaron anti-miR que contienen 2'OMe-ARN contra microARN pancreáticos, pero parece ser que no se divulgan estructuras re oligonucleótidos reales.

15 El documento US20050261218 (ISIS) reivindica un compuesto oligomérico que comprende una primera región y una segunda región, en donde al menos una región comprende una modificación y una parte del compuesto oligomérico está dirigida a un ácido nucleico diana de ARN no codificante pequeño, en donde el ácido nucleico diana del ARN no codificante pequeño es un miARN. Se reivindican compuestos oligoméricos de entre 17 y 25 nucleótidos de longitud. Los ejemplos se refieren completamente a compuestos de 2'OMe PS, 21meros y 20meros y oligonucleótidos de 2'OMe-gapmeros dirigidos contra una serie de dianas de pre-miARN y miARN maduras.

20 Boutla et al. 2003 (Nucleic Acids Research 31: 4973-4980) describen el uso de oligonucleótidos antisentido de ADN complementarios a 11 miARN diferentes en *Drosophila*, así como a su uso para inactivar miARN mediante la inyección de los oligonucleótidos de ADN en embriones de mosca. De los 11 oligonucleótidos de ADN antisentido, solo 4 construcciones mostraron una interferencia grave con el desarrollo normal, mientras que los 7 oligonucleótidos restantes no mostraron fenotipo alguno, posiblemente debido a su incapacidad para inhibir al miARN en cuestión.

25 Se ha comunicado una estrategia alternativa para esto por Hutvagner et al. (2004) y Leaman et al. (2005), en la que se pudieron usar oligonucleótidos antisentido de 2'-O-metilo complementarios al miARN maduro como inhibidores potentes e irreversibles de la función de ARN pequeño de interferencia (ARNpi) y de miARN *in vitro* e *in vivo* en *Drosophila* y *C. elegans*, induciendo de este modo un fenotipo de pérdida de función. Un inconveniente de este método es la necesidad de elevadas concentraciones de oligonucleótidos de 2'-O-metilo (100 micromolar) en los experimentos de transfección e inyección, que pueden ser tóxicos para el animal. Este método se aplicó recientemente a estudios en ratones, mediante la conjugación de oligonucleótidos antisentido de 2'-O-metilo complementarios a cuatro miARN diferentes con colesterol para silenciar los miARN *in vivo* (Krützfeldt et al. 2005). Se administraron los denominados antagomiR a ratones mediante inyecciones intravenosas. Aunque estos experimentos dieron como resultado un eficaz silenciamiento de los miARN endógenos *in vivo*, que se observó que era específica, eficaz y de larga duración, un inconveniente importante fue la necesidad de altas dosis (80 mg/kg) de antagomiR de 2'-O-Me para un silenciamiento eficaz.

40 La inhibición de microARN usando oligonucleótidos modificados con LNA se ha descrito anteriormente por Chan et al., Cancer Research 2005, 65 (14) 6029-6033, Lecellier et al. Science 2005, 308, 557-560, Naguibneva et al. Nature Cell Biology 2006 8 (3), 278-84 and Ørum et al. Gene 2006, (Disponibles en línea el 24 de febrero de 2006). En todos los casos, los oligonucleótidos anti-miR modificados con LNA fueron complementarios al microARN maduro completo, es decir, 20-23 nucleótidos de longitud, lo que dificulta una captación *in vivo* eficaz y una amplia distribución de las moléculas.

45 Naguibneva (Naguibneva et al. Nature Cell Biology 2006 8 describen el uso del oligonucleótido antisentido mixmero de ADN-LNA-ADN anti-miR para inhibir la función del microARN miR-181 *in vitro*, en el que se ubica un bloque de 8 nucleótidos de LNA en el centro de la molécula flanqueado por 6 nucleótidos de ADN en el extremo 5' y 9 nucleótidos de ADN en el extremo 3', respectivamente. Un inconveniente importante de este diseño antisentido es la baja estabilidad *in vivo* debido a la baja resistencia a las nucleasas de los extremos de ADN flanqueantes.

50 Aunque Chan et al. (Chan et al. Cancer Research 2005, 65 (14) 6029-6033) y Ørum et al. (Ørum et al. Gene 2006, (Disponibles en línea el 24 de febrero de 2006) no divulgan el diseño de las moléculas anti-miR modificadas con LNA usadas en su estudio, Lecellier et al. (Lecellier et al. Science 2005, 308, 557-560) describen el uso de un oligonucleótido antisentido gapmero de LNA-ADN-LNA anti-miR para inhibir la función de microARN, en el que se ubica un bloque de 4 nucleótidos de LNA 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. Un inconveniente importante de este diseño antisentido es la baja captación *in vivo*, así como una baja estabilidad *in vivo* debido a la serie de 13 nucleótidos de ADN en el oligonucleótido anti-miR.

60 El documento WO 2005/013901 divulga compuestos oligoméricos y composiciones para su uso en la modulación de ARN pequeños no codificantes. Elmen et al., póster en el 71st Symposium on Quantitative Biology - Regulatory RNAs, Cold Spring Harbor, NY., Estados Unidos, 31 de mayo - 5 de junio de 2006, se refiere a LNA-antimiR: Promising candidates for therapeutic intervention of disease-related microRNAs. Czech, New England Journal of Medicine 2006, vol 354, pp1194-1195 se refiere a microARN como dianas terapéuticas.

65 Por lo tanto, existe la necesidad en la especialidad de oligonucleótidos mejorados capaces de inhibir los microARN.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que el uso de oligonucleótidos diseñados para unirse con alta afinidad a dianas de miARN son altamente eficaces para aliviar la represión del ARNm por microARN *in vivo*.

Sin desear quedar ligados a cualquier teoría específica, las pruebas divulgadas en el presente documento indican que se logra un direccionamiento altamente eficaz a los microARN *in vivo* mediante el diseño de oligonucleótidos con el objetivo de formar un dúplex altamente estable con la diana de miARN *in vivo*. Esto se logra mediante el uso de análogos de nucleótidos de alta afinidad, tales como al menos una unidad de LNA y de manera adecuada, análogos de nucleótidos de alta afinidad adicionales, tales como análogos de nucleótidos de LNA, 2'-MOE ARN o 2'-Fluoro, en oligonucleótidos cortos, tal como de 10-17 o de 10 - 16 nucleobases. En un aspecto, el objetivo es generar un oligonucleótido de una longitud que es improbable que forme un complejo de ARNpi (es decir, un oligonucleótido corto) y con una carga suficiente de análogos de nucleótidos de alta afinidad, de tal forma que el oligonucleótido se une de manera prácticamente permanente a su diana de miARN, formando de manera eficaz un dúplex estable y no funcional con la diana de miARN. Los presentes inventores han descubierto que dichos diseños son considerablemente más eficaces que los oligonucleótidos de la técnica anterior, en particular, los diseños de gapmero y blockmero y oligonucleótidos que tienen una longitud larga, por ejemplo, 20 - 23meros. La expresión 2'flúor-ADN se refiere a un análogo de ADN donde hay una sustitución a flúor en la posición 2' (2'F).

En un primer aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido monocatenario, de 8-17 nucleótidos de longitud, capaz de reducir la cantidad eficaz de un microARN humano maduro en una célula, en donde al menos una de las unidades de nucleobases del oligonucleótido es una unidad de nucleótido de LNA y en donde todos los enlaces internucleósido son enlaces de fosforotioato, en donde el oligonucleótido es complementario a la secuencia de microARN humana madura, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende una región de secuencia de nucleobases contigua que es un 100 % complementaria a la región de semilla de microARN humana y en donde el oligonucleótido comprende al menos una unidad de nucleótido de LNA en una posición que se encuentra dentro de la región complementaria a la región de semilla de miARN, además en donde:

- (a) las unidades de nucleobases 1 a 6 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario, son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN; o
- (b) las unidades de nucleobases 1 a 7 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario, son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN; o
- (c) las unidades de nucleobases 2 a 7 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario, son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido monocatenario, de 8-17 nucleótidos de longitud, capaz de reducir la cantidad eficaz de un microARN humano maduro en una célula, en donde al menos una de las unidades de nucleobases del oligonucleótido es una unidad de nucleótido de LNA y en donde todos los enlaces internucleósido son enlaces de fosforotioato, en donde el oligonucleótido es complementario a la secuencia de microARN humana madura, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende una región de secuencia de nucleobases contigua que es un 100 % complementaria a la región de semilla de microARN humana y en donde el oligonucleótido comprende al menos una unidad de nucleótido de LNA en una posición que se encuentra dentro de la región complementaria a la región de semilla de miARN, en donde el oligonucleótido es para su uso como un medicamento, además en donde:

- (a) las unidades de nucleobases 1 a 6 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario, son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN; o
- (b) las unidades de nucleobases 1 a 7 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario, son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN; o
- (c) las unidades de nucleobases 2 a 7 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario, son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN.

En un tercer aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido monocatenario de la invención y un diluyente, transportador o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento se describe una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido monocatenario que tiene una longitud de entre 8 y 17, tal como de entre 10 y 17, tal como 8 - 16 o 10 - 16 unidades de nucleobase, un diluyente, transportador o adyuvante farmacéuticamente aceptable, en donde al menos una de las unidades de nucleobase del oligonucleótido monocatenario es un análogo de nucleótido de alta afinidad, tal como una unidad de nucleobase de ácido nucleico bloqueado (LNA) y en donde el oligonucleótido monocatenario es complementario a una secuencia de microARN humana.

Los análogos de nucleótidos de alta afinidad son análogos de nucleótidos que dan como resultado un oligonucleótido que tiene una estabilidad térmica de dúplex más elevada con un nucleótido de ARN complementario que la afinidad de unión de un nucleótido de ADN equivalente. Esto se determina normalmente midiendo la T_m .

5 Los presentes inventores no han identificado efectos fuera de la diana significativos cuando se usan estos oligonucleótidos cortos de alta afinidad dirigidos contra miARN específicos. De hecho, las pruebas proporcionadas en el presente documento indican que los efectos en la expresión de ARNm se deben a la presencia de una secuencia complementaria al miARN diana (dianas primarias del ARNm) dentro del ARNm o a efectos secundarios en los ARNm que se regulan por las dianas primarias de ARNm (dianas secundarias de ARNm). No se identificaron efectos de toxicidad, lo que indica la ausencia de efectos perjudiciales significativos fuera de la diana.

15 En el presente documento se describe una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido monocatenario que tiene una longitud de entre 8 y 17 unidades de nucleobase, tal como entre 10 y 17 unidades de nucleobase, tal como entre 10 y 16 unidades de nucleobase y un diluyente, transportador o adyuvante farmacéuticamente aceptable, en donde al menos una de las unidades de nucleobase del oligonucleótido monocatenario es una unidad de nucleobase de ácido nucleico bloqueado (LNA) y en donde el oligonucleótido monocatenario es complementario a una secuencia de microARN humana.

20 En el presente documento se describe el uso de un oligonucleótido de acuerdo con la invención, tales como aquellos que pueden formar parte de la composición farmacéutica, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno médico asociado con la presencia o sobreexpresión (regulación positiva) del microARN.

25 En el presente documento se describe un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno médico asociado con la presencia o la sobreexpresión del microARN, que comprende la etapa de administrar una composición (tal como la composición farmacéutica) de acuerdo con la invención a una persona que necesite tratamiento.

30 En el presente documento se describe un método para reducir la cantidad eficaz de un miARN en una célula o un organismo, que comprende administrar una composición (tal como la composición farmacéutica) de acuerdo con la invención o un oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención a la célula o el organismo. La reducción de la cantidad eficaz en este contexto se refiere a la reducción del miARN funcional presente en la célula u organismo. Se reconoce que los oligonucleótidos preferidos de acuerdo con la invención pueden no siempre reducir significativamente la cantidad real de miARN en la célula u organismo, ya que normalmente forman dúplex muy estables con sus dianas de miARN.

35 En el presente documento se describe un método para la desrepresión de un ARNm diana de un miARN en una célula o un organismo, que comprende administrar una composición (tal como la composición farmacéutica) o un oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención a la célula o el organismo.

40 En el presente documento se describe el uso de un oligonucleótido monocatenario de entre 8 - 16, tal como 10 - 16 nucleobases de longitud, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno médico asociado con la presencia o sobreexpresión del microARN.

45 En el presente documento se describe un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno médico asociado con la presencia o la sobreexpresión del microARN, que comprende la etapa de administrar una composición (tal como la composición farmacéutica) que comprende un oligonucleótido monocatenario de entre 8 - 16, tal como de entre 10 - 16 nucleobases de longitud a una persona que necesite tratamiento.

50 En el presente documento se describe un método para reducir la cantidad eficaz de un miARN diana (es decir, el miARN "disponible") en una célula o un organismo, que comprende administrar una composición (tal como la composición farmacéutica) que comprende un oligonucleótido monocatenario de entre 8 - 16, tal como entre 10 - 16 nucleobases a la célula o el organismo.

55 En el presente documento se describe un método para la desrepresión de un ARNm diana de un miARN en una célula o un organismo, que comprende un oligonucleótido monocatenario de entre 8

- 16 tal como de entre 10 - 16 nucleobases (o una composición que comprende dicho oligonucleótido) a la célula o el organismo.

60 En el presente documento se describe un método para la síntesis de un oligonucleótido monocatenario dirigido contra un microARN humano, tal como un oligonucleótido monocatenario descrito en el presente documento, comprendiendo dicho método las etapas de:

a. Opcionalmente, seleccionar una primera nucleobase, contando desde el extremo 3', que es un análogo de nucleótido, tal como una nucleobase de LNA.

65 b. Opcionalmente, seleccionar una segunda nucleobase, contando desde el extremo 3', que es un análogo de nucleótido, tal como una nucleobase de LNA.

c. Seleccionar una región del oligonucleótido monocatenario que corresponde a la región de semilla de miARN, en donde dicha región es como se define en el presente documento.

5 d. Opcionalmente, seleccionar una séptima y una octava nucleobase que es como se define en el presente documento.

e. Opcionalmente, seleccionar una región 5' del oligonucleótido monocatenario que es como se define en el presente documento.

10 f. Opcionalmente, seleccionar un terminal 5' del oligonucleótido monocatenario que es como se define en el presente documento.

15 En donde la síntesis se lleva a cabo mediante la síntesis secuencial de las regiones definidas en las etapas a - f, en donde dicha síntesis puede llevarse a cabo en la dirección 3'-5' (a a f) o 5' - 3' (f a a) y en donde dicho oligonucleótido monocatenario es complementario a una secuencia de la diana de miARN.

20 En una realización, el oligonucleótido de la invención se diseña para no ser reclutado por RISC o para mediar la escisión dirigida por RISC de la diana de miARN. Se ha considerado que mediante el uso 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 miARN, el oligonucleótido puede competir contra el ARNm diana en cuanto a la asociación con el complejo de RISC y de este modo, aliviar la represión por miARN de los ARNm dianas del miARN mediante la introducción de un oligonucleótido que compite como sustrato para el miARN.

25 Sin embargo, la presente invención pretende prevenir dicha escisión no deseable del ARNm diana o inhibición traduccional proporcionando oligonucleótidos capaces de unirse de manera complementaria y aparentemente en algunos casos irreversible al microARN maduro. Esto parece dar como resultado una forma de protección contra la degradación o la escisión (por ejemplo, mediante RISC o RNAsaH u otras endo o exonucleasas), que pueden no dar como resultado una reducción sustancial o incluso significativa del miARN (por ejemplo, detectado mediante transferencia de Northern usando sondas de LNA) dentro de una célula, pero asegura que la cantidad eficaz del miARN, medida mediante el análisis de desrepresión, se reduce de manera considerable. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona oligonucleótidos que están expresamente diseñados para que no sean compatibles con el complejo de RISC, pero para eliminar el miARN mediante la titulación por el oligonucleótido. Aunque no se desea quedar ligados a una teoría específica de por qué son tan eficaces los oligonucleótidos de la presente invención, en analogía con los oligonucleótidos basados en ARN (u oligonucleótidos completos de 2'OMe), parece ser que los oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención funcionan mediante la inhibición no competitiva de las funciones del miARN, ya que retiran de manera eficaz el miARN disponible del citoplasma, mientras que los oligonucleótidos de la técnica anterior proporcionan un sustrato alternativo para el miARN, que puede actuar como un inhibidor competidor, cuya eficacia podría depender en mayor medida en la concentración del oligonucleótido en el citoplasma, así como en la concentración del ARNm y el miARN diana.

45 Nuevamente, sin desear quedar ligados a cualquier teoría específica, una posibilidad adicional que puede existir con el uso de oligonucleótidos con una longitud aproximadamente similar a la de las dianas de miARN, es que los oligonucleótidos podrían formar un dúplex similar al ARNpi con la diana de miARN, una situación que podría reducir la eficacia del oligonucleótido. También es posible que los oligonucleótidos en sí puedan usarse como la hebra de guía dentro del complejo de RISC, generando de este modo la posibilidad de degradación dirigida por RISC de dianas no específicas que por casualidad tienen una complementariedad suficiente con el oligonucleótido guía.

50 Mediante la selección de oligonucleótidos cortos para dirigirse a secuencias de miARN, se evitan dichos problemas.

55 Se conocen en el campo de reactivos los oligonucleótidos cortos que incorporan LNA, tal como el LNA (véanse, por ejemplo, los documentos WO2005/098029 y WO 2006/069584). Sin embargo, las moléculas diseñadas para uso en diagnósticos o como reactivos son muy distintas en cuanto a su diseño respecto de aquellas para uso farmacéutico. Por ejemplo, las nucleobases terminales de los oligos reactivos normalmente no son LNA, sino ADN y los enlaces internucleósido son normalmente distintos de fosforotioato, el enlace preferido para su uso en los oligonucleótidos de la presente invención. Por lo tanto, la invención proporciona una nueva clase de oligonucleótido en sí misma.

60 La invención proporciona además un oligonucleótido (monocatenario) como se describe en el contexto de la composición farmacéutica de la invención, en donde dicho oligonucleótido comprende o bien

- i) al menos una unidad de LNA 3' terminal y/o
- ii) al menos una unidad de LNA 5' terminal.

65 El oligonucleótido está completamente fosforilado. Como se cita en el presente documento, otro aspecto preferido del oligonucleótido de acuerdo con la invención es que la segunda nucleobase 3' y/o la 9.^a y la 10.^a (desde el extremo 3'), también pueden ser LNA.

Los inventores han descubierto que son posibles otros métodos para evitar la escisión del ARN, tal como la degradación por exonucleasas en el suero sanguíneo o la escisión asociada con RISC del oligonucleótido de acuerdo con la invención y como tal, la invención también proporciona un oligonucleótido monocatenario que comprende:

- 5 a. una unidad de LNA en la posición 1 y 2 contando desde el extremo 3' y/o
- b. una unidad de LNA en la posición 9 y/o 10, también contando desde el extremo 3' y/o
- c. una o dos unidades de LNA 5'.

10 Aunque pueden observarse los beneficios de estos aspectos diferentes con oligonucleótidos más largos, tales como nucleótidos de hasta 26 unidades de nucleobases de longitud, se considera que estas características también pueden usarse con los oligonucleótidos más cortos citados en el presente documento, tales como los oligonucleótidos de entre 10 - 17 o 10 - 16 nucleobases descritos en el presente documento. Es altamente preferible que los oligonucleótidos comprendan análogos de nucleótidos de alta afinidad, tales como los citados en el presente documento, más preferentemente unidades de LNA.

15 Por lo tanto, los inventores han descubierto sorprendentemente que los oligonucleótidos monocatenarios cuidadosamente diseñados que comprenden unidades de ácido nucleico bloqueado (LNA) en un orden particular muestran un silenciamiento significativo de los microARN, dando como resultado niveles reducidos de microARN. Se descubrió que es importante una unión estrecha de dichos oligonucleótidos a la denominada secuencia de semilla, los nucleótidos 2 a 8 o 2 - 7, contando desde el extremo 5', de los microARN diana. El nucleótido 1 de los microARN diana es una base sin emparejamiento y muy probablemente está oculto en un bolsillo de unión en la proteína Ago 2. Sin desear quedar ligados a una teoría específica, los presentes inventores consideran que seleccionando las secuencias de la región de semilla, particularmente con oligonucleótidos que comprenden LNA, preferentemente unidades de LNA en la región que es complementaria a la región de semilla, el dúplex entre el miARN y el oligonucleótido es particularmente eficaz para dirigirse a miARN, evitando los efectos fuera de la diana y posiblemente proporcionando una característica adicional que previene la función del miARN dirigida por RISC.

20 Los inventores han descubierto sorprendentemente que el silenciamiento del microARN mejora aún más cuando los oligonucleótidos monocatenarios modificados con LNA no contienen un nucleótido en el extremo 3' correspondiente a este nucleótido 1 no emparejado. Además, se descubrió que dos unidades de LNA en el extremo 3' de los oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención hacen que dichos oligonucleótidos sean altamente resistentes a las nucleasas.

25 Además, se descubrió que los oligonucleótidos de la invención que tienen al menos un análogo de nucleótido, tal como un nucleótido de LNA en las posiciones correspondientes a las posiciones 10 y 11, contando desde el extremo 5', del microARN diana pueden prevenir la escisión de los oligonucleótidos de la invención.

30 Por consiguiente, en el presente documento se describe un oligonucleótido que tiene una longitud de 12 a 26 nucleótidos, en donde

- 40 i) el primer nucleótido, contando desde el extremo 3', es una unidad de ácido nucleico bloqueado (LNA);
- ii) el segundo nucleótido, contando desde el extremo 3', es una unidad de LNA; y
- iii) el nucleótido noveno y/o el décimo, contando desde el extremo 3', es una unidad de LNA.

45 La invención proporciona además los oligonucleótidos como se han definido en el presente documento para su uso como medicamento.

50 La invención se refiere además a composiciones que comprenden los oligonucleótidos definidos en el presente documento y un transportador farmacéuticamente aceptable.

55 Como se ha mencionado anteriormente, los microARN están relacionados con una serie de enfermedades. Por lo tanto, en el presente documento se describe el uso de un oligonucleótido como se ha definido en el presente documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión de microARN seleccionada entre el grupo que consiste en atrofia muscular espinal, síndrome de Tourette, virus de la hepatitis C, retraso mental por X frágil, síndrome de DiGeorge y cáncer, tal como leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer de colon, en particular, cáncer.

60 En el presente documento se describe un método para reducir los niveles de microARN diana poniendo en contacto el microARN con un oligonucleótido como se define en el presente documento, en donde el oligonucleótido

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

65 En el presente documento se describe un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleobases seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-534, las SEQ ID NO: 539-544, las SEQ ID NO: 549 - 554, las SEQ ID NO: 559-564, las SEQ ID NO: 569-574 y las SEQ ID NO: 594 - 598 y las SEQ ID NO: 579 - 584 o una composición

farmacéutica que comprende dicho oligonucleótido. El oligonucleótido tiene una secuencia de nucleobases de entre 8 - 17 nucleobases, tal como de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 nucleobases.

Breve descripción de los dibujos

5 Fig. 1. El efecto del tratamiento con diferentes oligonucleótidos de LNA anti-miR en la expresión de ácido nucleico diana en la línea celular Huh-7 que expresa miR-122a. Se muestran cantidades de miR-122a (unidades arbitrarias) procedentes de qRT-PCR específicas para miR-122a en comparación con células no tratadas (simulado). Los oligonucleótidos de LNA anti-miR se usaron a dos concentraciones, 1 y 100 nM, respectivamente. También se incluye un control de desemparejamiento (SPC3350) a SPC3349 (también citado en el presente documento como SPC3549).

10 Fig. 2. Evaluación de la respuesta a la dosis de atenuación génica de ALN anti-miR-122a para SPC3548 y SPC3549 en comparación con SPC3372 *in vivo* en hígados de ratones usando RT-PCR en tiempo real para miR-122a.

15 Fig. 2b. Niveles de miR-122 en el hígado de ratón después del tratamiento con diferentes LNA-antimiR. Se administraron las moléculas de LNA-antimiR SPC3372 y SPC3649 en un ratón normal mediante tres inyecciones i.p. cada dos días a lo largo de un periodo de seis días a las dosis indicadas y se les sacrificó 48 horas después de la última dosis. Se extrajo el ARN total de los hígados de los ratones y se midió miR-122 mediante qPCR específica para miR-122.

20 Fig. 3. Evaluación de los niveles plasmáticos de colesterol en ratones tratados con LNA-antimiR-122a en comparación con los ratones de control que recibieron suero salino.

25 Fig. 4a. Evaluación de los niveles relativos de ARNm de Bckdk en ratones tratados con LNA antimiR-122a en comparación con ratones tratados con control de suero salino usando RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

30 Fig. 4b. Evaluación de los niveles relativos de ARNm de aldolasa A en ratones tratados con LNA antimiR-122a en comparación con ratones tratados con control de suero salino usando RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

35 Fig. 4c. Evaluación de los niveles relativos de ARNm de GAPDH en ratones tratados con LNA antimiR-122a (animales 4-30) en comparación con ratones tratados con control de suero salino (animales 1-3) usando RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

40 Fig. 5. Evaluación de la respuesta a la dosis de atenuación génica de LNA-antimiR™ -122a *in vivo* en hígados de ratón usando RT-PCR en tiempo real para miR-122a. Se trató a seis grupos de animales (5 ratones por grupo) del siguiente modo. Se inyectaron a los animales del grupo 1 0,2 ml de suero salino por vía i.v. 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 desemparejado de LNA-antimiR™), todos del mismo modo. Se repitió el experimento (por lo que n = 10) y se muestran los resultados combinados.

45 Fig. 6. Transferencia de Northern que compara SPC3649 con SPC3372. Se sometió a ARN total de un ratón en cada grupo a transferencia de Northern específica para miR-122. Se indica miR-122 maduro y el dúplex (microARN bloqueado) formado entre el LNA-antimiR y miR-122.

50 Fig. 7. Se trató a ratones con 25 mg/kg/día de LNA-antimiR o suero salino durante tres días consecutivos y fueron sacrificados 1, 2 o 3 semanas después de la última dosis. También se incluyen los valores de los animales sacrificados 24 horas después de la última dosis ("diseño antiguo" del ejemplo 11). Se evaluaron los niveles de miR-122 mediante qPCR y se normalizaron a la media del grupo de suero salino en cada punto de tiempo individual. También se incluyen los valores de los animales sacrificados 24 horas después de la última dosis (se muestran la media y la DT, n=7, 24h n=10). El día de sacrificio 9, 16 o 23 corresponde a 1, 2 o 3 semanas después de la última dosis.

55 Fig. 8. Se trató a ratones con 25 mg/kg/día de LNA-antimiR o suero salino durante tres días consecutivos y fueron sacrificados 1, 2 o 3 semanas después de la última dosis. También se incluyen los valores de los animales sacrificados 24 horas después de la última dosis ("diseño antiguo" del ejemplo 11). Se midió el colesterol en plasma y se normalizó al grupo de salino en cada punto de tiempo (se muestra la media y DT, n=7, 24h n=10).

60 Fig. 9. Inducción de ARNm diana dependiente de miR-122a mediante la inhibición con SPC3372 de miR-122a. Se trató a los ratones con diferentes dosis de SPC3372 durante tres días consecutivos, como se ha descrito anteriormente y se les sacrificó 24 horas después de la última dosis. Se sometió al ARN total extraído del hígado a qPCR. Los genes con el sitio diana de miR-122 predicho y en los que se observó que estaban regulados positivamente mediante análisis de micromatrices se investigaron respecto de su inducción dependiente de la dosis mediante dosis crecientes de SPC3372 usando qPCR. Se sometió al ARN hepático total de 2 a 3 ratones por grupo sacrificados 24 horas después de la última dosis a qPCR para los genes indicados. En la figura 9 se

muestran los niveles de ARNm en relación con el grupo de suero salino, n=2-3 (2,5 - 12,5 mg/kg/día: n=2, sin DT). También se muestra el control de desemparejamiento (mm, SPC3373)

5 Fig. 10. Inducción transitoria de ARNm dianas de miR-122a después del tratamiento con SPC3372. Se trató a ratones NMRI hembra con 25 mg/kg/día de SPC3372 junto con control de salino durante tres días consecutivos y se les sacrificó 1, 2 o 3 semanas después de la última dosis, respectivamente. Se extrajo ARN de los hígados y los niveles de ARNm de los ARNm diana de miR-122a predichos, seleccionados mediante los datos de la micromatriz se investigaron mediante qPCR. Se analizó a tres animales de cada grupo.

10 Fig. 11. Inducción de Vldlr en el hígado mediante tratamiento con SPC3372. Se investigó la inducción de Vldlr en las mismas muestras de ARN de hígado del ejemplo anterior (Fig. 10).

15 Fig. 12. Estabilidad del dúplex de miR-122a/SPC3372 en plasma de ratón. Se comprobó la estabilidad de SPC3372 y del dúplex de SPC3372/miR-122a en plasma de ratón a 37 °C a lo largo de 96 horas. En la figura 12 se muestra un PAGE teñido con SYBR-Gold.

20 Fig. 13. El secuestro de miR-122a maduro mediante SPC3372 da lugar a la formación de dúplex. En la figura 13 se muestra una membrana sondada con una sonda específica para miR-122a (panel superior) y vuelta a sondear con una sonda específica para Let-7 (panel inferior). Con la sonda para miR-122, se pudieron detectar dos bandas, una correspondiente a miR-122 maduro y una correspondiente a un dúplex entre SPC3372 y miR-122.

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

25 Fig. 15. Expresión génica en hígado en ratones tratados con LNA-antimiR para miR-122. Se comparó a los ratones tratados con suero salino y con LNA-antimiR mediante elaboración del perfil de todo el genoma usando matrices Affymetrix Mouse Genome 430 2.0. (a,1) Se muestra el número de sondas que presentan la expresión diferencial en muestras de hígado de ratones tratados con LNA-antimiR-122 y con suero salino 24 horas después del tratamiento. (b,2) La aparición de la secuencia de siembra miR-122 en genes expresados de manera diferencial. La gráfica muestra el porcentaje de transcritos con al menos una secuencia de reconocimiento de semilla de miR-122 en su 3' UTR. Aleatorio: Se generaron secuencias aleatorias y se investigaron las secuencias de reconocimiento de la semilla de miR-122.

30 Perfiles de expresión génica temporal en hígado en ratones tratados con LNA-antimiR. Se trató a ratones con 25 mg/kg/día de LNA-antimiR o suero salino durante tres días consecutivos y fueron sacrificados 1, 2 o 3 semanas después de la última dosis. También se incluyen los valores de los animales sacrificados 24 horas después de la última dosis. (c,3) También se sometió a muestras de ARN de diferentes puntos de tiempo a elaboración de perfiles de expresión. Análisis agrupado jerárquico de los perfiles de expresión de genes identificados como expresados de manera diferencial entre ratones tratados con LNA-antimiR y suero salino 24 hora, una semana o tres semanas después del tratamiento. (d,4) Se efectuó un seguimiento con el paso del tiempo de los perfiles de expresión de genes identificados como expresados de manera diferencial entre ratones tratados con LNA-antimiR y suero salino 24 horas después del tratamiento. Las relaciones de expresión de los genes regulados positiva y negativamente en los ratones tratados con LNA-antimiR se aproximan a 1 a lo largo del tiempo, lo que indica un efecto reversible del tratamiento con LNA-antimiR.

45 Fig. 16. El efecto del tratamiento con SPC3372 y 3595 en los niveles de miR-122 en hígados de ratones.

Fig. 17. El efecto del tratamiento con SPC3372 y 3595 en los niveles de aldolasa A en hígados de ratones.

50 Fig. 18. El efecto del tratamiento con SPC3372 y 3595 en los niveles de Bckdk en hígados de ratones.

Fig. 19. El efecto del tratamiento con SPC3372 y 3595 en los niveles de CD320 en hígados de ratones.

Fig. 20. El efecto del tratamiento con SPC3372 y 3595 en los niveles de Ndr3 en hígados de ratones.

55 Fig. 21. El efecto del tratamiento a largo plazo con SPC3649 en el colesterol total en plasma en ratones con hipercolesterolemia y normales. Se obtuvieron semanalmente muestras de plasma sanguíneo de los ratones tratados con SPC3649 y de control de salino una vez a la semana, seguido de la evaluación del colesterol total en plasma. Se trató a los ratones con 5 mg/kg de SPC3649, SPC3744 o suero salino dos veces a la semana. Se trató en paralelo a ratones normales.

60 Fig. 22. El efecto del tratamiento a largo plazo con SPC3649 en los niveles de mir-122 en ratones con hipercolesterolemia y normales.

Fig. 23. El efecto del tratamiento a largo plazo con SPC3649 en los niveles de aldolasa A en ratones con hipercolesterolemia y normales.

65

Fig. 24. El efecto del tratamiento a largo plazo con SPC3649 en los niveles de Bckdk en ratones con hipercolesterolemia y normales.

5 Fig. 25. El efecto del tratamiento a largo plazo con SPC3649 en los niveles de AST en ratones con hipercolesterolemia y normales.

Fig. 26. El efecto del tratamiento a largo plazo con SPC3649 en los niveles de ALT en ratones con hipercolesterolemia y normales.

10 Fig. 27. Desrepresión funcional de la luciferasa de luciérnaga con la diana de miR-155 mediante oligonucleótidos que bloquean a miR-155 en una línea celular que expresa miR-155 de manera endógena, 518A2. "psiCheck2" es el plásmido sin la diana de miR-155, es decir, expresión completa y "diana de miR-155" es el plásmido correspondiente con la diana de miR-155 pero no cotransfectado con oligo que bloquea a miR-155 y por lo tanto, representa la expresión de luciferasa de luciérnaga completamente reprimida por miR-155.

15 Fig. 28. Desrepresión funcional de la luciferasa de luciérnaga con la diana de miR-19b mediante oligonucleótidos que bloquean a miR-19b en una línea celular que expresa miR-19b de manera endógena, HeLa. "diana de miR-19b" es el plásmido con la diana de miR-19b pero no cotransfectado con oligo que bloquea a miR-19b y por lo tanto, representa la expresión de luciferasa de luciérnaga completamente reprimida por miR-19b.

20 Fig. 29. Desrepresión funcional de la luciferasa de luciérnaga con la diana de miR-122 mediante oligonucleótidos que bloquean a miR-122 en una línea celular que expresa miR-122 de manera endógena, Huh-7. "diana de miR-122" es el plásmido correspondiente con la diana de miR-122 pero no cotransfectado con oligo que bloquea a miR-122 y por lo tanto, representa la expresión de luciferasa de luciérnaga completamente reprimida por miR-122.

25 Fig. 30. Diagrama que ilustra el alineamiento de un oligonucleótido de acuerdo con la invención y una diana de microARN.

30 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona composiciones farmacéuticas de acuerdo con las reivindicaciones que comprenden oligonucleótidos monocatenarios cortos, con una longitud de entre 8 y 17, tal como de entre 10 y 17 nucleobases que son complementarios a microARN humanos. Los oligonucleótidos cortos son particularmente eficaces para aliviar la represión del miARN *in vivo*. Se ha descubierto que la incorporación de análogos de nucleótidos de alta afinidad en los oligonucleótidos da como resultado moléculas anti-microARN altamente eficaces que parecen funcionar mediante la formación de dúplex prácticamente irreversibles con la diana de miARN, en lugar de mecanismos basados en la escisión del ARN, tales como los mecanismos asociados con RNasaH o RISC.

El oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención comprende una región de secuencia de nucleobases contigua que es 100 % complementaria a la región de semilla de microARN.

El oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención es complementario a la secuencia de microARN humana madura.

45 En una realización, el oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención es complementario a una secuencia de microARN, tal como una secuencia de microARN seleccionada entre el grupo que consiste en: hsa-let-7a, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7d, hsa-let-7e, hsa-let-7f, hsa-miR-15a, hsa-miR-16, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-17-3p, hsa-miR-18a, hsa-miR-19a, hsa-miR-19b, hsa-miR-20a, hsa-miR-21, hsa-miR-22, hsa-miR-23a, hsa-miR-189, hsa-miR-24, hsa-miR-25, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-27a, hsa-miR-28, hsa-miR-29a, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-31, hsa-miR-32, hsa-miR-33, hsa-miR-33, hsa-miR-92, hsa-miR-93, hsa-miR-95, hsa-miR-96, hsa-miR-98, hsa-miR-99a, hsa-miR-100, hsa-miR-101, hsa-miR-29b, hsa-miR-103, hsa-miR-105, hsa-miR-106a, hsa-miR-107, hsa-miR-192, hsa-miR-196a, hsa-miR-197, hsa-miR-198, hsa-miR-199a, hsa-miR-199a*, hsa-miR-208, hsa-miR-129, hsa-miR-148a, hsa-miR-30c, hsa-miR-30d, hsa-miR-139, hsa-miR-147, hsa-miR-7, hsa-miR-10a, hsa-miR-10b, hsa-miR-34a, hsa-miR-181a, hsa-miR-181b, hsa-miR-181c, hsa-miR-182, hsa-miR-182*, hsa-miR-183, hsa-miR-187, hsa-miR-199b, hsa-miR-203, hsa-miR-204, hsa-miR-205, hsa-miR-210, hsa-miR-211, hsa-miR-212, hsa-miR-181a*, hsa-miR-214, hsa-miR-215, hsa-miR-216, hsa-miR-217, hsa-miR-218, hsa-miR-219, hsa-miR-220, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-223, hsa-miR-224, hsa-miR-200b, hsa-let-7g, hsa-let-7i, hsa-miR-1, hsa-miR-15b, hsa-miR-23b, hsa-miR-27b, hsa-miR-30b, hsa-miR-122a, hsa-miR-124a, hsa-miR-125b, hsa-miR-128a, hsa-miR-130a, hsa-miR-132, hsa-miR-133a, hsa-miR-135a, hsa-miR-137, hsa-miR-138, hsa-miR-140, hsa-miR-141, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-143, hsa-miR-144, hsa-miR-145, hsa-miR-152, hsa-miR-153, hsa-miR-191, hsa-miR-9, hsa-miR-9*, hsa-miR-125a, hsa-miR-126*, hsa-miR-126, hsa-miR-127, hsa-miR-134, hsa-miR-136, hsa-miR-146a, hsa-miR-149, hsa-miR-150, hsa-miR-154, hsa-miR-154*, hsa-miR-184, hsa-miR-185, hsa-miR-186, hsa-miR-188, hsa-miR-190, hsa-miR-193a, hsa-miR-194, hsa-miR-195, hsa-miR-206, hsa-miR-320, hsa-miR-200c, hsa-miR-155, hsa-miR-128b, hsa-miR-106b, hsa-miR-29c, hsa-miR-200a, hsa-miR-302a*, hsa-miR-302a, hsa-miR-34b, hsa-miR-34c, hsa-miR-299-3p, hsa-miR-301, hsa-miR-99b, hsa-miR-296, hsa-miR-130b, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-361, hsa-miR-362, hsa-miR-363, hsa-miR-365, hsa-miR-302b*, hsa-miR-302b, hsa-miR-302c*, hsa-miR-302c, hsa-miR-302d, hsa-miR-

367, hsa-miR-368, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-370, hsa-miR-371, hsa-miR-372, hsa-miR-373*, hsa-miR-373, hsa-miR-374, hsa-miR-375, hsa-miR-376a, hsa-miR-377, hsa-miR-378, hsa-miR-422b, hsa-miR-379, hsa-miR-380-5p, hsa-miR-380-3p, hsa-miR-381, hsa-miR-382, hsa-miR-383, hsa-miR-340, hsa-miR-330, hsa-miR-328, hsa-miR-342, hsa-miR-337, hsa-miR-323, hsa-miR-326, hsa-miR-151, hsa-miR-135b, hsa-miR-148b, hsa-miR-331, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-338, hsa-miR-339, hsa-miR-335, hsa-miR-133b, hsa-miR-325, hsa-miR-345, hsa-miR-346, ebv-miR-BHRF1-1, ebv-miR-BHRF1-2*, ebv-miR-BHRF1-2, ebv-miR-BHRF1-3, ebv-miR-BART1-5p, ebv-miR-BART2, hsa-miR-384, hsa-miR-196b, hsa-miR-422a, hsa-miR-423, hsa-miR-424, hsa-miR-425-3p, hsa-miR-18b, hsa-miR-20b, hsa-miR-448, hsa-miR-429, hsa-miR-449, hsa-miR-450, hcmv-miR-UL22A, hcmv-miR-UL22A*, hcmv-miR-UL36, hcmv-miR-UL112, hcmv-miR-UL148D, hcmv-miR-US5-1, hcmv-miR-US5-2, hcmv-miR-US25-1, hcmv-miR-US25-2-5p, hcmv-miR-US25-2-3p, hcmv-miR-US33, hsa-miR-191*, hsa-miR-200a*, hsa-miR-369-5p, hsa-miR-431, hsa-miR-433, hsa-miR-329, hsa-miR-453, hsa-miR-451, hsa-miR-452, hsa-miR-452*, hsa-miR-409-5p, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-412, hsa-miR-410, hsa-miR-376b, hsa-miR-483, hsa-miR-484, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-486, hsa-miR-487a, kshv-miR-K12-10a, kshv-miR-K12-10b, kshv-miR-K12-11, kshv-miR-K12-1, kshv-miR-K12-2, kshv-miR-K12-9*, kshv-miR-K12-9, kshv-miR-K12-8, kshv-miR-K12-7, kshv-miR-K12-6-5p, kshv-miR-K12-6-3p, kshv-miR-K12-5, kshv-miR-K12-4-5p, kshv-miR-K12-4-3p, kshv-miR-K12-3, kshv-miR-K12-3*, hsa-miR-488, hsa-miR-489, hsa-miR-490, hsa-miR-491, hsa-miR-511, hsa-miR-146b, hsa-miR-202*, hsa-miR-202, hsa-miR-492, hsa-miR-493-5p, hsa-miR-432, hsa-miR-432*, hsa-miR-494, hsa-miR-495, hsa-miR-496, hsa-miR-193b, hsa-miR-497, hsa-miR-181d, hsa-miR-512-5p, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-498, hsa-miR-520e, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-515-3p, hsa-miR-519e*, hsa-miR-519e, hsa-miR-520f, hsa-miR-526c, hsa-miR-519c, hsa-miR-520a*, hsa-miR-520a, hsa-miR-526b, hsa-miR-526b*, hsa-miR-519b, hsa-miR-525, hsa-miR-525*, hsa-miR-523, hsa-miR-518f*, hsa-miR-518f, hsa-miR-520b, hsa-miR-518b, hsa-miR-526a, hsa-miR-520c, hsa-miR-518c*, hsa-miR-518c, hsa-miR-524*, hsa-miR-524, hsa-miR-517*, hsa-miR-517a, hsa-miR-519d, hsa-miR-521, hsa-miR-520d*, hsa-miR-520d, hsa-miR-517b, hsa-miR-520g, hsa-miR-516-5p, hsa-miR-516-3p, hsa-miR-518e, hsa-miR-527, hsa-miR-518a, hsa-miR-518d, hsa-miR-517c, hsa-miR-520h, hsa-miR-522, hsa-miR-519a, hsa-miR-499, hsa-miR-500, hsa-miR-501, hsa-miR-502, hsa-miR-503, hsa-miR-504, hsa-miR-505, hsa-miR-513, hsa-miR-506, hsa-miR-507, hsa-miR-508, hsa-miR-509, hsa-miR-510, hsa-miR-514, hsa-miR-532, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-18a*, hsa-miR-455, hsa-miR-493-3p, hsa-miR-539, hsa-miR-544, hsa-miR-545, hsa-miR-487b, hsa-miR-551a, hsa-miR-552, hsa-miR-553, hsa-miR-554, hsa-miR-92b, hsa-miR-555, hsa-miR-556, hsa-miR-557, hsa-miR-558, hsa-miR-559, hsa-miR-560, hsa-miR-561, hsa-miR-562, hsa-miR-563, hsa-miR-564, hsa-miR-565, hsa-miR-566, hsa-miR-567, hsa-miR-568, hsa-miR-551b, hsa-miR-569, hsa-miR-570, hsa-miR-571, hsa-miR-572, hsa-miR-573, hsa-miR-574, hsa-miR-575, hsa-miR-576, hsa-miR-577, hsa-miR-578, hsa-miR-579, hsa-miR-580, hsa-miR-581, hsa-miR-582, hsa-miR-583, hsa-miR-584, hsa-miR-585, hsa-miR-548a, hsa-miR-586, hsa-miR-587, hsa-miR-548b, hsa-miR-588, hsa-miR-589, hsa-miR-550, hsa-miR-590, hsa-miR-591, hsa-miR-592, hsa-miR-593, hsa-miR-595, hsa-miR-596, hsa-miR-597, hsa-miR-598, hsa-miR-599, hsa-miR-600, hsa-miR-601, hsa-miR-602, hsa-miR-603, hsa-miR-604, hsa-miR-605, hsa-miR-606, hsa-miR-607, hsa-miR-608, hsa-miR-609, hsa-miR-610, hsa-miR-611, hsa-miR-612, hsa-miR-613, hsa-miR-614, hsa-miR-615, hsa-miR-616, hsa-miR-548c, hsa-miR-617, hsa-miR-618, hsa-miR-619, hsa-miR-620, hsa-miR-621, hsa-miR-622, hsa-miR-623, hsa-miR-624, hsa-miR-625, hsa-miR-626, hsa-miR-627, hsa-miR-628, hsa-miR-629, hsa-miR-630, hsa-miR-631, hsa-miR-33b, hsa-miR-632, hsa-miR-633, hsa-miR-634, hsa-miR-635, hsa-miR-636, hsa-miR-637, hsa-miR-638, hsa-miR-639, hsa-miR-640, hsa-miR-641, hsa-miR-642, hsa-miR-643, hsa-miR-644, hsa-miR-645, hsa-miR-646, hsa-miR-647, hsa-miR-648, hsa-miR-649, hsa-miR-650, hsa-miR-651, hsa-miR-652, hsa-miR-548d, hsa-miR-661, hsa-miR-662, hsa-miR-663, hsa-miR-449b, hsa-miR-653, hsa-miR-411, hsa-miR-654, hsa-miR-655, hsa-miR-656, hsa-miR-549, hsa-miR-657, hsa-miR-658, hsa-miR-659, hsa-miR-660, hsa-miR-421, hsa-miR-542-5p, hcmv-miR-US4, hcmv-miR-UL70-5p, hcmv-miR-UL70-3p, hsa-miR-363*, hsa-miR-376a*, hsa-miR-542-3p, ebv-miR-BART1-3p, hsa-miR-425-5p, ebv-miR-BART3-5p, ebv-miR-BART3-3p, ebv-miR-BART4, ebv-miR-BART5, ebv-miR-BART6-5p, ebv-miR-BART6-3p, ebv-miR-BART7, ebv-miR-BART8-5p, ebv-miR-BART8-3p, ebv-miR-BART9, ebv-miR-BART10, ebv-miR-BART11-5p, ebv-miR-BART11-3p, ebv-miR-BART12, ebv-miR-BART13, ebv-miR-BART14-5p, ebv-miR-BART14-3p, kshv-miR-K12-12, ebv-miR-BART15, ebv-miR-BART16, ebv-miR-BART17-5p, ebv-miR-BART17-3p, ebv-miR-BART18, ebv-miR-BART19, ebv-miR-BART20-5p, ebv-miR-BART20-3p, hsv1-miR-H1, hsa-miR-758, hsa-miR-671, hsa-miR-668, hsa-miR-767-5p, hsa-miR-767-3p, hsa-miR-454-5p, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-769-3p, hsa-miR-766, hsa-miR-765, hsa-miR-768-5p, hsa-miR-768-3p, hsa-miR-770-5p, hsa-miR-802, hsa-miR-801, hsa-miR-675.

En una realización, el oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención es complementario a una secuencia de microARN, tal como una secuencia de microARN seleccionada entre el grupo que consiste en: hsa-let-7a, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7d, hsa-let-7e, hsa-let-7f, hsa-miR-15a, hsa-miR-16, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-17-3p, hsa-miR-18a, hsa-miR-19a, hsa-miR-20a, hsa-miR-22, hsa-miR-23a, hsa-miR-189, hsa-miR-24, hsa-miR-25, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-27a, hsa-miR-28, hsa-miR-29a, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-31, hsa-miR-32, hsa-miR-33, hsa-miR-92, hsa-miR-93, hsa-miR-95, hsa-miR-96, hsa-miR-98, hsa-miR-99a, hsa-miR-100, hsa-miR-101, hsa-miR-29b, hsa-miR-103, hsa-miR-105, hsa-miR-106a, hsa-miR-107, hsa-miR-192, hsa-miR-196a, hsa-miR-197, hsa-miR-198, hsa-miR-199a, hsa-miR-199a*, hsa-miR-208, hsa-miR-129, hsa-miR-148a, hsa-miR-30c, hsa-miR-30d, hsa-miR-139, hsa-miR-147, hsa-miR-7, hsa-miR-10a, hsa-miR-10b, hsa-miR-34a, hsa-miR-181a, hsa-miR-181b, hsa-miR-181c, hsa-miR-182, hsa-miR-182*, hsa-miR-183, hsa-miR-187, hsa-miR-199b, hsa-miR-203, hsa-miR-204, hsa-miR-205, hsa-miR-210, hsa-miR-211, hsa-miR-212, hsa-miR-181a*, hsa-miR-214, hsa-miR-215, hsa-miR-216, hsa-miR-217, hsa-miR-218, hsa-miR-219, hsa-miR-220, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-223, hsa-miR-224, hsa-miR-200b, hsa-let-7g, hsa-let-7i, hsa-miR-1, hsa-miR-15b, hsa-miR-23b, hsa-miR-27b, hsa-miR-30b, hsa-miR-124a, hsa-miR-125b, hsa-miR-128a, hsa-miR-130a, hsa-miR-132, hsa-miR-133a, hsa-miR-135a, hsa-miR-137, hsa-miR-138, hsa-miR-140, hsa-miR-141, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-143, hsa-miR-144, hsa-miR-145, hsa-

miR-152, hsa-miR-153, hsa-miR-191, hsa-miR-9, hsa-miR-9*, hsa-miR-125a, hsa-miR-126*, hsa-miR-126, hsa-miR-127, hsa-miR-134, hsa-miR-136, hsa-miR-146a, hsa-miR-149, hsa-miR-150, hsa-miR-154, hsa-miR-154*, hsa-miR-184, hsa-miR-185, hsa-miR-186, hsa-miR-188, hsa-miR-190, hsa-miR-193a, hsa-miR-194, hsa-miR-195, hsa-miR-206, hsa-miR-320, hsa-miR-200c, hsa-miR-128b, hsa-miR-106b, hsa-miR-29c, hsa-miR-200a, hsa-miR-302a*, hsa-miR-302a, hsa-miR-34b, hsa-miR-34c, hsa-miR-299-3p, hsa-miR-301, hsa-miR-99b, hsa-miR-296, hsa-miR-130b, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-361, hsa-miR-362, hsa-miR-363, hsa-miR-365, hsa-miR-302b*, hsa-miR-302b, hsa-miR-302c*, hsa-miR-302c, hsa-miR-302d, hsa-miR-367, hsa-miR-368, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-370, hsa-miR-371, hsa-miR-372, hsa-miR-373*, hsa-miR-373, hsa-miR-374, hsa-miR-376a, hsa-miR-377, hsa-miR-378, hsa-miR-422b, hsa-miR-379, hsa-miR-380-5p, hsa-miR-380-3p, hsa-miR-381, hsa-miR-382, hsa-miR-383, hsa-miR-340, hsa-miR-330, hsa-miR-328, hsa-miR-342, hsa-miR-337, hsa-miR-323, hsa-miR-326, hsa-miR-151, hsa-miR-135b, hsa-miR-148b, hsa-miR-331, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-338, hsa-miR-339, hsa-miR-335, hsa-miR-133b, hsa-miR-325, hsa-miR-345, hsa-miR-346, ebv-miR-BHRF1-1, ebv-miR-BHRF1-2*, ebv-miR-BHRF1-2, ebv-miR-BHRF1-3, ebv-miR-BART1-5p, ebv-miR-BART2, hsa-miR-384, hsa-miR-196b, hsa-miR-422a, hsa-miR-423, hsa-miR-424, hsa-miR-425-3p, hsa-miR-18b, hsa-miR-20b, hsa-miR-448, hsa-miR-429, hsa-miR-449, hsa-miR-450, hcmv-miR-UL22A, hcmv-miR-UL22A*, hcmv-miR-UL36, hcmv-miR-UL112, hcmv-miR-UL148D, hcmv-miR-US5-1, hcmv-miR-US5-2, hcmv-miR-US25-1, hcmv-miR-US25-2-5p, hcmv-miR-US25-2-3p, hcmv-miR-US33, hsa-miR-191*, hsa-miR-200a*, hsa-miR-369-5p, hsa-miR-431, hsa-miR-433, hsa-miR-329, hsa-miR-453, hsa-miR-451, hsa-miR-452, hsa-miR-452*, hsa-miR-409-5p, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-412, hsa-miR-410, hsa-miR-376b, hsa-miR-483, hsa-miR-484, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-486, hsa-miR-487a, kshv-miR-K12-10a, kshv-miR-K12-10b, kshv-miR-K12-11, kshv-miR-K12-1, kshv-miR-K12-2, kshv-miR-K12-9*, kshv-miR-K12-9, kshv-miR-K12-8, kshv-miR-K12-7, kshv-miR-K12-6-5p, kshv-miR-K12-6-3p, kshv-miR-K12-5, kshv-miR-K12-4-5p, kshv-miR-K12-4-3p, kshv-miR-K12-3, kshv-miR-K12-3*, hsa-miR-488, hsa-miR-489, hsa-miR-490, hsa-miR-491, hsa-miR-511, hsa-miR-146b, hsa-miR-202*, hsa-miR-202, hsa-miR-492, hsa-miR-493-5p, hsa-miR-432, hsa-miR-432*, hsa-miR-494, hsa-miR-495, hsa-miR-496, hsa-miR-193b, hsa-miR-497, hsa-miR-181d, hsa-miR-512-5p, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-498, hsa-miR-520e, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-515-3p, hsa-miR-519e*, hsa-miR-519e, hsa-miR-520f, hsa-miR-526c, hsa-miR-519c, hsa-miR-520a*, hsa-miR-520a, hsa-miR-526b, hsa-miR-526b*, hsa-miR-519b, hsa-miR-525, hsa-miR-525*, hsa-miR-523, hsa-miR-518f*, hsa-miR-518f, hsa-miR-520b, hsa-miR-518b, hsa-miR-526a, hsa-miR-520c, hsa-miR-518c*, hsa-miR-518c, hsa-miR-524*, hsa-miR-524, hsa-miR-517*, hsa-miR-517a, hsa-miR-519d, hsa-miR-521, hsa-miR-520d*, hsa-miR-520d, hsa-miR-517b, hsa-miR-520g, hsa-miR-516-5p, hsa-miR-516-3p, hsa-miR-518e, hsa-miR-527, hsa-miR-518a, hsa-miR-518d, hsa-miR-517c, hsa-miR-520h, hsa-miR-522, hsa-miR-519a, hsa-miR-499, hsa-miR-500, hsa-miR-501, hsa-miR-502, hsa-miR-503, hsa-miR-504, hsa-miR-505, hsa-miR-513, hsa-miR-506, hsa-miR-507, hsa-miR-508, hsa-miR-509, hsa-miR-510, hsa-miR-514, hsa-miR-532, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-18a*, hsa-miR-455, hsa-miR-493-3p, hsa-miR-539, hsa-miR-544, hsa-miR-545, hsa-miR-487b, hsa-miR-551a, hsa-miR-552, hsa-miR-553, hsa-miR-554, hsa-miR-92b, hsa-miR-555, hsa-miR-556, hsa-miR-557, hsa-miR-558, hsa-miR-559, hsa-miR-560, hsa-miR-561, hsa-miR-562, hsa-miR-563, hsa-miR-564, hsa-miR-565, hsa-miR-566, hsa-miR-567, hsa-miR-568, hsa-miR-551b, hsa-miR-569, hsa-miR-570, hsa-miR-571, hsa-miR-572, hsa-miR-573, hsa-miR-574, hsa-miR-575, hsa-miR-576, hsa-miR-577, hsa-miR-578, hsa-miR-579, hsa-miR-580, hsa-miR-581, hsa-miR-582, hsa-miR-583, hsa-miR-584, hsa-miR-585, hsa-miR-548a, hsa-miR-586, hsa-miR-587, hsa-miR-548b, hsa-miR-588, hsa-miR-589, hsa-miR-550, hsa-miR-590, hsa-miR-591, hsa-miR-592, hsa-miR-593, hsa-miR-595, hsa-miR-596, hsa-miR-597, hsa-miR-598, hsa-miR-599, hsa-miR-600, hsa-miR-601, hsa-miR-602, hsa-miR-603, hsa-miR-604, hsa-miR-605, hsa-miR-606, hsa-miR-607, hsa-miR-608, hsa-miR-609, hsa-miR-610, hsa-miR-611, hsa-miR-612, hsa-miR-613, hsa-miR-614, hsa-miR-615, hsa-miR-616, hsa-miR-548c, hsa-miR-617, hsa-miR-618, hsa-miR-619, hsa-miR-620, hsa-miR-621, hsa-miR-622, hsa-miR-623, hsa-miR-624, hsa-miR-625, hsa-miR-626, hsa-miR-627, hsa-miR-628, hsa-miR-629, hsa-miR-630, hsa-miR-631, hsa-miR-33b, hsa-miR-632, hsa-miR-633, hsa-miR-634, hsa-miR-635, hsa-miR-636, hsa-miR-637, hsa-miR-638, hsa-miR-639, hsa-miR-640, hsa-miR-641, hsa-miR-642, hsa-miR-643, hsa-miR-644, hsa-miR-645, hsa-miR-646, hsa-miR-647, hsa-miR-648, hsa-miR-649, hsa-miR-650, hsa-miR-651, hsa-miR-652, hsa-miR-548d, hsa-miR-661, hsa-miR-662, hsa-miR-663, hsa-miR-449b, hsa-miR-653, hsa-miR-411, hsa-miR-654, hsa-miR-655, hsa-miR-656, hsa-miR-549, hsa-miR-657, hsa-miR-658, hsa-miR-659, hsa-miR-660, hsa-miR-421, hsa-miR-542-5p, hcmv-miR-US4, hcmv-miR-UL70-5p, hcmv-miR-UL70-3p, hsa-miR-363*, hsa-miR-376a*, hsa-miR-542-3p, ebv-miR-BART1-3p, hsa-miR-425-5p, ebv-miR-BART3-5p, ebv-miR-BART3-3p, ebv-miR-BART4, ebv-miR-BART5, ebv-miR-BART6-5p, ebv-miR-BART6-3p, ebv-miR-BART7, ebv-miR-BART8-5p, ebv-miR-BART8-3p, ebv-miR-BART9, ebv-miR-BART10, ebv-miR-BART11-5p, ebv-miR-BART11-3p, ebv-miR-BART12, ebv-miR-BART13, ebv-miR-BART14-5p, ebv-miR-BART14-3p, kshv-miR-K12-12, ebv-miR-BART15, ebv-miR-BART16, ebv-miR-BART17-5p, ebv-miR-BART17-3p, ebv-miR-BART18, ebv-miR-BART19, ebv-miR-BART20-5p, ebv-miR-BART20-3p, hsv1-miR-H1, hsa-miR-758, hsa-miR-671, hsa-miR-668, hsa-miR-767-5p, hsa-miR-767-3p, hsa-miR-454-5p, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-769-3p, hsa-miR-766, hsa-miR-765, hsa-miR-768-5p, hsa-miR-768-3p, hsa-miR-770-5p, hsa-miR-802, hsa-miR-801, hsa-miR-675.

Los oligonucleótidos monocatenarios preferidos de acuerdo con la invención son complementarios a una secuencia de microARN seleccionado entre el grupo que consiste en hsa-miR19b, hsa-miR21, hsa-miR 122, hsa-miR 142 a7b, hsa-miR 155, hsa-miR 375.

Los oligonucleótidos monocatenarios preferidos de acuerdo con la invención son complementarios a una secuencia de microARN seleccionado entre el grupo que consiste en hsa-miR196b y hsa-181a.

65

- En una realización, el oligonucleótido de acuerdo con la invención no comprende una nucleobase en el extremo 3' que corresponde al primer nucleótido del extremo 5' del microARN diana.
- 5 En una realización, la primera nucleobase del oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención, contando desde el extremo 3', es un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA.
- En una realización, la segunda nucleobase del oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención, contando desde el extremo 3', es un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA.
- 10 En una realización, el noveno y/o el décimo nucleótido del oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención, contando desde el extremo 3', es un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA.
- En una realización, la novena nucleobase del oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención, contando desde el extremo 3', es un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA.
- 15 En una realización, la décima nucleobase del oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención, contando desde el extremo 3', es un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA.
- En una realización, tanto la novena como la décima nucleobase del oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención, calculada desde el extremo 3', es un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA.
- 20 En una realización, el oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención no comprende una región de más de 5 unidades de nucleótido de ADN consecutivas. En una realización, el oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención no comprende una región de más de 6 unidades de nucleótido de ADN consecutivas. En una realización, el oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención no comprende una región de más de 7 unidades de nucleótido de ADN consecutivas. En una realización, el oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención no comprende una región de más de 8 unidades de nucleótido de ADN consecutivas. En una realización, el oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención no comprende una región de más de 3 unidades de nucleótido de ADN consecutivas. En una realización, el oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención no comprende una región de más de 2 unidades de nucleótido de ADN consecutivas.
- 25 En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende al menos una región que consiste en al menos dos unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tal como al menos dos unidades consecutivas de LNA.
- 30 En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende al menos una región que consiste en al menos tres unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tal como al menos tres unidades consecutivas de LNA.
- 35 En una realización, el oligonucleótido monocatenario de la invención no comprende una región de más de 7 unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tales como unidades de LNA. En una realización, el oligonucleótido monocatenario de la invención no comprende una región de más de 6 unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tales como unidades de LNA. En una realización, el oligonucleótido monocatenario de la invención no comprende una región de más de 5 unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tales como unidades de LNA. En una realización, el oligonucleótido monocatenario de la invención no comprende una región de más de 4 unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tales como unidades de LNA. En una realización, el oligonucleótido monocatenario de la invención no comprende una región de más de 3 unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tales como unidades de LNA. En una realización, el oligonucleótido monocatenario de la invención no comprende una región de más de 2 unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tales como unidades de LNA.
- 40 En una realización, la primera o la segunda nucleobase 3' del oligonucleótido monocatenario corresponde al segundo nucleótido 5' de la secuencia de microARN.
- 45 En una realización, las unidades de nucleobases 1 a 6 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario, son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN.
- 50 En una realización, las unidades de nucleobases 1 a 7 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario, son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN.
- 55 En una realización, las unidades de nucleobases 2 a 7 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario, son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN.
- 60 El oligonucleótido monocatenario comprende al menos una unidad de LNA, en una posición que se encuentra dentro de la región complementaria a la región de semilla de miARN. El oligonucleótido monocatenario puede, en una realización, comprender entre una y 6 o entre 1 y 7 unidades de análogo de nucleótido, tal como entre 1 y 6 y entre 1
- 65

y 7 unidades de LNA, en una posición que se encuentra dentro de la región complementaria a la región de semilla de miARN.

5 En una realización, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido monocatenario que es complementaria a la secuencia de la región de semilla de microARN, se selecciona entre el grupo que consiste en (X)Xxxxx, (X)xXxxxx, (X)xxXxxx, (X)xxxXxx, (X)xxxxXx y (X)xxxxxX, leída en la dirección 3' - 5', en donde "X" indica un análogo de nucleótido, (X) indica un análogo de nucleótido opcional, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

10 En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende al menos dos unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos dos unidades de LNA, en posiciones que son complementarias a la región de semilla de miARN.

15 En una realización, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido monocatenario que es complementaria a la secuencia de la región de semilla de microARN, se selecciona entre el grupo que consiste en (X)XXxxxx, (X)XxXxxx, (X)XxxXXX, (X)XxxxXx, (X)XxxxxX, (X)xXXxxx, (X)xXxXxx, (X)xXxxXx, (X)xXxxxX, (X)xxXXxx, (X)xxXxXx, (X)xxXxxX, (X)xxxXXx, (X)xxxXxX y (X)xxxxXX, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, (X) indica un análogo de nucleótido opcional, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

20 En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende al menos tres unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos tres unidades de LNA, en posiciones que son complementarias a la región de semilla de miARN.

25 En una realización, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido monocatenario que es complementaria a la secuencia de la región de semilla de microARN, se selecciona entre el grupo que consiste en (X)XXXxxx, (X)xXXXxx, (X)xxXXXx, (X)xxxXXX, (X)XXxXxx, (X)XXxxXx, (X)XXxxxX, (X)xXXxXx, (X)xXXxxX, (X)xxXXxX, (X)XxXXxx, (X)XxxXXx, (X)XxxxXX, (X)xXxXXx, (X)xXxxXX, (X)xxXxXX, (X)xXxXxX y (X)XxXxXx, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, (X) indica un análogo de nucleótido opcional, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

30 En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende al menos cuatro unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos cuatro unidades de LNA, en posiciones que son complementarias a la región de semilla de miARN.

35 En una realización, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido monocatenario que es complementaria a la secuencia de la región de semilla de microARN, se selecciona entre el grupo que consiste en (X)xxXXX, (X)xXxXXX, (X)xXXxXX, (X)xXXXxX, (X)xXXXXx, (X)XxxXXXX, (X)XxXxXX, (X)XxXXxX, (X)XxXXX, (X)XXxxXX, (X)XXxXxX, (X)XXXxxx, (X)XXXxXx y (X)XXXXxx, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, (X) indica un análogo de nucleótido opcional, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

40 En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende al menos cinco unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos cinco unidades de LNA, en posiciones que son complementarias a la región de semilla de miARN.

45 En una realización, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido monocatenario que es complementaria a la secuencia de la región de semilla de microARN, se selecciona entre el grupo que consiste en (X)xXXXXX, (X)XxXXXX, (X)XXxXXX, (X)XXXxXX, (X)XXXXxX y (X)XXXXXx, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, (X) indica un análogo de nucleótido opcional, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

50 En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende seis o siete unidades de análogo de nucleótido, tal como seis o siete unidades de LNA, en posiciones que son complementarias a la región de semilla de miARN.

55 En una realización, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido monocatenario que es complementaria a la secuencia de la región de semilla de microARN, se selecciona entre el grupo que consiste en XXXXXX, XxXXXX, XXxXXXX, XXXxXXX, XXXXxXX, XXXXXxX y XXXXXXx, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

60 En una realización, el motivo de dos nucleobases en la posición 7 a 8, que continúa desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario se selecciona entre el grupo que consiste en xx, XX, xX y Xx, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

65 En una realización, el motivo de dos nucleobases en la posición 7 a 8, que continúa desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario se selecciona entre el grupo que consiste en XX, xX y Xx, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

- 5 En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende al menos 12 nucleobases y en donde el motivo de dos nucleobases en la posición 11 a 12, que continúa desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario se selecciona entre el grupo que consiste en xx, XX, xX y Xx, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 10 En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende al menos 12 nucleobases y en donde el motivo de dos nucleobases en la posición 11 a 12, que continúa desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario se selecciona entre el grupo que consiste en XX, xX y Xx, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 15 En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende al menos 13 nucleobases y en donde el motivo de tres nucleobases en la posición 11 a 13, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xxx, Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX y XXX, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 20 En una realización, el motivo de tres nucleobases en la posición 11 a 13, contando desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario, se selecciona entre el grupo que consiste en Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX y XXX, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 25 En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende al menos 14 nucleobases y en donde el motivo de cuatro nucleobases en las posiciones 11 a 14, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xxxx, Xxxx, xXxx, xxXx, xxxX, XXxx, XxXx, XxxX, xXXx, xXxX, xxXX, XXXx, XxXX, xXXX, XXxX y XXXX, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 30 En una realización, el motivo de cuatro nucleobases en la posición 11 a 14 del oligonucleótido monocatenario, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en Xxxx, xXxx, xxXx, xxxX, XXxx, XxXx, XxxX, xXXx, xXxX, xxXX, XXXx y XXXX, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 35 En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende 15 nucleobases y el motivo de cinco nucleobases en la posición 11 a 15, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en Xxxxx, xXxxx, xxXxx, xxxXx, xxxxx, XXxxx, XxXxx, XxxXx, xXXxx, xXxXx, xxXXx, xxXxX, xxxXX, XXXxx, XXxxX, XxxXX, xXXXx, xxXXX, XXxXX, XxXxX, XXXXx, XXXXx, XXxXX, XxXXXX, xXXXX y XXXXX, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 40 En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende 16 nucleobases y el motivo de seis nucleobases en las posiciones 11 a 16, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en Xxxxxx, xXxxxx, xxXxxx, xxxXxx, xxxxxX, Xxxxx, XxXxxx, XxxXxx, xXXxxx, xXxXxx, xxXXx, xxXxX, xxxXX, XXXxx, XXxxX, XxxXX, xXXXX, xxxXXX, XXxXX, XxXXX, XXXXx, XXXXx, XXxXX, XxXXXX, xXXXX y XXXXX, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 45 En una realización, el motivo de seis nucleobases en las posiciones 11 a 16 del oligonucleótido monocatenario, contando desde el extremo 3', es xxXxxX, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 50 En una realización, las tres nucleobases más en 5', se selecciona entre el grupo que consiste en Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX y XXX, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN. En una realización, "x" indica una unidad de ADN.
- 55 En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende una unidad de análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, en el extremo 5'.
- 60 En una realización, las unidades de análogo de nucleótido, tal como X, se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: unidad de 2'-O-alkuil-ARN, unidad de 2'-OMe-ARN, unidad de 2'-amino-ADN, unidad de 2'-fluoro-ADN, unidad de LNA, unidad de PNA, unidad de HNA, unidad de INA.
- 65 En una realización, todas las nucleobases del oligonucleótido monocatenario de la invención son unidades de análogo de nucleótido.

- En una realización, las unidades de análogo de nucleótido, tal como X, se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: unidades de 2'-OMe-ARN, unidad de 2'-fluoro-ADN y unidades de LNA.
- 5 En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende dicha al menos una unidad de análogo de LNA y al menos una unidad de análogo de nucleótido adicional distinto de LNA.
- En una realización, la unidad o unidades de análogo de nucleótido distinto de LNA se seleccionan independientemente entre unidades de 2'-OMe ARN y unidades de 2'-fluoro ADN.
- 10 En una realización, el oligonucleótido monocatenario consiste en al menos una secuencia XYX o YXY, en donde X es LNA e Y es o bien una unidad de 2'-OMe-ARN o una unidad de 2'-fluoro-ADN.
- En una realización, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido monocatenario consiste en unidades de X e Y alternas.
- 15 En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende unidades de LNA y ADN alternas (Xx) o (xx).
- En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende un motivo alterno de LNA seguido de 2 unidades de ADN (Xxx), xXx o xxX.
- 20 En una realización, al menos una de las unidades de ADN o de análogo de nucleótido distinto de LNA se reemplaza con una nucleobase de LNA en una posición seleccionada entre las posiciones identificadas como unidades de nucleobase de LNA en una cualquiera de las realizaciones citadas anteriormente.
- 25 En una realización, "X" indica una unidad de LNA.
- En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende al menos 2 unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos 3 unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos 4 unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos 5 unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos 6 unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos 7 unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos 8 unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos 9 unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos 10 unidades de análogo de nucleótido.
- 30 En una realización, el oligonucleótido monocatenario comprende al menos 2 unidades de LNA, tal como al menos 3 unidades de LNA, tal como al menos 4 unidades de LNA, tal como al menos 5 unidades de LNA, tal como al menos 6 unidades de LNA, tal como al menos 7 unidades de LNA, tal como al menos 8 unidades de LNA, tal como al menos 9 unidades de LNA, tal como al menos 10 unidades de LNA.
- 35 En una realización en donde al menos uno de los análogos de nucleótido, tal como unidades de LNA, es citosina o guanina, tal como entre 1 - 10 de los análogos de nucleótido, tal como unidades de LNA, es citosina o guanina, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de los análogos de nucleótido, tal como unidades de LNA, es citosina o guanina.
- 40 En una realización, al menos dos de los análogos de nucleótido, tal como unidades de LNA, es citosina o guanina. En una realización, al menos tres de los análogos de nucleótido, tal como unidades de LNA, es citosina o guanina. En una realización, al menos cuatro de los análogos de nucleótido, tal como unidades de LNA, es citosina o guanina. En una realización, al menos cinco de los análogos de nucleótido, tal como unidades de LNA, es citosina o guanina. En una realización, al menos seis de los análogos de nucleótido, tal como unidades de LNA, es citosina o guanina. En una realización, al menos siete de los análogos de nucleótido, tal como unidades de LNA, es citosina o guanina. En una realización, al menos ocho de los análogos de nucleótido, tal como unidades de LNA, es citosina o guanina.
- 45 En una realización, los análogos de nucleótido tienen una mayor estabilidad térmica de dúplex con un nucleótido de ARN complementario que la afinidad de unión de un nucleótido de ADN equivalente con dicho nucleótido de ARN complementario.
- 50 En una realización, los análogos de nucleótido confieren estabilidad en suero mejorada respecto del oligonucleótido monocatenario.
- 55 En una realización, el oligonucleótido monocatenario adopta una conformación de hélice A con una molécula de ARN monocatenario complementaria.
- 60 Normalmente, existe un dúplex entre dos moléculas de ARN en una conformación de forma A, mientras que normalmente, existe un dúplex entre dos moléculas de ADN en una conformación de forma B. Normalmente, existe un dúplex entre una molécula de ADN y una de ARN en una conformación intermedia (forma A/B). El uso de análogos de nucleótidos, tales como beta-D-oxi LNA, puede usarse para promover una conformación más similar a la forma A. Para determinar la forma de los dúplex entre los oligonucleótidos de la invención y las moléculas de ARN complementarias se usa análisis de dicroísmo circular (CD) o RMN estándar.
- 65

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

5 Sin embargo, los presentes inventores también han determinado que también puede ser eficaz el uso de análogos de nucleótido que promueven la estructura de forma A, tales como el isómero alfa-L de LNA.

En una realización, el oligonucleótido monocatenario adopta una conformación de forma A/B con una molécula de ARN monocatenario complementaria.

10 En una realización, el oligonucleótido monocatenario adopta una conformación de forma A con una molécula de ARN monocatenario complementaria.

15 En una realización, el oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención no media la escisión basada en RNasaH de una molécula de ARN monocatenario complementaria. Para que un oligonucleótido sea eficaz para el reclutamiento de RNasaH, normalmente se necesita una serie de al menos 5 (normalmente no eficaz para el reclutamiento de RNasaH), más preferentemente al menos 6, más preferentemente al menos 7 u 8 nucleobases de ADN consecutivas (o nucleobases alternativas que puedan reclutar a RNasaH, tales como alfa L-amino LNA).

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

25 Se considera que un compuesto es esencialmente incapaz de reclutar a RNasaH si, cuando se proporciona la diana de ARN complementaria y RNasaH, la velocidad inicial de RNasaH, medida en pmol/l/min, es menor del 1 %, tal como menor del 5 %, tal como menor del 10 % o menor del 20 % de la velocidad inicial determinada usando el oligonucleótido equivalente de solo ADN, sin sustituciones en 2', con grupos de enlace fosforotioato entre todos los nucleótidos en el oligonucleótido, usando la metodología proporcionada en los ejemplos 91 - 95 del documento EP 1 222 309.

30 En una realización altamente preferida, el oligonucleótido monocatenario de la invención es capaz de formar un dúplex con una molécula de ácido nucleico de ARN monocatenario complementaria (normalmente de aproximadamente la misma longitud que dicho oligonucleótido monocatenario) con enlaces internucleósido fosfodiéster, en donde el dúplex tiene una T_m de al menos aproximadamente 60 °C, de hecho se prefiere que el oligonucleótido monocatenario sea capaz de formar un dúplex con una molécula de ácido nucleico de ARN monocatenario complementaria con enlaces internucleósido fosfodiéster, en donde el dúplex tiene una T_m de entre aproximadamente 70 °C a aproximadamente 95 °C, tal como una T_m de entre aproximadamente 70 °C a aproximadamente 90 °C, tal como entre aproximadamente 70 °C y aproximadamente 85 °C.

35 En una realización, el oligonucleótido monocatenario sea capaz de formar un dúplex con una molécula de ácido nucleico de ADN monocatenario complementaria con enlaces internucleósido fosfodiéster, en donde el dúplex tiene una T_m de entre aproximadamente 50 °C a aproximadamente 95 °C, tal como entre aproximadamente 50 °C a aproximadamente 90 °C, tal como al menos aproximadamente 55 °C, tal como al menos aproximadamente 60 °C o no más de aproximadamente 95 °C.

40 El oligonucleótido monocatenario puede, en una realización, tiene una longitud de entre 14-16 nucleobases, incluyendo 15 nucleobases.

En una realización, la unidad o unidades de LNA se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en oxi-LNA, tio-LNA y amino-LNA, en las configuraciones D-β y L-α o combinaciones de las mismas.

45 En una realización específica, las unidades de LNA pueden ser una nucleobase de ENA.

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

50 En una realización, las unidades de LNA se son de alfa-L amino LNA.

En una realización preferible, el oligonucleótido monocatenario comprende entre 3 y 17 unidades de LNA.

55 Todos los enlaces internucleósido son enlaces de fosforotioato.

60

En una realización, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende un transportador, tal como suero salino o suero salino tamponado.

5 En una realización, el método para la síntesis de un oligonucleótido monocatenario dirigido contra un microARN humano, se lleva en la dirección 3' a 5' a - f.

El método para la síntesis del oligonucleótido monocatenario de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo usando síntesis de oligonucleótidos en fase sólida.

10 Definiciones

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

15 El término "oligonucleótido" (o simplemente "oligo") se refiere, en el contexto de la presente invención, a una molécula formada por el enlace covalente de dos o más nucleobases. Cuando se usa en el contexto del oligonucleótido de la invención (también citado como el oligonucleótido monocatenario), el término "oligonucleótido" tiene una longitud de entre 8 - 17 nucleobases, tal como entre 8 - 16 nucleobases, tal como entre 12 - 15 nucleobases,

20 En dicha realización, el oligonucleótido de la invención puede tener una longitud de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 nucleobases.

25 Se reconocerá que para oligonucleótidos más cortos, puede ser necesario aumentar la proporción de análogos de nucleótido (de alta afinidad), tales como LNA. Por lo tanto, en una realización, al menos aproximadamente un 30 % de las nucleobases es de análogos de nucleótido, tal como al menos aproximadamente un 33 %, tal como al menos aproximadamente un 40 % o al menos aproximadamente un 50 % o al menos aproximadamente un 60 %, tal como al menos aproximadamente un 66 %, tal como al menos aproximadamente un 70 %, tal como al menos aproximadamente un 80 % o al menos aproximadamente un 90 %. También será evidente que el oligonucleótido puede comprender una secuencia de nucleobases que consiste únicamente en secuencias de análogo de nucleótido.

30 En el presente documento, la expresión "base nitrogenada" pretende abarcar purinas y pirimidinas, tales como las nucleobases de ADN, A, C, T y G, las nucleobases de ARN, A, C, U y G, así como nucleobases distintas de ADN/ARN, tales como 5-metilcitosina (^{Me}C), isocitosina, pseudocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiluracilo, 5-propinil-6-fluoroluracilo, 5-metilazoluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, 2,6-diaminopurina, 7-propina-7-desazaadenina, 7-propina-7-desazaguanina y 2-cloro-6-aminopurina, en particular, ^{Me}C. Se entenderá que la selección concreta de la nucleobase distinta de ADN/ARN dependerá del nucleótido correspondiente (o emparejado) presente en la hebra de microARN a la que se pretende que se dirija el oligonucleótido. Por ejemplo, en caso de que el nucleótido correspondiente sea G, normalmente será necesario seleccionar una nucleobase distinta de ADN/ARN, que es 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 distinta de ADN/ARN es ^{Me}C.

35 La expresión "grupo de enlace internucleósido" pretende hacer referencia a un grupo capaz de acoplarse de manera covalente junto a dos nucleobases, tal como entre unidades de ADN, entre unidades de ADN y análogos de nucleótido, entre dos unidades distintas de LNA, entre una unidad distinta de LNA y una unidad de LNA y entre dos unidades de LNA, etc. Los ejemplos preferidos incluyen fosfato, grupos fosfodiéster y grupos fosforotioato.

45 El enlace internucleósido puede seleccionarse entre el grupo que consiste en: -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O)₂-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S-, -O-P(O,S)-S-, -S-P(O)₂-S-, -O-PO(R^H)-O-, O-PO(OCH₃)-O-, -O-PO(NR^H)-O-, -O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-, -O-PO(BH₃)-O-, -O-PO(NHR^H)-O-, -O-P(O)₂-NR^H-, -NR^H-P(O)₂-O-, -NR^H-CO-O-, -NR^H-CO-NR^H- y/o el enlace internucleósido puede seleccionarse entre el grupo que consiste en: -O-CO-O-, -O-CO-NR^H-, -NR^H-CO-CH₂-, -O-CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-, -CO-NR^H-CH₂-, -CH₂-NR^H-CO-, -O-CH₂-CH₂-S-, -S-CH₂-CH₂-O-, -S-CH₂-CH₂-S-, -CH₂-SO₂-CH₂-, -CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-CO-, -CH₂-NCH₃-O-CH₂-, donde R^H se selecciona entre hidrógeno y alquilo C₁₋₄. De manera adecuada, en algunas realizaciones, pueden preferirse enlaces internucleósido que contienen azufre (S), como se han proporcionado anteriormente.

55 Las expresiones "correspondiente a" y "corresponde a", como se usan en el contexto de oligonucleótidos, se refiere a la comparación entre una secuencia de nucleobase del compuesto de la invención y el complemento inverso del mismo o en una realización, entre una secuencia de nucleobase y una secuencia de nucleobase equivalente (idéntica) que puede comprender, por ejemplo, otras nucleobases, pero que conserva la misma secuencia de bases o el complemento de la misma. Los análogos de nucleótido se comparan de manera directa con sus nucleótidos equivalentes o naturales correspondientes. Las secuencias que forman el complemento inverso de una secuencia se citan como la secuencia complementaria de la secuencia.

65 Cuando se hace referencia a la longitud de una molécula de nucleótido como se cita en el presente documento, la longitud corresponde al número de unidades de monómero, es decir, nucleobases, independientemente de si dichas unidades de monómero son nucleótidos o análogos de nucleótido. Con respecto a las nucleobases, los términos monómero y unidad se usan de manera intercambiable en el presente documento.

Ha de comprenderse que cuando se emplea el término "aproximadamente" en el contexto de valores o intervalos de valores específicos, la divulgación ha de leerse como inclusiva del valor o intervalo específico citado.

5 Los análogos de ADN preferidos incluyen análogos de ADN donde el grupo 2'-H está sustituido con una sustitución distinta de -OH (ARN), por ejemplo, mediante sustitución con -O-CH₃, -O-CH₂-CH₂-O-CH₃, -O-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂, -O-CH₂-CH₂-CH₂-OH o -F.

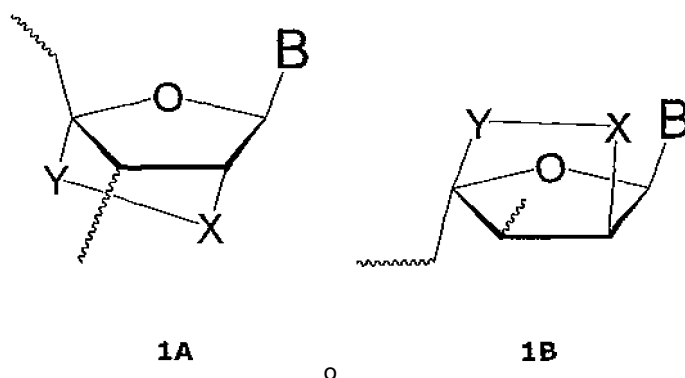
10 Los análogos de ARN preferidos incluyen análogos de ARN que se han modificado en su grupo 2'-OH, por ejemplo, mediante la sustitución con un grupo distinto de -H (ADN), por ejemplo, -O-CH₃, -O-CH₂-CH₂-O-CH₃, -O-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂, -O-CH₂-CH₂-CH₂-OH o -F.

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

15 Cuando se usan en el presente contexto, las expresiones "unidad de LNA", "monómero de LNA", "resto de LNA", "unidad de ácido nucleico bloqueado", "monómero de ácido nucleico bloqueado" o "resto de ácido nucleico bloqueado", se refieren a un análogo de nucleósido bicíclico. Las unidades de LNA se describe, entre otros, en los documentos WO 99/14226, WO 00/56746, WO 00/56748, WO 01/25248, WO 02/28875, WO 03/006475 y WO 03/095467. La unidad de LNA también puede definirse respecto de su fórmula química. Por lo tanto, una "unidad de LNA", como se usa en el presente documento, tiene la estructura química mostrada en el esquema 1 a continuación:

20

Esquema 1



25 en donde

X se selecciona entre el grupo que consiste en O, S y NR^H, donde R^H es H o alquilo C₁₋₄;

30 Y es (-CH₂)_r, donde r es un número entero de 1-4; y

B es una base nitrogenada.

35 Cuando se hace referencia a la sustitución de una unidad de ADN por su unidad de LNA correspondiente en el contexto de la presente invención, la expresión "unidad de LNA correspondiente" pretende hacer referencia a que la unidad de ADN se ha reemplazado por una unidad de LNA que contiene la misma base nitrogenada que la unidad de ADN que se ha reemplazado, por ejemplo, la unidad de LNA correspondiente de una unidad de ADN que contiene la base nitrogenada A también contiene la base nitrogenada A. La excepción es que cuando una unidad de ADN contiene la base C, la unidad de LNA correspondiente puede contener la base C o la base ^{Me}C, preferentemente ^{Me}C.

40 En el presente documento, la expresión "unidad distinta de LNA" se refiere a un nucleósido diferente de una unidad de LNA, es decir, la expresión "unidad no de LNA" incluye una unidad de LNA, así como una unidad de ARN. Una unidad distinta de LNA preferida es una unidad de ADN.

45 Los términos "unidad", "resto" y "monómero" se usan de manera indistinta en el presente documento.

La expresión "al menos uno" abarca un número entero mayor 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 y así sucesivamente.

50 Los términos "un" y "una", usados en referencia a un nucleótido, un agente, una unidad de LNA, etc., pretenden hacer referencia a uno o más. En particular, la expresión "un componente (tal como un nucleótido, un agente, una unidad de LNA o similar) seleccionado entre el grupo que consiste en..." pretende hacer referencia a que pueden seleccionarse uno o más de los componentes citados. Por lo tanto, las expresiones como "un componente seleccionado entre el

grupo que consiste en 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.

5 La expresión "unidad de tio-LNA" se refiere a una unidad de LNA en la que X en el esquema 1 es S. Una unidad de tio-LNA puede encontrarse tanto en la forma beta D como en la forma alfa L. En general, se prefiere la forma beta D del tio-LNA. La forma beta D y la forma alfa L de una unidad de tio-LNA se muestran en el esquema 3 como los compuestos 3A y 3B, respectivamente.

10 La expresión "unidad de amino-LNA" se refiere a una unidad de LNA en la que X en el esquema 1 es NH o NR^H, donde R^H es hidrógeno o alquilo C₁₋₄. Una unidad de amino-LNA puede encontrarse tanto en la forma beta D como en la forma alfa L. En general, se prefiere la forma beta D del amino-LNA. La forma beta D y la forma alfa L de una unidad de amino-LNA se muestran en el esquema 4 como los compuestos 4A y 4B, respectivamente.

15 La expresión "unidad de oxi-LNA" se refiere a una unidad de LNA en la que X en el esquema 1 es O. Una unidad de oxi-LNA puede encontrarse tanto en la forma beta D como en la forma alfa L. En general, se prefiere la forma beta D del oxi-LNA. La forma beta D y la forma alfa L de una unidad de oxi-LNA se muestran en el esquema 5 como los compuestos 5A y 5B, respectivamente.

20 En el presente contexto, la expresión "alquilo C₁₋₆" pretende indicar una cadena de hidrocarburo saturado lineal o ramificado en donde la cadena más larga tiene de uno a 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 indicar un alquilo C₁₋₆ sustituido en cualquier carbono con una cadena de hidrocarburo.

25 En el presente contexto, la expresión "alquilo C₁₋₄" pretende indicar una cadena de hidrocarburo saturado lineal o ramificado en donde la cadena más larga tiene de uno a 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 indicar un alquilo C₁₋₄ sustituido en cualquier carbono con una cadena de hidrocarburo.

30 Cuando se usa en el presente documento, el término "alcoxi C₁₋₆" pretende indicar alquil C₁₋₆-oxi, tal como metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, sec-butoxi, *terc*-butoxi, pentoxi, isopentoxi, neopentoxi y hexoxi.

35 En el presente contexto, la expresión "alqueno C₂₋₆" pretende hacer referencia a un grupo hidrocarburo lineal o ramificado que tiene de dos a seis átomos de carbono y que contiene uno o más dobles enlaces. Los ejemplos ilustrativos de grupos alqueno C₂₋₆ incluyen alilo, homo-alilo, 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 carbono.

40 En el presente contexto, la expresión "alquino C₂₋₆" pretende hacer referencia a grupos hidrocarburo lineales o ramificados que contienen de dos a seis átomos de carbono y que contienen uno o más triples enlaces. Los ejemplos ilustrativos de grupos alquino C₂₋₆ incluyen acetileno, propinilo, butinilo, pentinilo y hexinilo. La posición de insaturación (el triple enlace) puede encontrarse en cualquier posición a lo largo de la cadena de carbono. Más de un enlace puede estar insaturado, de tal forma que el "alquino C₂₋₆" es una diína o una enediína, como es sabido por las personas expertas en la materia.

45 Como se usa en el presente documento, "hibridación" significa unión de hidrógeno, que puede ser de Watson-Crick, Hoogsteen, unión de hidrógeno de Hoogsteen inversa, etc., entre bases de nucleósidos o nucleótidos complementarias. Las cuatro nucleobases comúnmente encontradas 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, T se reemplaza por uracilo (U), que se empareja con A. Los grupos químicos en las nucleobases que participan en la formación de dúplex convencional constituyen la interfaz de Watson-Crick. Hoogsteen demostró un par de años después que las nucleobases de purina (G y A), además de su interfaz de Watson-Crick tienen una interfaz de Hoogsteen que puede reconocerse desde el exterior de un dúplex y usarse para unirse a oligonucleótidos de pirimidina mediante enlaces de hidrógeno, formando de este modo una estructura de triple hélice.

55 En el contexto de la presente invención, "complementario" se refiere a la capacidad de emparejamiento preciso entre dos secuencias de nucleótidos entre sí. Por ejemplo, en caso de que un nucleótido en una posición concreta de un oligonucleótido sea capaz de formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido en la posición correspondiente de una molécula de ADN o ARN, se considera que el oligonucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí en esa posición. Las hebras de ADN o ARN se consideran complementarias entre sí cuando un número suficiente de nucleótidos en el oligonucleótido puede formar enlaces de hidrógeno con los nucleótidos correspondientes en el ADN o ARN diana para permitir la formación de un dúplex estable. Para que sea estable *in vitro* o *in vivo*, la secuencia de un oligonucleótido no necesita ser 100 % complementaria a su microARN diana. Los términos "complementario" e "hibridable de manera específica" implican, por lo tanto, que el oligonucleótido se une con una fuerza y especificidad suficiente a la molécula diana para proporcionar la interferencia deseada con la función normal de la diana, dejando no afectada la función de los ARN no diana.

En un ejemplo preferido, el oligonucleótido de la invención es un 100 % complementario a una secuencia de microARN humana, tal como una de las secuencias de microARN citadas en el presente documento.

5 El oligonucleótido de la invención comprende una secuencia contigua que es 100 % complementaria a la región de semilla de la secuencia de microARN humana.

10 Los microARN son ARN cortos no codificantes procedentes de genes endógenos que actúan como reguladores postranscripcionales de la expresión génica. Se procesan a partir de precursores de tipo horquilla más largos (de aproximadamente 70-80 nt) denominados pre-miARN por la enzima RNasa III, Dicer. Los microARN se ensamblan en complejos de ribonucleoproteínas denominados miRNP y reconocen sus sitios diana mediante complementariedad antisentido, mediando de este modo la regulación negativa de sus genes diana. Una complementariedad perfecta o prácticamente perfecta entre el miARN y su sitio diana da como resultado la escisión del ARNm diana, mientras que una complementariedad limitada entre el microARN y el sitio diana da como resultado una inhibición traduccional del gen diana.

15 El término "microARN" o "miARN", en el contexto de la presente invención, significa un oligonucleótido de ARN que tiene entre 18 a 25 nucleótidos de longitud. En términos funcionales, los miARN son normalmente moléculas de ARN endógenas reguladoras.

20 Las expresiones "microARN diana" o "miARN diana" se refieren a un microARN con un papel biológico en enfermedades humanas, por ejemplo, un miARN oncogénico regulado positivamente o un miARN supresor tumoral en un cáncer, siendo por lo tanto una diana para intervención terapéutica de la enfermedad en cuestión.

25 Las expresiones "gen diana" o "ARNm diana" se refieren a dianas de ARNm reguladoras de los miARN, en las que dicho "gen diana" o "ARNm diana" está regulado postranscripcionalmente por el microARN, basándose en una complementariedad perfecta o prácticamente perfecta entre el miARN y su sitio diana da como resultado la escisión del ARNm diana; o una complementariedad limitada, normalmente conferida a la complementariedad entre la denominada secuencia de semilla (nucleótidos 2-7 del miARN) y el sitio diana, dando como resultado la inhibición traduccional del ARNm diana.

30 En el contexto de la presente invención, el oligonucleótido es monocatenario, refiriéndose a la situación donde el oligonucleótido se encuentra en ausencia de un oligonucleótido complementario, es decir, no es un complejo de oligonucleótido bicatenario, tal como un ARNpi. En una realización, la composición de acuerdo con la invención no comprende un oligonucleótido adicional que tiene una región de complementariedad con el oligonucleótido monocatenario de cinco o más nucleobases consecutivas, tal como ocho o más o 12 o más nucleobases consecutivas. Se considera que el oligonucleótido adicional no está unido covalentemente al oligonucleótido monocatenario.

Modificación de nucleótidos en las posiciones 3 a 8, contando desde el extremo 3'

40 En las siguientes realizaciones que se refieren a la modificación de nucleótidos en las posiciones 3 a 8, contando desde el extremo 3', las unidades de LNA pueden reemplazarse por otros análogos de nucleótido, tales como los citados en el presente documento. "X" puede, por lo tanto, seleccionarse entre el grupo que consiste en unidad de 2'-O-alkuil-ARN, unidad de 2'-OMe-ARN, unidad de 2'-amino-ADN, unidad de 2'-fluoro-ADN, unidad de LNA, unidad de PNA, unidad de HNA, unidad de INA. "x" es preferentemente ADN o ARN, más preferentemente ADN.

45 En una realización interesante de la invención, los oligonucleótidos de la invención se modifican en las posiciones 3 a 8, contando desde el extremo 3'. El diseño de esta secuencia puede definirse por el número de unidades distintas de LNA presentes o por el número de unidades de LNA presentes. En una realización preferida de lo anterior, al menos uno, tal como uno, de los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', es una unidad distinta de LNA. En otra realización, al menos dos, tal como dos, de los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', son unidades distintas de LNA. En otra realización más, al menos tres, tal como tres, de los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', son unidades distintas de LNA. En otra realización más, al menos cuatro, tal como cuatro, de los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', son unidades distintas de LNA. En una realización adicional, al menos cinco, tal como cinco, de los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', son unidades distintas de LNA. En una realización adicional más, los seis nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', son unidades distintas de LNA. En una realización preferida, dicha unidad distinta de LNA es una unidad de ADN.

60 Definido de un modo alternativo, en una realización preferida, el oligonucleótido de acuerdo con la invención comprende al menos una unidad de LNA en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. En una realización del mismo, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención comprende una unidad de LNA en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. El patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', puede seleccionarse entre el grupo que consiste en Xxxxxx, xXxxxx, xxXxxx, xxxXxx, xxxxXx y xxxxxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.

65

En otra realización, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención comprende al menos dos unidades de LNA en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. En una realización del mismo, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención comprende dos unidades de LNA en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. El patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', puede seleccionarse entre el grupo que consiste en XXxxxx, XxXxxx, XxxXxx, XxxxXx, XxxxxX, xXXxxx, xXxXxx, xXxxXx, xXxxxX, xxXXxx, xxXxXx, xxXxxX, xxxXXx, xxxXxX y xxxxXX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización preferida, el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en XxXxxx, XxxXxx, XxxxXx, XxxxxX, xXxXxx, xXxxXx, xXxxxX, xxXXxx, xxXxXx, xxXxxX y xxxXxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización más preferida, el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xXxXxx, xXxxXx, xXxxxX, xxXxXx, xxXxxX y xxxXxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización aún más preferida, el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xXxXxx, xXxxXx y xxXxXx, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización más preferida, el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', es xXxXxx, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.

En otra realización más, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención comprende al menos tres unidades de LNA en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. En una realización del mismo, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención comprende tres unidades de LNA en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. El patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', puede seleccionarse entre el grupo que consiste en XXXxxx, xXXxxx, xxXXXx, xxxXXX, XXxXxx, XXxxXx, XXxxxX, xXXxXx, xXXxxX, xxXXxX, XxXXxx, XxxxXX, xLxXXx, xXxxXX, xxXxXX, xXxXxX y XxXxXx, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización preferida, el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en XXxXxx, XXxxXx, XXxxxX, xXXxXx, xXXxxX, xxXXxX, XxXXxx, XxxxXX, XxxXXx, XxxxXX, xXxXXx, xXxxXX, xxXxXX, xXxXxX y XxXxXx, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización aún más preferida, el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xXXxXx, xXXxxX, xxXXxX, xXxXXx, xXxxXX, xxXxXX y xXxXxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización aún más preferida, el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', es xXxXxX o XxXxXx, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización más preferida, el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', es xXxXxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.

En una realización adicional, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención comprende al menos cuatro unidades de LNA en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. En una realización del mismo, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención comprende cuatro unidades de LNA en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. El patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', puede seleccionarse entre el grupo que consiste en xxXXXX, xXxXXX, xXxxXX, xXxxXx, xXxxxX, XxxXXX, XxXxXX, XxXXxX, XxXXXx, XXxxXX, XXxXxX, XXXxxX, XXXxXx y XXXXxx, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.

En una realización adicional más, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención comprende al menos cinco unidades de LNA en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. En una realización del mismo, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención comprende cinco unidades de LNA en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. El patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', puede seleccionarse entre el grupo que consiste en xxxXXX, XxXXXX, XXxXXX, XXXxXX, XXXXxX y XXXXXx, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.

Preferentemente, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención comprende una o dos unidades de LNA en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'. Esto se considera ventajoso para la estabilidad de la hélice A formada por el dúplex de oligo:microARN, un dúplex que se asemeja en su estructura a un dúplex de ARN:ARN.

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

Variación de la longitud de los oligonucleótidos

La longitud de los oligonucleótidos de la invención no coincide necesariamente de manera exacta con la longitud de los microARN diana. Por consiguiente, la longitud de los oligonucleótidos de la invención puede variar. De hecho, se considera ventajoso tener oligonucleótidos cortos, tal como de entre 10 - 17 o 10 - 16 nucleobases.

El oligonucleótido de acuerdo con la presente invención tiene una longitud de entre 8 a 17 nucleótidos, tal como una longitud de 10 - 17, tal como de 12 a 17 nucleótidos, tal como una longitud de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 nucleótidos,

más preferentemente, una longitud de 10 a 16, tal como entre 12 a 16 nucleótidos, tal como una longitud de 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleótidos.

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

5 El patrón de sustitución para los nucleótidos desde la posición 11, contando desde el extremo 3', hasta el extremo 5' puede incluir unidades de análogos de nucleótidos (tales como LNA) o no incluirlas. En una realización preferida, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención comprende al menos una unidad de análogo de nucleótido (tal como LNA), tal como una unidad de análogo de nucleótido, desde la posición 11, contando desde el extremo 3', hasta el extremo 5'. En otra realización preferida, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención comprende al menos dos unidades de análogo de nucleótido, tal como unidades de LNA, tal como dos unidades de análogo de nucleótido, desde la posición 11, contando desde el extremo 3', hasta el extremo 5'.

15 En las siguientes realizaciones, que se refieren a la modificación de nucleótidos en las nucleobases desde la posición 11 hasta el extremo 5' del oligonucleótido, las unidades de LNA pueden reemplazarse por otros análogos de nucleótido, tales como los citados en el presente documento. "X" puede, por lo tanto, seleccionarse entre el grupo que consiste en unidad de 2'-O-alkil-ARN, unidad de 2'-OME-ARN, unidad de 2'-amino-ADN, unidad de 2'-fluoro-ADN, unidad de LNA, unidad de PNA, unidad de HNA, unidad de INA. "x" es preferentemente ADN o ARN, más preferentemente ADN.

20 En una realización, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención tiene el patrón de sustitución a continuación, que se repite desde el nucleótido once, contando desde el extremo 3', hasta el extremo 5': xXxX o XxXx, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En otra realización, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención tiene el patrón de sustitución a continuación, que se repite desde el nucleótido once, contando desde el extremo 3', hasta el extremo 5': XxxXxx, xXxxXx o xxXxxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En otra realización más, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención tiene el patrón de sustitución a continuación, que se repite desde el nucleótido once, contando desde el extremo 3', hasta el extremo 5': XxxxXxxx, xXxxxXxx, xxXxxxXx o xxxXxxxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.

30 El patrón específico de sustitución para los nucleótidos desde la posición 11, contando desde el extremo 3', hasta el extremo 5', depende del número de nucleótidos en los oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención. En una realización preferida, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención contiene 12 nucleótidos y el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 12, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xX y Xx, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización más preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 12, contando desde el extremo 3', es xX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. Como alternativa, hay dos unidades de LNA presentes en las posiciones 11 a 12, contando desde el extremo 3', es decir, el patrón de sustitución es xx.

40 En otra realización preferida, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención contiene 13 nucleótidos y el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 13, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX y XXX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización más preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 13, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xXx, xxX y xXX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización más preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 13, contando desde el extremo 3', es xxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. Como alternativa, hay dos unidades de LNA presentes en las posiciones 11 a 13, contando desde el extremo 3', es decir, el patrón de sustitución es xxx.

50 En otra realización preferida más, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención contiene 14 nucleótidos y el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 14, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en Xxxx, xXxx, xxXx, xxxX, XXxx, XxXx, XxxX, xXXx, xXxX y xxXX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 14, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xXxx, xxXx, xxxX, xXxX y xxXX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización más preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 14, contando desde el extremo 3', es xXxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. Como alternativa, hay dos unidades de LNA presentes en las posiciones 11 a 14, contando desde el extremo 3', es decir, el patrón de sustitución es xxxx.

60 En una realización preferida adicional, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención contiene 15 nucleótidos y el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 15, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en Xxxxx, xXxxx, xxXxx, xxxXx, xxxxx, XXxxx, XxXxx, XxxXx, XxxxX, xXXxx, xXxXx, xXxxX, xxXXx, xxXxX, xxxXX y XxXxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 15, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xxXxx, XxXxx, XxxXx, xXxxX, xXxxX y xxXxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización más preferida del mismo, el patrón de sustitución para las

posiciones 11 a 15, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xxXxx, xXxXx, xXxxxX y xxXxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización aún más preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 15, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xXxxX y xxXxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización más preferida, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 15, contando desde el extremo 3', es xxXxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. Como alternativa, hay dos unidades de LNA presentes en las posiciones 11 a 15, contando desde el extremo 3', es decir, el patrón de sustitución es xxxxx.

En otra realización preferida adicional, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención contiene 16 nucleótidos y el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 16, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en Xxxxxx, xXxxxx, xxXxxx, xxxXxx, xxxxxX, XXxxxx, XxXxxx, XxxXxx, XxxxXx, XxxxxX, xXxxxx, xXxXxx, xXxxXx, xXxxxX, xxXXxx, xxXxXx, xxXxxX, xxxXXx, xxxXxX, xxxxxX, XXxxxx, XXxXxx, XXxxXx, XXxxxX, XxXXxx, XxXxXx, XxXxxX, XxxXXx, XxxXXx, XxxxXX, xXXxx, xXxxXx, xXxxXx, xXxxXX, xxXXxx, xxXXXX y xxxXXX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 16, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en XxxXxx, xXxXxx, xXxxXx, xxXxXx, xxXxxX, XxXxXx, XxXxxX, XxxXxX, xXxXxx, xXxxXX y xxXxxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización aún más preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 16, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xxXxxX, xXxXxx, xXxxXX y xxXxxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización aún más preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 16, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xxXxxX y xXxXxx, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. En una realización más preferida del mismo, el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 16, contando desde el extremo 3', es xxXxxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. Como alternativa, hay dos unidades de LNA presentes en las posiciones 11 a 16, contando desde el extremo 3', es decir, el patrón de sustitución es xxxxxx.

En una realización preferida de la invención, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención contiene una unidad de LNA en el extremo 5'. En otra realización preferida, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención contiene una unidad de LNA en las dos primeras posiciones, contando desde el extremo 5'.

En una realización particularmente preferida, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención contiene 13 nucleótidos y el patrón de sustitución, partiendo desde el extremo 3', es XXxXxXxxXXxxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. La secuencia preferida para esta realización, partiendo desde el extremo 3', es CCtCaCacTGtA, en donde una letra mayúscula indica una base nitrogenada en una unidad de LNA y una letra minúscula indica una base nitrogenada en una unidad distinta de LNA.

En otra realización particularmente preferida, el oligonucleótido de acuerdo con la presente invención contiene 15 nucleótidos y el patrón de sustitución, partiendo desde el extremo 3', es XXxXxXxxXXxxXxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA. La secuencia preferida para esta realización, partiendo desde el extremo 3', es CCTCaCacTGtAcC, en donde una letra mayúscula indica una base nitrogenada en una unidad de LNA y una letra minúscula indica una base nitrogenada en una unidad distinta de LNA.

Modificación del grupo de enlace internucleósido

El oligonucleótido de la invención se modifica en su estructura de grupo de enlace internucleósido, es decir, el oligonucleótido modificado comprende un grupo de enlace internucleósido que es diferente de fosfato.

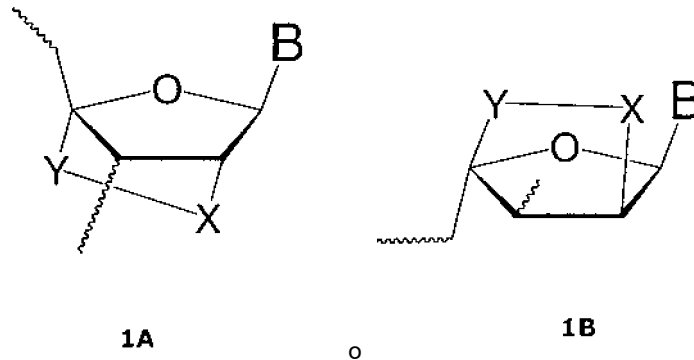
Los ejemplos específicos de grupos de enlace internucleósido que difieren de fosfato (-O-P(O)₂-O-) incluyen -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O)₂-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S-, -O-P(O,S)-S-, -S-P(O)₂-S-, -O-PO(R^H)-O-, O-PO(OCH₃)-O-, -O-PO(NR^H)-O-, -O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-, -O-PO(BH₃)-O-, -O-PO(NHR^H)-O-,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

El grupo de enlace internucleósido de los oligonucleótidos monocatenarios de la invención son grupos fosforotioato (-O-P(O,S)-O-). Todos los grupos de enlace internucleósido de los oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención son fosforotioato.

La unidad de LNA

En una realización preferida, la unidad de LNA tiene la estructura química general mostrada en el esquema 1 a continuación:

Esquema 1

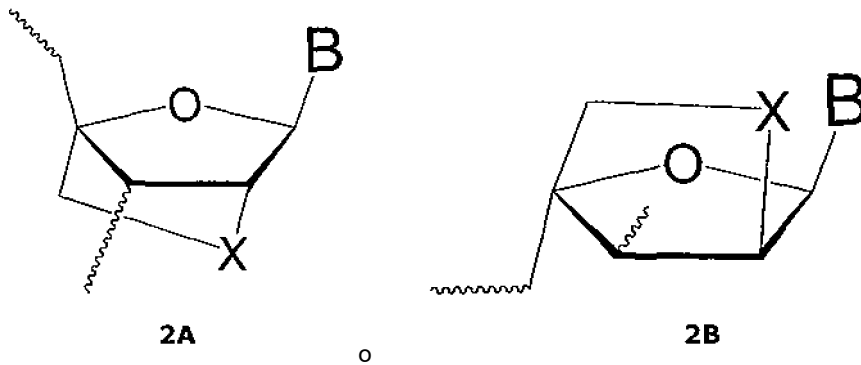


5 en donde

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

10 En una realización preferida de la invención, r es 1 o 2, en particular 1, es decir, la unidad de LNA preferida tiene la estructura química mostrada en el esquema 2 a continuación:

Esquema 2

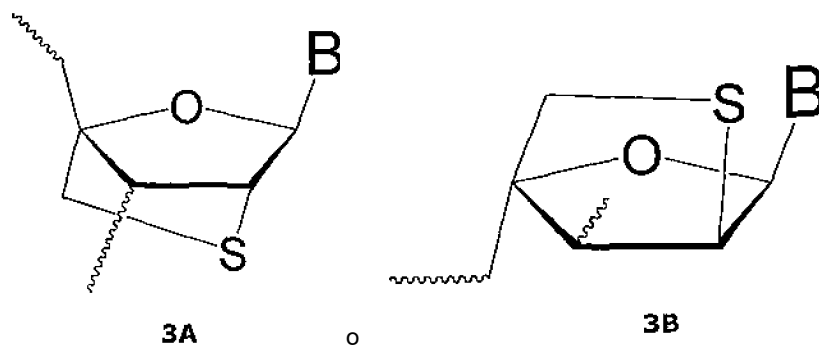


en donde X y B son como se han definido anteriormente.

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

25 Por lo tanto, la unidad de tio-LNA puede tener la estructura química mostrada en el esquema 3 a continuación:

Esquema 3



trifosfato, incluyendo trifosfato protegido, tritiofosfato, incluyendo tritiofosfato protegido, donde Prot es un grupo protector para -OH, -SH y -NH(R^H) y R^H es hidrógeno o alquilo C₁₋₆.

Los ejemplos de grupos protectores de fosfato incluyen S-acetiltioetilo (SATE) y S-pivaloitioetilo (t-butil-SATE).

Otros ejemplos adicionales de grupos terminales incluyen intercaladores de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, ligandos, carboxi, sulfono, hidroximetilo, Prot-O-CH₂-, Act-O-CH₂-, aminometilo, Prot-N(R^H)-CH₂-, Act-N(R^H)-CH₂-, carboximetilo, sulfonometilo, donde Prot es un grupo protector para -OH, -SH y -NH(R^H) y Act es un grupo activador para -OH, -SH y -NH(R^H) y R^H es hidrógeno o alquilo C₁₋₆.

Los ejemplos de grupos protectores para grupos -OH y -SH incluyen tritilo sustituido, tal como 4,4'-dimetoxitritiloxi (DMT), 4-monometoxitritiloxi (MMT); tritiloxi, 9-(9-fenil)xanteniloxi (pixilo) opcionalmente sustituido, metoxitetrahidropiranioloxi (mthp) opcionalmente sustituido; sililoxi, tal como trimetilsililoxi (TMS), triisopropilsililoxi (TIPS), *tert*-butildimetilsililoxi (TBDMS), trietilsililoxi, fenildimetilsililoxi; *tert*-butiléteres; acetales (que incluyen dos grupos hidroxilo); aciloxi, tal como acetilo o acetilos sustituidos con halógeno, por ejemplo, cloroacetiloxi o fluoroacetiloxi, isobutiriloxi, pivaloiloxi, benzoiloxi y benzoílos sustituidos, metoximetiloxi (MOM), ésteres de bencilo o ésteres de bencilo sustituidos, tales como 2,6-diclorobenciloxi (2,6-Cl₂Bzl). Por otra parte, cuando Z o Z* es hidroxilo, pueden protegerse mediante unión a un soporte sólido, opcionalmente a través de un enlazador.

Los ejemplos de grupos protectores de amina incluyen fluorenilmetoxicarbonilamino (Fmol), *tert*-butoxicarbonilamino (BOC), trifluoroacetilamino, aliloxicarbonilamino (alloc, AOC), Z-benciloxicarbonilamino (Cbz), benciloxicarbonilamino sustituido, tal como 2-clorobenciloxicarbonilamino (2-ClZ), monometoxitritilamino (MMT), dimetoxitritilamino (DMT), ftaloilamino y 9-(9-fenil)xantenilamino (pixilo).

En el presente contexto, el término "fosforamidita" significa un grupo de la fórmula -P(OR^x)-N(R^y)₂, en donde R^x indica un grupo alquilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, metilo, 2-cianoetilo o bencilo y cada grupo de R^y indica grupos alquilo opcionalmente sustituidos, por ejemplo, etilo o isopropilo o el grupo -N(R^y)₂ forma un grupo morfolino (-N(CH₂CH₂)₂O). R^x indica preferentemente 2-cianoetilo y los dos R^y son preferentemente idénticos e indican isopropilo. Por consiguiente, una fosforamidita particularmente preferida es N,N-diisopropil-O-(2-cianoetil)fosforamidita.

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

Diseños para microARN específicos

La tabla a continuación proporciona ejemplos de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención, tales como aquellos usados en composiciones farmacéuticas, en comparación con las moléculas de la técnica anterior.

diana: hsa-miR-122a MIMAT0000421		SEQ ID
uggagugugacaaugguguuuugu		SEQ ID NO 535
explorada en la línea celular HUH-7 que expresa miR-122		
n.º de oligo, microARN diana, secuencia de oligo	Diseño	
3962: miR-1225'-ACAAacaccattgtcacacTCCA-3'	Complemento completo, hueco	SEQ ID NO 536
3965: miR-122 5'-acaacACCATTGTcacactcca-3'	Complemento completo, bloque	SEQ ID NO 537
3972: miR-1225'-acAaaCacCatTgtCacActCca-3'	Complemento completo, LNA_3	SEQ ID NO 538
3549 (3649):miR-122 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3'	Nuevo diseño	SEQ ID NO 539
3975: miR-122 5'-CcAtTGTcaCACTCC-3'	Nuevo diseño mejorado	SEQ ID NO 540
3975': miR-122 5'-ATTGTcACACTCC-3'	ED - 13mero	SEQ ID NO 541
3975": miR-122 5'-TGTcACACTCC-3'	ED - 11mero	SEQ ID NO 542
3549' (3649):miR-122 5' GG ^M AT ^M MT ^M GTG ^M AM ^M GAM ^M GT ^M GG-3'	Nuevo diseño - 2'MOE	SEQ ID NO 543
3549" (3649):miR-122 5' GG ^F AT ^F T ^F GTG ^F A ^F GA ^F GT ^F GG-3'	Nuevo diseño - 2'Fluoro	SEQ ID NO 544
diana: hsa-miR-19b MIMAT0000074		
ugugcaaaucgaacgcaaacuga		SEQ ID NO 545
explorada en la línea celular HeLa que expresa miR-19b		
n.º de oligo, microARN diana, secuencia de oligo	Diseño	
3963: miR-19b 5'-TGAGttttgcatggatttgGAGA-3'	Complemento completo, hueco	SEQ ID NO 546
3967: miR-19b 5'-tcagttTTGGATGGattgcaca-3'	Complemento completo, bloque	SEQ ID NO 547
3973: miR-19b 5'-tcAgtTttGcaTggAttTgcAca-3'	Complemento completo, LNA_3	SEQ ID NO 548

3560: miR-19b 5'-TgCatGGatTtGcAC-3'	Nuevo diseño	SEQ ID NO 549
3976: miR-19b 5'-TgCaTGGatTTGcAC-3'	Nuevo diseño mejorado	SEQ ID NO 550
3976': miR-19b 5'-GaTGGaTTTgCAG-3'	ED - 13mero	SEQ ID NO 551
3976": miR-19b 5'-TGGaTTTgCAG-3'	ED - 11mero	SEQ ID NO 552
3560': miR-19b 5'TG ^M GA ^M TM ^M GG ^M MT ^M TT ^M GG ^M AG-3'	Nuevo diseño - 2'MOE	SEQ ID NO 553
3560": miR-19b 5'-TG ^F CA ^F T ^F GGA ^F T ^F TT ^F GC ^F AC-3'	Nuevo diseño - 2'MOE	SEQ ID NO 554
diana: hsa-miR-155 MIMAT0000646		
uuauugcuaaucgugauagggg		SEQ ID NO 555
explorada en la línea celular 518A2 que expresa miR-155		
n.º de oligo, microARN diana, secuencia de oligo	Diseño	
3964: miR-155 5'-CCGGtatcacgattagcaTTAA-3'	Complemento completo, hueco	SEQ ID NO 556
3968: miR-155 5'-cccctaTCACGATTagcattaa-3'	Complemento completo, bloque	SEQ ID NO 557
3974: miR-1555'-cCccTatCacGatTagCatTaa-3'	Complemento completo, LNA 3	SEQ ID NO 558
3758: miR-155 5'-TcAcgATtaGcAtTA-3'	Nuevo diseño	SEQ ID NO 559
3818: miR-155 5'-TcAcGATtaGCAtTA-3'	Nuevo diseño mejorado	SEQ ID NO 560
3818': miR-155 5'-ACGATtAGGAtTA-3'	ED - 13mero	SEQ ID NO 561
3818": miR-155 5'-GATtAGGAtTA-3'	ED - 11mero	SEQ ID NO 562
3758': miR-155 5'-TG ^M AG ^M G ^M ATTA ^M GG ^M AT ^M TA-3'	Nuevo diseño - 2'MOE	SEQ ID NO 563
3758": miR-155 5'-TC ^F AC ^F G ^F ATT ^F A ^F GC ^F AT ^F TA-3'	Nuevo diseño - 2'Fluoro	SEQ ID NO 564
diana: hsa-miR-21 MIMAT0000076		
uagcuuauacagacugauguuga		SEQ ID NO 565
miR-21 5'-TCAAcatcagctgataaGCTA -3'	Complemento completo, hueco	SEQ ID NO 566
miR-21 5'-tcaacaTCAGTCTGataagcta -3'	Complemento completo, bloque	SEQ ID NO 567
miR-21 5'- tcAtcAtcAgtCtgAtaAGcTta -3'	Complemento completo, LNA 3	SEQ ID NO 568
miR-21 5' - TcAgtGTgaTaAgGT -3'	Nuevo diseño	SEQ ID NO 569
miR-21 5'- TcAgTCTgaTAAgCT -3'-	Nuevo diseño mejorado	SEQ ID NO 570
miR-21 5'- AGTCTgATAAgCT -3'-	ED - 13mero	SEQ ID NO 571
miR-21 5'- TCTgAtAAGCT-3'-	ED - 11mero	SEQ ID NO 572
miR-21 5'- TC ^M AG ^M T ^M CTG ^M A ^M TA ^M AG ^M CT - 3'	Nuevo diseño - 2'MOE	SEQ ID NO 573
miR-21 5'-TC ^F AG ^F T ^F CTG ^F A ^F TA ^F AG ^F CT-3'	Nuevo diseño - 2'Fluoro	SEQ ID NO 574
diana: hsa-miR-375 MIMAT0000728		
uuuguucguucggcucgcguga		SEQ ID NO 575
miR- 375 5'-TCTCgctgcccgttcgttCTTT -3'	Complemento completo, hueco	SEQ ID NO 576
miR- 375 5'-tctcgcGTGCCGTTcgttcttt -3'	Complemento completo, bloque	SEQ ID NO 577
miR- 375 5'-tcTcgCgtGccGttCgtTctTt -3'	Complemento completo, LNA 3	SEQ ID NO 578
miR- 375 5'-GtGccGTtcGtTcTT 3'	Nuevo diseño	SEQ ID NO 579
miR- 375 5'-GtGcC6TtcGTTcTT 3'	Nuevo diseño mejorado	SEQ ID NO 580
miR- 375 5'-GCCGTtCgTTCTT 3'	ED - 13mero	SEQ ID NO 581
miR- 375 5'-CGTTcGTTCTT 3'	ED - 11mero	SEQ ID NO 582
miR- 375 5'-GT ^M G ^M C ^M G ^M TT ^M C ^M GT ^M TC ^M TT 3'	Nuevo diseño - 2'MOE	SEQ ID NO 583
miR- 375 5'-GT ^F GC ^F C ^F G ^F TT ^F C ^F GT ^F TC ^F TT 3'	Nuevo diseño - 2'Fluoro	SEQ ID NO 584

Las letras en mayúsculas sin un superíndice M o F, se refieren a unidades de LNA. Letras en minúscula = ADN, salvo para minúsculas en negrita = ARN. Las citosinas de LNA pueden estar opcionalmente metiladas). Las letras mayúsculas seguidas de un superíndice M se refieren a unidades de 2'OME ARN, las letras en mayúscula seguidas de un superíndice F se refieren a unidades de 2'-fluoro ADN, las letras en minúscula se refieren a ADN. Los oligos anteriores pueden, en una realización, ser completamente de fosforotioato, pero pueden usarse otros enlaces de nucleobases como se describen en el presente documento. En una realización, los enlaces de nucleobases son todos de fosfodiéster. Se considera que para su uso dentro del cerebro/médula espinal, es preferible usar enlaces fosfodiéster, por ejemplo, para el uso de los antimir que se dirigen a miR21.

5

10

La tabla 2 proporciona ejemplos no limitantes de diseños de oligonucleótidos contra secuencias conocidas de microARN humanos en la base de datos de microARN miRBase, versión 8.1.

Los oligonucleótidos de acuerdo con la invención, tales como aquellos divulgados en la tabla 2 pueden, en una realización, tener una secuencia de nucleobases 5' - 3' seleccionada entre el grupo que consiste en:

- LdlddLddldldIL (Nuevo diseño)
 - LdidLLddiLLdIL (Nuevo diseño mejorado)
 - LMLMMLMMLMMLL (Nuevo diseño - 2'MOE)
 - LMLMLLMLLMLL (Nuevo diseño mejorado-2'MOE)
 - LFLFLLFFLFLFLL (Nuevo diseño - 2' Fluoro)
 - LFLFLLFFLLFLL (Nuevo diseño mejorado-2' Fluoro)
 - Lddiddld(d)(d)(L)(d)(d)(L)(d) 'Cada tres'
 - lddddldd(L)(d)(d)(L)(d)(d)(L) 'Cada tres'
 - ddldldld(d)(L)(d)(d)(L)(d)(d) 'Cada tres'
 - LMMMLMML(M)(M)(L)(M)(M)(L)(M) 'Cada tres'
 - MLMMLMML(M)(L)(M)(M)(L)(M)(M)(L) 'Cada tres'
 - MMLMMLMML(M)(L)(M)(M)(L)(M)(M) 'Cada tres'
 - LFFLFFLFFL(F)(F)(L)(F)(F)(L)(F) 'Cada tres'
 - FLFFLFFLFF(L)(F)(F)(L)(F)(F)(L) 'Cada tres'
 - FFLFFLFFL(F)(L)(F)(F)(L)(F)(F) 'Cada tres'
 - ldldldld(d)(L)(d)(L)(d)(L)(d) 'Cada dos'
 - Ldldldld(d)(L)(d)(L)(d)(L)(d) 'Cada dos'
 - MLMLMLML(M)(L)(M)(L)(M)(L)(M) 'Cada dos'
 - LMLMLML(M)(L)(M)(L)(M)(L)(M)(L) 'Cada dos'
 - FLFLFLFL(F)(L)(F)(L)(F)(L)(F) 'Cada dos'
 - LFLFLFL(F)(L)(F)(L)(F)(L)(F)(L) 'Cada dos'
- En donde L = unidad de LNA, d= unidades de ADN, M = 2'MOE ARN, F = 2'Fluoro y los restos entre paréntesis son opcionales

Conjugados

La invención también proporciona conjugados que comprenden el oligonucleótido de acuerdo con la invención.

En una realización de la invención, el compuesto oligomérico está unido a ligandos/conjugados, que pueden usarse, por ejemplo, para aumentar la captación celular de oligonucleótidos antisentido. Esta conjugación puede producirse en las posiciones terminales 5'/3'-OH pero los ligandos también pueden producirse en los azúcares y/o las bases. En particular, el factor de crecimiento al que puede conjugarse el oligonucleótido antisentido, puede comprender transferrina o folato. Pueden prepararse complejos de transferrina-poliilisina-oligonucleótido o complejos de folato-poliilisina-oligonucleótido para su captación por células que expresan altos niveles de receptor de transferrina o folato. Otros ejemplos de conjugados/ligandos son restos de colesterol, intercaladores en dúplex, tales como acridina, poli-L-lisina, "remate terminal" con uno o más grupos de enlace resistentes a nucleasas, tales como fosforomonotioato y similares. La invención también proporciona un conjugado que comprende el compuesto de acuerdo con la invención como se describe en el presente documento y al menos un resto no nucleotídico o no polinucleotídico unido covalentemente a dicho compuesto. Por lo tanto, en una realización donde el compuesto de la invención consiste en un ácido nucleico específico, como se divulga en el presente documento, el compuesto también puede comprender al menos un resto no nucleotídico o no polinucleotídico (por ejemplo, no comprende uno o más nucleótidos o análogos de nucleótidos) unido covalentemente a dicho compuesto. El resto distinto de una nucleobase puede ser o comprender, por ejemplo, un estero, tal como colesterol.

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

Terapia y composiciones farmacéuticas

Como se explicó inicialmente, los oligonucleótidos de la invención constituyen fármacos adecuados con propiedades mejoradas. El diseño de un fármaco potente y seguro requiere el afinado de varios parámetros, tales como la afinidad/especificidad, la estabilidad en fluidos biológicos, la captación celular, el modo de acción, las propiedades farmacocinéticas y la toxicidad.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido de acuerdo con la invención y un diluyente, transportador o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, dicho transportador es suero salino o suero salino tamponado.

En un aspecto adicional más, la presente invención se refiere a un oligonucleótido de acuerdo con la presente invención, para su uso como medicamento.

Tal como se entenderá, la dosis depende de la gravedad y la sensibilidad de la patología que se vaya a tratar y del transcurso del tratamiento, que dura desde varios días hasta varios meses o hasta que se logra una cura o disminución de la patología. Las pautas posológicas óptimas pueden calcularse a partir de medidas 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 CE50 que se observa que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosis es de 0,01 µg a 1 g por kg de peso corporal y puede administrarse una o más veces a diario, semanalmente, mensualmente o anualmente o incluso cada 2 a 10 años o mediante infusión continua durante horas hasta varios meses. Pueden estimarse las tasas de repetición para la dosis basándose en los tiempos de residencia y las concentraciones del fármaco medidos en los fluidos o tejidos corporales. Tras cada tratamiento con éxito, puede ser deseable que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición de la patología.

Composiciones farmacéuticas

Como se ha indicado anteriormente, la invención también se refiere a una composición farmacéutica, que comprende al menos un oligonucleótido de la invención como un principio activo. Ha de entenderse que la composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende opcionalmente un transportador 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 usarse "tal cual" o en forma de una variedad de sales farmacéuticamente aceptables. Como se usa en el presente documento, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales que conservan la actividad biológica deseada de los oligonucleótidos identificados en el presente documento y muestran efectos toxicológicos no deseados mínimos. Los ejemplos no limitantes de dichas sales pueden formarse con un aminoácido orgánico y sales 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 a partir de amoníaco, *N,N*-dibenciletiletilen-diamina, *D*-glucosamina, tetraetilamonio o etilendiamina.

En una realización de la invención, el oligonucleótido puede encontrarse en forma de un profármaco. Los oligonucleótidos son, por sí mismos, iones cargados negativamente. Debido a la naturaleza lipófila de las membranas celulares, se reduce la captación celular de los oligonucleótidos en comparación con los equivalentes neutros o lipófilos. Esta "impedancia" de polaridad puede evitarse usando la estrategia de profármacos (véase, por ejemplo, Crooke, R. M. (1998) en Crooke, S. T. *Antisense research and Application*. Springer-Verlag, Berlín, Alemania, vol. 131, págs. 103-140). Los agentes de unión y los adyuvantes farmacéuticamente aceptables pueden comprender parte del fármaco formulado.

Los ejemplos de métodos de suministro para el suministro de los agentes terapéuticos descritos en el presente documento, así como los detalles de las formulaciones y sales farmacéuticas se describen bien en otras partes, por ejemplo, en las Solicitudes Provisionales de los Estados Unidos 60/838.710 y 60/788.995 y la solicitud danesa, PA 2006 00615.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero sin limitación, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una variedad de componentes que incluyen, pero sin limitación, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes. El suministro de fármaco al tejido tumoral puede mejorarse mediante suministro mediado por transportador, incluyendo, pero sin limitación, liposomas catiónicos, ciclodextrinas, derivados de porfirina, dendrímeros de cadena ramificada, polímeros de polietilenimina, nanopartículas y microesferas (Dass CR. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54(1):3-27). Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse de manera conveniente en una forma farmacéutica unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de asociar los principios activos con los transportadores o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima los principios activos con transportadores líquidos o transportadores sólidos finamente divididos o ambos y después, si es necesario, dando forma al producto. Las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de muchas formas farmacéuticas posibles, tales como, pero sin limitación, comprimidos, 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 contener además sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes. Los compuestos de la invención también pueden conjugarse a sustancias farmacológicas activas, por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, un fármaco de sulfa, un agente antidiabético, un agente antibacteriano o un antibiótico.

En otra realización, las composiciones de la invención pueden contener uno o más compuestos oligonucleotídicos, dirigidos a un primer microARN y uno o más compuestos oligonucleotídicos adicionales dirigidos a una segunda diana de microARN. Pueden usarse juntos o de manera secuencial dos o más compuestos combinados.

Los compuestos divulgados en el presente documento son útiles para una serie de aplicaciones terapéuticas, como se ha indicado anteriormente. En general, los métodos terapéuticos de la invención incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido a un mamífero, en particular, un ser humano. En una realización concreta, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más compuestos de la invención y (b) uno o más agentes quimioterapéuticos. Cuando se usan con los compuestos de la invención, dichos agentes quimioterapéuticos pueden usarse de manera individual, secuencial o en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos similares diferentes o en combinación con radioterapia. Se incorporan en este caso todos los agentes quimioterapéuticos conocidos por una persona experta en la materia como tratamientos combinados con un compuesto de acuerdo con la presente invención. También pueden combinarse otros principios activos, tales como fármacos antiinflamatorios, incluyendo, pero sin limitación, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, fármacos antivíricos y fármacos inmunomoduladores, en las composiciones de la invención. Pueden usarse juntos o de manera secuencial dos o más compuestos combinados.

Ejemplos de indicaciones terapéuticas que pueden tratarse mediante las composiciones farmacéuticas de la invención:

microARN	Posibles indicaciones médicas
miR-21	Glioblastoma, cáncer de mama
miR-122	hipercolesterolemia, hepatitis C, hemocromatosis
miR-19b	linfoma y otros tipos de tumor
miR-155	linfoma, cáncer de mama y pulmón
miR-375	diabetes, trastornos metabólicos
miR-181	diferenciación de mioblastos, trastornos autoinmunitarios

Se ha indicado el ARNm del gen supresor de tumores, tropomiosina 1 (TPM1) como una diana de miR-21. Se ha indicado el ARNm de miotrofina (mtpn) como una diana de miR 375.

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un oligonucleótido de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en: aterosclerosis, hipercolesterolemia e hiperlipidemia; cáncer, glioblastoma, cáncer de mama, linfoma, cáncer de pulmón; diabetes, trastornos metabólicos; diferenciación de mioblastos; trastornos inmunitarios.

La invención se refiere además a un oligonucleótido de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en: aterosclerosis, hipercolesterolemia e hiperlipidemia; cáncer, glioblastoma, cáncer de mama, linfoma, cáncer de pulmón; diabetes, trastornos metabólicos; diferenciación de mioblastos; trastornos inmunitarios.

En el presente documento se describe un método para tratar a un sujeto que padece una enfermedad o afección seleccionada entre el grupo que consiste en: aterosclerosis, hipercolesterolemia e hiperlipidemia; cáncer, glioblastoma, cáncer de mama, linfoma, cáncer de pulmón; diabetes, trastornos metabólicos; diferenciación de mioblastos; trastornos inmunitarios, comprendiendo el método la etapa de administrar un oligonucleótido o una composición farmacéutica de la invención al sujeto que lo necesita.

Cáncer

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un oligonucleótido de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. La presente invención se refiere a un método para el tratamiento o la profilaxis del cáncer, comprendiendo dicho método administrar un oligonucleótido de la invención o una composición farmacéutica de la invención a un paciente que lo necesita.

Dichos cánceres pueden incluir neoplasia linforreticular, leucemia linfoblástica, tumores cerebrales, tumores gástricos, plasmacitomas, mieloma múltiple, leucemia, tumores del tejido conectivo, linfomas y tumores sólidos.

En el uso de un compuesto de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, dicho cáncer puede encontrarse, de manera adecuada, en forma de un tumor sólido. De manera análoga, en el método para tratar el cáncer divulgado en el presente documento, dicho cáncer puede encontrarse, de manera adecuada, en forma de un tumor sólido.

Asimismo, dicho cáncer es también, de manera adecuada, un carcinoma. El carcinoma se selecciona normalmente entre el grupo que consiste en melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de ovario, carcinoma de mama, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga, cáncer de vejiga superficial recurrente, carcinoma de estómago, carcinoma de próstata, carcinoma de páncreas, carcinoma de pulmón, carcinoma de cuello de útero, displasia de cuello de útero, papilomatosis laríngea, carcinoma de colon, carcinoma colorrectal y tumores carcinoides. Más normalmente, dicho carcinoma se selecciona entre el grupo que consiste en melanoma maligno, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de mama, carcinoma de colon y carcinoma de células

renales. El melanoma maligno se selecciona normalmente entre el grupo que consiste en melanoma disperso superficial, melanoma nodular, léntigo, melanoma maligno, melanoma acral, melanoma amelanótico y melanoma desmoplástico.

5 Como alternativa, el cáncer puede ser, de manera adecuada, un sarcoma. El sarcoma se encuentra normalmente en una forma seleccionada entre el grupo que consiste en osteosarcoma, sarcoma de Ewing, condrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, fibrosarcoma y sarcoma de Kaposi.

Como alternativa, el cáncer puede ser, de manera adecuada, un glioma.

10 Una realización adicional se refiere al uso de un oligonucleótido de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en donde dicho medicamento comprende además un agente quimioterapéutico seleccionado entre el grupo que consiste en adrenocorticosteroides, tales como prednisona, dexametasona y decadrón; altretamina (hexalén, hexametilmelamina (HMM)); amifostina (etioli); aminoglutetimida (citadren); amsacrina (M-AMSA); anastrozol (arimidex); andrógenos, tales como testosterona; asparaginasa (elspar); bacilo de Calmette-Gurin; bicalutamida (casodex); bleomicina (blenoxano); busulfán (myleran); carboplatino (paraplatino); carmustina (BCNU, BiCNU); clorambucilo (leukeran); clorodesoxiadenosina (2-CDA, cladribina, leustatina); cisplatino (platinol); arabinósido de citosina (citarabina); dacarbazina (DTIC); dactinomicina (actinomicina-D, cosmegen); daunorrubicina (cerubidina); docetaxel (taxotere); doxorubicina (adriamicina); epirubicina; estramustina (emcyt); estrógenos, tales como dietilestilbestrol (DES); etopósido (VP-16, VePesid, etopophos); fludarabina (Fludara); flutamida (eulexin); 5-FUDR (floxuridina); 5-fluorouracilo (5-FU); gemcitabina (gemzar); goserelina (zodalex); herceptin (trastuzumab); hidroxiurea (hydrea); idarrubicina (idamicina); ifosfamida; IL-2 (proleukin, aldesleukin); interferón alfa (intron A, roferon A); irinotecán (camptosar); leuprolida (lupron); levamisol (ergamisole); lomustina (CCNU); mecloretamina (mustargen, mostaza de nitrógeno); melfalano (alkeran); mercaptopurina (purinetol, 6-MP); metotrexato (mexate); mitomicina-C (mutamicina); mitoxantrona (novantrona); octreótido (sandostatina); pentostatina (2-desoxiconformicina, nipent); plicamicina (mitramicina, mitracina); prorocarbazina (matulane); estreptozocina; tamoxifeno (nolvadex); taxol (paclitaxel); tenipósido (vumon, VM-26); tiotepa; topotecán (hycamtin); tretinoína (vesanoid, ácido todo trans retinoico); vinblastina (valban); vincristina (oncovina) y vinorelbina (navelbina). De manera adecuada, el agente quimioterapéutico adicional se selecciona entre taxanos, tales como taxol, paclitaxel o docetaxel.

De manera similar, la invención se refiere además al uso de un oligonucleótido de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en donde dicho tratamiento comprende además la administración de un agente quimioterapéutico adicional seleccionado entre el grupo que consiste en adrenocorticosteroides, tales como prednisona, dexametasona y decadrón; altretamina (hexalén, hexametilmelamina (HMM)); amifostina (etioli); aminoglutetimida (citadren); amsacrina (M-AMSA); anastrozol (arimidex); andrógenos, tales como testosterona; asparaginasa (elspar); bacilo de Calmette-Gurin; bicalutamida (casodex); bleomicina (blenoxano); busulfán (myleran); carboplatino (paraplatino); carmustina (BCNU, BiCNU); clorambucilo (leukeran); clorodesoxiadenosina (2-CDA, cladribina, leustatina); cisplatino (platinol); arabinósido de citosina (citarabina); dacarbazina (DTIC); dactinomicina (actinomicina-D, cosmegen); daunorrubicina (cerubidina); docetaxel (taxotere); doxorubicina (adriamicina); epirubicina; estramustina (emcyt); estrógenos, tales como dietilestilbestrol (DES); etopósido (VP-16, VePesid, etopophos); fludarabina (Fludara); flutamida (eulexin); 5-FUDR (floxuridina); 5-fluorouracilo (5-FU); gemcitabina (gemzar); goserelina (zodalex); herceptin (trastuzumab); hidroxiurea (hydrea); idarrubicina (idamicina); ifosfamida; IL-2 (proleukin, aldesleukin); interferón alfa (intron A, roferon A); irinotecán (camptosar); leuprolida (lupron); levamisol (ergamisole); lomustina (CCNU); mecloretamina (mustargen, mostaza de nitrógeno); melfalano (alkeran); mercaptopurina (purinetol, 6-MP); metotrexato (mexate); mitomicina-C (mutamicina); mitoxantrona (novantrona); octreótido (sandostatina); pentostatina (2-desoxiconformicina, nipent); plicamicina (mitramicina, mitracina); prorocarbazina (matulane); estreptozocina; tamoxifeno (nolvadex); taxol (paclitaxel); tenipósido (vumon, VM-26); tiotepa; topotecán (hycamtin); tretinoína (vesanoid, ácido todo trans retinoico); vinblastina (valban); vincristina (oncovina) y vinorelbina (navelbina). De manera adecuada, dicho tratamiento comprende además la administración de un agente quimioterapéutico adicional seleccionado entre taxanos, tales como taxol, paclitaxel o docetaxel.

Dicho de una manera alternativa, en el presente documento se describe un método para tratar el cáncer, comprendiendo dicho método administrar un oligonucleótido de la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención a un paciente que lo necesita y comprende además la administración de un agente quimioterapéutico adicional. Dicha administración adicional puede ser de tal forma que el agente quimioterapéutico adicional se conjuga al compuesto de la invención, está presente en la composición farmacéutica o se administra en una formulación separada.

Enfermedades infecciosas

Se contempla que los compuestos de la invención pueden aplicarse ampliamente a una gran variedad de enfermedades infecciosas, tales como difteria, tétanos, tos ferina, polio, hepatitis B, hepatitis C, *Hemophilus influenzae*, sarampión, paperas y rubéola.

Hsa-miR122 está indicado en la infección por hepatitis C y como tales, dichos oligonucleótidos de acuerdo con la invención que se dirigen a miR-122 pueden usarse para tratar la infección por virus de la hepatitis C.

5 Por consiguiente, en otro aspecto más, la presente invención se refiere al uso de un oligonucleótido de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad infecciosa. En el presente documento también se describe un método para tratar una enfermedad infecciosa, comprendiendo dicho método administrar un oligonucleótido de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención a un paciente que lo necesita.

10 Enfermedades inflamatorias

La respuesta inflamatoria es un mecanismo esencial de defensa del organismo contra el ataque de agentes infecciosos y también está implicada en la patogénesis de muchas enfermedades agudas y crónicas, incluyendo trastornos autoinmunitarios. Aunque son necesarios para combatir a los patógenos, el efecto de una explosión inflamatoria puede ser devastador. Por lo tanto, normalmente es necesario restringir la sintomatología de la inflamación mediante el uso de fármacos antiinflamatorios. La inflamación es un proceso complejo desencadenado normalmente por una lesión tisular, que incluye la activación de una gran variedad de enzimas, el aumento de la permeabilidad vascular y la extravasación de fluidos corporales, la migración celular y la liberación de mediadores inflamatorios, todos dirigidos tanto a destruir como a reparar el tejido dañado.

20 En otro aspecto más, la presente invención se refiere al uso de un oligonucleótido de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria. En el presente documento también se describe un método para tratar una enfermedad inflamatoria, comprendiendo dicho método administrar un oligonucleótido de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención a un paciente que lo necesita.

30 En una realización preferida de la invención, la enfermedad inflamatoria es una enfermedad reumática y/o enfermedades del tejido conectivo, tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES) o lupus, esclerodermia, polimiositis, enfermedad inflamatoria del intestino, dermatomiositis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, vasculitis, artritis psoriásica, dermatitis psoriásica exfoliativa, pénfigo vulgar y síndrome de Sjögren, en particular, enfermedad inflamatoria del intestino y enfermedad de Crohn.

35 Como alternativa, la enfermedad inflamatoria puede ser una inflamación no reumática, tal como bursitis, sinovitis, capsulitis, tendinitis y/u otras lesiones inflamatorias de origen traumático y/o deportivo.

Enfermedades metabólicas

40 Una enfermedad metabólica es un trastorno causado por la acumulación de compuestos químicos producidos de manera natural en el organismo. Estas enfermedades normalmente son graves, algunas incluso potencialmente letales. Otras pueden frenar el desarrollo físico o provocar retraso mental. La mayoría de niños con estos trastornos, al principio, no muestran síntomas evidentes de la enfermedad. Una exploración adecuada en el momento del nacimiento puede a menudo descubrir estos problemas. Con un diagnóstico y tratamiento temprano, las enfermedades metabólicas normalmente pueden controlarse de manera eficaz.

45 En otro aspecto más, la presente invención se refiere al uso de un oligonucleótido de acuerdo con la invención o a un conjugado del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad metabólica. En el presente documento también se describe un método para tratar una enfermedad metabólica, comprendiendo dicho método administrar un oligonucleótido de acuerdo con la invención o un conjugado del mismo o una composición de acuerdo con la invención a un paciente que lo necesita. En una realización preferida de la invención, la enfermedad metabólica se selecciona entre el grupo que consiste en amiloidosis, Biotinidasa, OMIM (herencia mendeliana en línea en el hombre), síndrome de Crigler Najjar, diabetes, Fabry Support & Information Group, trastornos de la oxidación de ácidos grasos, galactosemia, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), aciduria glutárica, International Organization of Glutaric Acidemia, acidemia glutárica de tipo I, acidemia glutárica, tipo II, acidemia glutárica de tipo I, acidemia glutárica de tipo-II, F-HYPDRR - hipofosfatemia familiar, raquitismo resistente a la vitamina D, enfermedad de Krabbe, deficiencia de 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCHAD), Grupo de manosidosis, enfermedad urinaria del sirope de arce, trastornos mitocondriales, síndromes por mucopolisacaridosis: Niemann Pick, acidemias orgánicas, PKU, enfermedad de Pompe, porfiria, síndrome metabólico, hiperlipidemia y trastornos lipídicos heredados, trimetilaminuria: el síndrome de mal olor a pescado y trastornos del ciclo de la urea.

60 Trastornos hepáticos

65 En otro aspecto más, la presente invención se refiere al uso de un oligonucleótido de acuerdo con la invención o a un conjugado del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno hepático. En el presente documento también se describe un método para tratar un trastorno hepático, comprendiendo dicho método administrar un oligonucleótido de acuerdo con la invención o un conjugado del mismo o una composición de acuerdo con la invención a un paciente que lo necesita.

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

Otros usos

Los oligonucleótidos de la presente invención pueden utilizarse como reactivos de investigación para agentes de diagnóstico, agentes terapéuticos y agentes profilácticos. En investigación, el oligonucleótido puede usarse para inhibir de manera específica la síntesis de genes diana en células y animales experimentales, facilitando de este modo el análisis funcional de la diana o una evaluación de su utilidad como diana para intervención terapéutica. En diagnósticos, pueden usarse los oligonucleótidos para detectar y cuantificar la expresión de la diana en células y tejidos mediante transferencia de Northern, hibridación *in-situ* o técnicas similares. Para agentes terapéuticos, se trata a un animal o un ser humano, que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno que puede ser tratado modulando la expresión de la diana, mediante la administración de los compuestos oligonucleotídicos de acuerdo con la presente invención. En el presente documento también se describen métodos para tratar a un animal, en particular un ratón o una rata y para tratar a un ser humano, que se sospecha que tiene o que es propenso a una enfermedad o afección, asociada con la expresión de una diana mediante la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más de los compuestos oligonucleotídicos o las composiciones de la invención.

Uso terapéutico de oligonucleótidos que se dirigen a miR-122a

En la sección de ejemplos, se demuestra que un LNA-antimiR™, tal como SPC3372, que se dirige a miR-122a, reduce los niveles plasmáticos de colesterol. Por lo tanto, otro aspecto de la invención es el uso de los oligonucleótidos descritos anteriormente que se dirigen a miR-122a como medicina. Otro aspecto más de la invención es el uso de los oligonucleótidos descritos anteriormente que se dirigen a miR-122a para la preparación de un medicamento para el tratamiento de los niveles plasmáticos elevados de colesterol. El experto en la materia apreciará que los niveles de colesterol en plasma aumentados son indeseables, ya que aumentan el riesgo de diversas afecciones, por ejemplo, aterosclerosis. Otro aspecto más de la invención es el uso de los oligonucleótidos descritos anteriormente que se dirigen a miR-122a para regular positivamente los niveles de ARNm de Nrdg3, Aldo A, Bckdk o CD320.

Enseñanzas adicionales

Pueden combinarse las siguientes enseñanzas con las demás realizaciones como se describen en el presente documento:

1. Un oligonucleótido que tiene una longitud de 12 a 26 nucleótidos, en donde

- i) el primer nucleótido, contando desde el extremo 3', es una unidad de ácido nucleico bloqueado (LNA);
- ii) el segundo nucleótido, contando desde el extremo 3', es una unidad de LNA; y
- iii) el nucleótido noveno y/o el décimo, contando desde el extremo 3', es una unidad de LNA.

2. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 1, en donde el noveno nucleótido, contando desde el extremo 3', es una unidad de LNA.

3. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 1, en donde el décimo nucleótido, contando desde el extremo 3', es una unidad de LNA.

4. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 1, en donde tanto el noveno nucleótido como el décimo, calculados desde el extremo 3', son unidades de LNA.

5. El oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-4, en donde dicho oligonucleótido comprende al menos una unidad de LNA en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'.

6. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 5, en donde dicho oligonucleótido comprende una unidad de LNA en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'.

7. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 6, en donde el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en Xxxxxx, xXxxxx, xxXxxx, xxxXxx, xxxxXx y xxxxxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.

8. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 5, en donde dicho oligonucleótido comprende al menos dos unidades de LNA en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'.

9. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 8, en donde dicho oligonucleótido comprende dos unidades de LNA en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'.

ES 2 715 625 T3

- 5 10. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 9, en donde el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en XXxxxx, XxXxxx, XxxXxx, XxxxxX, XxxxXx, xXXxxx, xXxXxx, xXxxXx, xXxxxX, xxXXxx, xxXxXx, xxXxxX, xxxXXx, xxxXxX y xxxxXX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 10 11. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 10, en donde el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en XxXxxx, XxxXxx, XxxxxX, XxxxXx, xXxXxx, xXxxXx, xXxxxX, xxXxXx, xxXxxX y xxxXxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 15 12. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 11, en donde el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xXxXxx, xXxxXx, xXxxxX, xxXxXx, xxXxxX y xxxXxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 20 13. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 12, en donde el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xXxXxx, xXxxXx y xxXxXx, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 25 14. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 13, en donde el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', es xXxXxx, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 30 15. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 5, en donde dicho oligonucleótido comprende al menos tres unidades de LNA en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'.
- 35 16. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 15, en donde dicho oligonucleótido comprende tres unidades de LNA en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3'.
- 40 17. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 16, en donde el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en XXXxxx, xXXXxx, xxXXXx, xxxXXX, XXxXxx, XXxxXx, XXxxxX, xXXxXx, xXXxxX, xxXXxX, XxXXxx, XxxXXx, XxxxXX, xXxXXx, xXxxXX, xxXxXX, xXxXxX y XxXxXx, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 45 18. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 17, en donde el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en XXxXxx, XXxxXx, XXxxxX, xXXxXx, xXXxxX, xxXXxX, XxXXxx, XxxXXx, XxxxXX, xXxXXx, xXxxXX, xxXxXX, xXxXxX y XxXxXx, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 50 19. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 18, en donde el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xXxXxx, xXxxXx, xxXXxX, xXxxXX, xxXxXX y xXxXxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 55 20. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 18, en donde el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', es xXxXxX o XxXxXx, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 60 21. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 20, en donde el patrón de sustitución para los nucleótidos en las posiciones tres a ocho, contando desde el extremo 3', es xXxXxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 65 22. El oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de los párrafos 7-21, en donde dicha unidad distinta de LNA es una unidad de ADN.
23. El oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores, en donde dicho oligonucleótido tiene una longitud de 12 a 24 nucleótidos, tal como una longitud de 12 a 22 nucleótidos, preferentemente, una longitud de 12 a 20 nucleótidos, tal como una longitud de 12 a 19 nucleótidos, más preferentemente, una longitud de 12 a 18 nucleótidos, tal como una longitud de 12 a 17 nucleótidos, aún más preferentemente, una longitud de 12 a 16 nucleótidos.
24. El oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores, en donde dicho oligonucleótido comprende al menos una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA, desde la posición 11, contando desde el extremo 3', hasta el extremo 5'.

25. El oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores, en donde dicho oligonucleótido comprende al menos dos unidades de LNA, tal como dos unidades de LNA, desde la posición 11, contando desde el extremo 3', hasta el extremo 5'.
- 5 26. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 24 o 25, en donde dicho oligonucleótido comprende 12 nucleótidos y el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 12, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xX y Xx, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 10 27. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 26, en donde el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 12, contando desde el extremo 3', es xX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 15 28. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 24 o 25, en donde dicho oligonucleótido comprende 13 nucleótidos y el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 13, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX y XXX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 20 29. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 28, en donde el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 13, contando desde el extremo 3', es xxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 25 30. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 24 o 25, en donde dicho oligonucleótido comprende 14 nucleótidos y el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 14, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en Xxxx, xXxx, xxXx, xxxX, XXxx, XxXx, XxxX, xXXx, xXxX y xxXX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 30 31. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 30, en donde el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 14, contando desde el extremo 3', es xXxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 35 32. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 24 o 25, en donde dicho oligonucleótido comprende 15 nucleótidos y el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 15, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en Xxxxx, xXxxx, xxXxx, xxxXx, xxxxX, XXxxx, XxXxx, XxxXx, XxxxX, xXXxx, xXxXx, xXxxX, xxXXx, xxXxX y xxxXX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 40 33. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 32, en donde el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 15, contando desde el extremo 3', es xxXxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 45 34. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 24 o 25, en donde dicho oligonucleótido comprende 16 nucleótidos y el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 16, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en Xxxxxx, xXxxxx, xxXxxx, xxxXxx, xxxxXx, xxxxxX, XXxxxx, XxXxxx, XxxXxx, XxxxXx, XxxxxX, xXXxxx, xXxXxx, xXxxxX, xxXXxx, xxXxXx, xxXxxX, xxxXXx, xxxXxX, xxxxxX, XXXxxx, XXxXxx, XXxxXx, XXxxxX, XxXXxx,
- 50 XxXxXx, XxXxxX, XxxXXx, XxxXxX, XxxxXX, xXXXxx, xXXxXx, xXXxxX, xXxXXx, xXxXxX, xXxxXX, xxXXXx, xxXXxX, xxXxXX y xxxXXX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 55 35. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 34, en donde el patrón de sustitución para las posiciones 11 a 16, contando desde el extremo 3', es xxXxxX, en donde "X" indica una unidad de LNA y "x" indica una unidad distinta de LNA.
- 60 36. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 24 o 25, en donde dicho oligonucleótido comprende una unidad de LNA en el extremo 5'.
- 65 37. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 36, que contiene una unidad de LNA en las dos primeras posiciones, contando desde el extremo 5'.
38. El oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el oligonucleótido comprende al menos un grupo de enlace internucleósido que difiere de fosfato.
39. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 38, en donde dicho grupo de enlace internucleósido, que difiere de fosfato, es fosforotioato.
40. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 39, en donde todos los grupos de enlace internucleósido son de fosforotioato.

41. El oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores, en donde dichas unidades de LNA se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en unidades de tio-LNA, unidades de amino-LNA y unidades de oxi-LNA.
- 5 42. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 41, en donde dichas unidades de LNA se encuentran en la forma beta-D.
43. El oligonucleótido de acuerdo con el párrafo 41, en donde dichas unidades de LNA son unidades de oxi-LNA en forma beta-D.
- 10 44. El oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores para su uso como medicamento.
45. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-43 y un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 15 46. La composición de acuerdo con el párrafo 45, en donde dicho transportador es suero salino o suero salino tamponado.
47. Uso de un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-43, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 20 48. Un método para el tratamiento del cáncer, que comprende la etapa de administrar un oligonucleótido de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-43 o una composición de acuerdo con el párrafo 45.

25 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.
 30 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.
 35 Chen, J.F., et al. 2005. *Nat Genet.* 25 de dic., avance de publicación en línea.
 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.
 40 He, L. et al. 2005. *Nature* 435: 828-833.
 Hornstein, E. et al. 2005. *Nature* 438: 671-4.
 Hutvágner, G. et al 2001. *Science* 293: 834-838.
 Hutvágner, G. et al. 2004. *PLoS Biology* 2: 1-11.
 Iorio, M.V. et al. 2005. *Cancer Res.* 65: 7065-70.
 45 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.
 50 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. y Carthew, R.W. 2005. *Cell* 123: 1267-77.
 Lu, J. et al. 2005. *Nature* 435: 834-838.
 55 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.
 60 Yekta, S. et al. 2004. *Science* 304: 594-596.
 Zhao, Y. et al. 2005. *Nature* 436: 214-220.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

- 65 Ejemplo 1: Síntesis de monómero

Los bloques de construcción de monómeros de LNA y los derivados de los mismos se prepararon siguiendo procedimientos publicados y las referencias citadas en los mismos, véase, por ejemplo, el documento WO 03/095467 A1 y D. S. Pedersen, C. Rosenbohm, T. Koch (2002) Preparation of LNA Phosphoramidites, Synthesis 6, 802-808.

5 Ejemplo 2: Síntesis de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se sintetizaron usando la estrategia de fosforamidita en un sintetizador Expedite 8900/MOSS (Sistema de Síntesis de Oligonucleótidos Múltiples) a escala de 1 μ mol o 15 μ mol. Para la síntesis a mayor escala, se usó un dispositivo Akta Oligo Pilot (GE Healthcare). Al final de la síntesis (DMT-on), se escindieron los oligonucleótidos del soporte sólido usando amoníaco acuoso durante 1-2 horas a temperatura ambiente y se desprotegió adicionalmente durante 4 horas a 65 °C. Los oligonucleótidos se purificaron mediante HPLC en fase reversa (RP-HPLC). Tras retirar el grupo DMT, los oligonucleótidos se caracterizaron mediante AE-HPLC, RP-HPLC y CGE y la masa molecular se confirmó adicionalmente mediante IEN-EM. Véase más adelante para más detalles.

15 Preparación del soporte sólido para LNA:

Preparación del hemiéster de succinilo de LNA

Se disolvieron monómero de 5'-O-Dmt-3'-hidroxi-LNA (500 mg), anhídrido succínico (1,2 eq.) y DMAP (1,2 eq.) en DCM (35 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Tras las extracciones con NaH_2PO_4 0,1 M, pH 5,5 (2x) y salmuera (1x), la capa orgánica se secó adicionalmente con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó. El derivado de hemiéster se obtuvo con un rendimiento del 95 % y se usó sin purificación adicional.

Preparación del soporte para LNA

Se disolvió el hemiéster preparado anteriormente (90 μ mol) en una cantidad mínima de DMF, se añadieron DIEA y pyBOP (90 μ mol) y se mezclaron durante 1 min. Esta mezcla preactivada se combinó con LCAA-CPG (500 Å, malla de tamaño 80-120, 300 mg) en un sintetizador manual y se agitó. Tras 1,5 horas a temperatura ambiente, se filtró el soporte y se lavó con DMF, DCM y MeOH. Después de secarse, se determinó que la carga era de 57 μ mol/g (véase 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).

Elongación del oligonucleótido

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

40 Purificación mediante RP-HPLC:

Columna: Xterra RP₁₈
Caudal: 3 ml/min
Tampones: acetato de amonio 0,1 M, pH 8 y acetonitrilo

Abreviaturas:

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

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

MicroARN diana:

miR-122a: 5'-uggagugugacaaugguguugu-3' SEQ ID NO: 535

miR-122a 3' a 5': inversa) 3'-uguuugugguaacagugaggu-5' (SEQ ID NO: 535 orientación

Table 1 Secuencias de oligonucleótidos de LNA anti-miR y T_m:

SEQ ID NO:	ID del oligo		SEQ ID NO:	Secuencia:		T _m (°C)
2	SPC3370	diseño XxxX	SEQ ID NO: 585	5'-cCatTgtCacActCca-3'	Cadena principal de PS	75
3	SPC3372	diseño XxxX	SEQ ID NO: 586	5'-ccAttGtcAcaCtcCa-3'	Cadena principal de PS	69
4	SPC3375	Gapmero	SEQ ID NO: 587	5'-CCAttgtcacacTCCa-3'	Cadena principal de PS	69
5	SPC3549	15-mero	SEQ ID NO: 588	5'-CcAttGTcaCaCtCC-3'	Cadena principal de PS	78
6	SPC3550	control de desemparejamiento	SEQ ID NO: 589	5'-CcAtt <u>C</u> Tga <u>C</u> c <u>C</u> t <u>A</u> C-3'	Cadena principal de PS	32
7	SPC3373	control de desemparejamiento	SEQ ID NO: 590	5'-ccAttGtc <u>T</u> ca <u>A</u> tcCa-3'	Cadena principal de PS	46
8	SPC3548	13-mero	SEQ ID NO: 591	5'-AttGTcaCaCtCC-3'	Cadena principal de PS	

minúsculas: ADN, mayúsculas: LNA (todas las C de LNA estaban metiladas), subrayado: desemparejamiento

5 Se evaluaron las temperaturas de fusión hacia la secuencia madura de miR-122a, usando un oligonucleótido de ARN sintético de miR-122a con enlaces fosforotioato.

10 El dúplex de oligo de LNA anti-miR/miR-122a se diluyó a 3 µM en 500 µl de H₂O sin RNasas, que después se mezcló con 500 µl de tampón de dimerización 2x (conc. final de oligo/dúplex 1,5 µM, tampón de T_m 2x: NaCl 200 mM, EDTA 0,2 mM, NaP 20 mM, pH 7.0, tratado con DEPC para retirar las RNasas). En primer lugar, se calentó la mezcla a 95 grados durante 3 minutos, después se dejó enfriar a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos.

15 Después de incubar a TA, se midió la T_m en un espectrofotómetro Lambda 40 UV/VIS con un programador de temperatura Peltier PTP6 usando el programa informático PE Templab (Perkin Elmer). La temperatura se aumentó en rampa de 20 °C a 95 °C y después se redujo nuevamente hasta 20 °C, registrando la absorción de manera continua a 260 nm. Se usaron la primera derivada y los máximos locales tanto de la fusión como de la hibridación para evaluar el punto de fusión/hibridación (T_m), ambos deben proporcionar valores de T_m similares/iguales. Para la primera derivada, se usaron 91 puntos para calcular la pensión.

20 Sustituyendo el oligonucleótido antimir y la molécula de ARN complementaria, pudo usarse el ensayo anterior para determinar la T_m de otros oligonucleótidos, tales como los oligonucleótidos de acuerdo con la invención.

25 Sin embargo, en una realización, puede determinarse la T_m con una molécula de ADN complementaria (enlaces de fosforotioato). Normalmente, la T_m medida contra una molécula de ADN complementaria es aproximadamente 10 °C menor que la T_m con un complemento de ARN equivalente. La T_m medida usando el complemento de ADN puede usarse, por lo tanto, en casos donde el dúplex tiene una T_m muy elevada.

Mediciones de la temperatura de fusión (T_m):

oligo a complemento de ARN de miR-122	T _m
SPC3372 + miR-122a, ARN	69 °C
SPC3648 + miR-122a, ARN	74 °C
SPC3649 + miR-122a, ARN	79 °C

oligo a complemento de ADN	T _m
SPC3372 + 122R, ADN	57 °C

SPC3649 + 122R, ADN	66 °C
---------------------	-------

Se reconoce que para los oligonucleótidos con una T_m muy elevada, los ensayos de T_m anteriores pueden ser insuficiente para determinar la T_m . EN dicho caso, el uso de una molécula de ADN complementaria fosforotioada puede reducir adicionalmente la T_m .

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

10 Para los oligonucleótidos con una T_m muy elevada, un método alternativo para determinar la T_m , es hacer titulaciones y hacerlas correr en un gel para visualizar la cadena individual frente a un dúplex y mediante dichas concentraciones y proporciones, se determina la K_d (constante de disociación) que está relacionada con ΔG y también con la T_m .

Ejemplo 4: Estabilidad de los oligonucleótidos de LNA en plasma humano o de rata

20 Se evaluó la estabilidad de los oligonucleótidos de LNA en plasma de seres humanos o ratas (también puede ser plasma de ratón, mono o perro). En 45 μ l de plasma, se añaden 5 μ l de oligonucleótido de LNA (a una concentración de 20 μ M). Los oligonucleótidos de LNA se incuban en plasma durante tiempos en el intervalo de 0 a 96 horas a 37 °C (se evalúa la actividad de nucleasa del plasma hasta 96 horas y no muestra diferencia en el patrón de escisión por nucleasas).

25 En el momento indicado, se congeló la muestra inmediatamente en nitrógeno líquido. Se diluyeron 2 μ l (equivalente a 40 pmol) de LNA en plasma añadiendo 15 μ l de agua y 3 μ l de tinte de carga 6x (Invitrogen). Como marcador, se usó una escala de 10 pb (Invitrogen, EE. UU. 10821-015). A una escala de 1 μ l, se le añadió 1 μ l de carga 6x y 4 μ l de agua. Se mezclaron las muestras, se calentaron a 65 °C durante 10 min y se cargaron en un gel preejecutado (acrilamida al 16 %, urea 7 M, TBE 1x, preejecutado a 50 Varios durante 1 h) y se ejecutaron a 50-60 Varios durante 30 2½ horas. Posteriormente, se tiñó el gel con SyBR gold 1x (Molecular Probes) en TBE 1x durante 15 min. Las bandas se visualizaron usando un dispositivo de obtención de imágenes de fosforescencia de BioRad.

Ejemplo 5: Modelo *in vitro*: Cultivo de células

35 Puede evaluarse el efecto de los oligonucleótidos de LNA en la expresión del ácido nucleico diana (cantidad) en cualquiera de una variedad de tipos celulares, a condición de que el ácido nucleico diana esté presente a niveles medibles. La diana puede expresarse de manera endógena o mediante la transfección transitoria o estable de un ácido nucleico que codifica dicho ácido nucleico.

40 Puede determinarse el nivel de expresión de ácido nucleico diana de manera rutinaria usando, por ejemplo, análisis de transferencia de Northern (incluyendo Northern de microARN), PCR cuantitativa (incluyendo qPCR de microARN), ensayos de protección frente a ribonucleasas. Los siguientes tipos celulares se proporcionan con fines ilustrativos, pero también pueden usarse de manera rutinaria otros tipos de células, a condición de que la diana se exprese en el tipo celular elegido.

45 Las células se cultivaron en el medio adecuado como se describe más adelante y se mantuvieron a 37 °C con una humedad del 95-98 % y CO₂ al 5 %. Las células se pasaron de manera rutinaria 2-3 veces a la semana.

50 15PC3: La línea celular de cáncer de próstata humano 15PC3 fue amablemente proporcionada por el Dr. F. Baas, Neurozintuigen Laboratory, AMC, Países Bajos y se cultivó en DMEM (Sigma) + suero fetal bovino (FBS) al 10 % + Glutamax I + gentamicina.

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

518A2: La línea celular de melanoma humano 518A2 fue amablemente donada por el Dr. B. Jansen, Sección de Oncología Experimental, Farmacología Molecular, Departamento de Farmacología Clínica, Universidad de Viena y se cultivó en DMEM (Sigma) + suero fetal bovino (FBS) al 10 % + Glutamax I + gentamicina.

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

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

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

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

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

10 HUVEC: La línea celular endotelial de vena umbilical humana HUVEC se adquirió de Camcrex y se mantuvo en medio EGM-2.

15 K562: La línea celular de leucemia mielógena crónica humana K562 se adquirió de ECACC y se mantuvo en RPMI con Glutamax + FBS al 10 %. U87MG: La línea celular de glioblastoma humano U87MG se adquirió de la ATCC y se mantuvo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

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

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

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

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

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

Ejemplo 6: Modelo *in vitro*: Tratamiento con oligonucleótido antisentido anti-miR de LNA

35 Se transfectó la línea celular Huh-7 que expresa miR-122a con anti-miR de LNA a concentraciones de 1 y 100 nM de acuerdo con el protocolo optimizado de Lipofectamine 2000 (LF2000, Invitrogen) (del modo que se expone a continuación).

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

45 Los oligonucleótidos de LNA (anti-miR de LNA) también se diluyeron en Optimem. 285 µl de optimem + 15 µl de oligonucleótido de LNA (solución madre de oligonucleótido 10 µM para una concentración final de 100 nM y de 0,1 µM para una concentración final de 1 nM). Las células se lavaron una vez en optimem y después se añadieron los 1,2 ml de mezcla de optimem/LF2000 a cada pocillo. Las células se incubaron 7 min a temperatura ambiente en la mezcla de LF2000, donde posteriormente se añadieron los 300 µl de solución de oligonucleótido en optimem.

50 Las células se incubaron adicionalmente durante cuatro horas con oligonucleótido y lipofectamine 2000 (en una incubadora de células normal a 37 °C, 5 % de CO₂). Después de estas cuatro horas, se retiró el medio/mezcla y se añadió medio normal completo. Se dejó que las células creciesen durante otras 20 horas. Las células se recogieron en Trizol (Invitrogen) 24 horas después de la transfección. Se extrajo el ARN de acuerdo con un protocolo de Trizol convencional de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen), especialmente para conservar el microARN en la extracción de ARN total.

55 Ejemplo 7: Modelo *in vitro* e *in vivo*: Análisis de la inhibición de oligonucleótidos de la expresión de miR mediante PCR cuantitativa específica para microARN

60 Se evaluaron los niveles de miR-122a en las muestras de ARN en un instrumento de PCR en tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems, EE. UU.) usando un kit para qRT-PCR específico para miR-122a, mirVana (Ambion, EE. UU.) y cebadores para miR-122a (Ambion, EE. UU.). El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante.

65

Resultados:

El nuevo diseño de oligonucleótido anti-miR de LNA específico para miR-122a (es decir, SPC3349 (también citado como SPC 3549)), fue más eficaz para inhibir a miR-122a a 1 nM en comparación con los modelos de diseño anteriores, incluyendo los motivos "cada tres" y "gapmero" (SPG3370, SPC3372, SPC3375) fueron a 100 nM. No se observó que el control de desemparejamiento inhibiese a miR-122a (SPC3350). Los resultados se muestran en la figura 1.

Ejemplo 8: Evaluación de la especificidad de la atenuación génica con antagomiR de LNA usando perfiles de expresión de micromatriz de miARN.

A) Marcaje de ARN para la elaboración de perfiles con micromatrices de miARN

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

B) Hibridación de la micromatriz y lavados después de la hibridación

Las sondas de captura de oligonucleótidos modificadas con LNA que comprendían sondas para todos los miARN anotados de ratón (*Mus musculus*) y ser humano (*Homo sapiens*) en la base de datos de microARN miRBase, compilación 7.1, que incluye un conjunto de sondas de control positivo y negativo, se adquirieron de Exiqon (Exiqon, Dinamarca) y se usaron para imprimir las micromatrices para elaborar los perfiles de miARN. Las sondas de captura contienen un enlazador modificado en C6-amino 5'-terminal y se diseñaron para que tuviesen una T_m de 72°C frente a miARN diana complementarios mediante el ajuste del contenido de LNA y de la longitud de las sondas de captura. Las sondas de captura se diluyeron hasta una concentración final de 10 µM en tampón de fosfato sódico 150 mM (pH 8,5) y se añadieron por puntos por cuadruplicado en portaobjetos Codelink (Amersham Biosciences) usando el formador de matrices MicroGrid II de BioRobotics con una humedad del 45 % y a temperatura ambiente. Los portaobjetos punteados se procesaron posteriormente según las recomendaciones del fabricante. El ARN marcado se hibridó con las micromatrices de LNA durante una noche a 65°C en una mezcla de hibridación que contenía SSC 4x, 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 SSC 2x, SDS al 0,025 % a 65 °C, seguido de tres veces en SSC 0,08x y finalmente tres veces en SSC 0,4x a temperatura ambiente.

C) Escaneo de la matriz, análisis de imágenes y procesamiento de datos

Las micromatrices se escanearon usando el escáner ArrayWorx (Applied Precision, EE. UU.) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las imágenes escaneadas se importaron al programa informático TIGR Spotfinder, versión 3.1 (Saeed et al., 2003) para la extracción de la intensidad media de los puntos y la mediana de las intensidades de fondo locales, excluyendo puntos con intensidades inferiores a la mediana de fondo local + 4x desviaciones estándar. Las intensidades correlacionadas con el fondo se normalizaron usando el paquete de normalización estabilizante de la varianza, versión 1.8.0 (Huber et al., 2002) para R (www.r-project.org). Las intensidades de los puntos duplicados se promediaron usando Microsoft Excel. Las sondas que mostraban un coeficiente de varianza > 100 % se excluyeron de los análisis de datos adicionales.

Ejemplo 9: Detección de microARN mediante hibridación *in situ*

Detección de microARN en secciones de tejido incluidas en parafina y fijadas con formalina mediante hibridación *in situ*.

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

Se recogieron del archivo muestras incluidas en parafina y se seccionaron en secciones de 5 a 10 µm y se montaron en portaobjetos cargados positivamente usando la técnica de flotación. Los portaobjetos se almacenaron a 4 °C hasta que se llevaron a cabo los experimentos *in situ*.

B) Hibridación *in situ*

Las secciones de los portaobjetos se desparafinaron en xileno y después se rehidrataron mediante una dilución seriada de etanol (del 100 % al 25 %). Se sumergieron los portaobjetos en agua tratada con DEPC y se sometieron a tratamiento con HCl y glicina al 0,2 %, se volvieron a fijar en paraformaldehído al 4 % y se trataron con anhídrido acético/trietanolamina; los portaobjetos se enjuagaron en varios lavados de PBS 1X entre tratamientos. Los portaobjetos se prehibridaron en solución de hibridación (formamida al 50 %, SSC 5X, 500 mg/ml de ARNt de levadura, Denhardt 1X) a 50 °C durante 30 min. Después, se añadieron 3 pmol de una sonda de LNA marcada con FITC (Exiqon, Dinamarca) complementaria a cada miARN seleccionado a la solución de hibridación durante una hora a una

temperatura de 20-25 °C por debajo de la T_m de la sonda predicha (normalmente entre 45-55 °C, dependiendo de la secuencia de miARN). Después de los lavados en SSC 0,1X y 0,5X a 65 °C, se llevó a cabo una reacción de amplificación de señal de tiramida usando el kit Genpoint Fluoresceína (FITC) (DakoCytomation, Dinamarca) siguiendo las instrucciones del proveedor. Por último, los portaobjetos se montaron con solución Prolong Gold. Se dejó revelar la reacción de fluorescencia durante 16-24 h antes de documentar la expresión del miARN seleccionado usando un microscopio de epifluorescencia.

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

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

Los embriones de pescado, ratón y *Xenopus* se trataron con proteinasa K (10 µg/ml en PBST) durante 45 min a 37 °C, se volvieron a fijar durante 20 min en paraformaldehído al 4 % e PBS y se lavaron 3 x 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 min, seguido de un lavado corto en agua y 5 x 5 min de lavado en PBST. Después, se transfirieron los embriones a tampón de hibridación (formamida al 50 %, SSC 5x, Tween al 0,1 %, ácido cítrico 9,2 mM, 50 µg/ml de heparina, 500 µg/ml de ARN de levadura) durante 2-3 horas a la temperatura de hibridación. La hibridación se llevó a cabo en medio de hibridación precalentado fresco que contenía sonda de LNA marcada con DIG 3' 10 nM (Roche Diagnostics) complementaria a cada miARN seleccionado. Los lavados después de la hibridación se llevan a cabo a la temperatura de hibridación mediante incubaciones sucesivas durante 15 min en HM (tampón de hibridación sin heparina y ARN de levadura), HM al 75 %/25 % de SSCT 2x (SSC que contiene Tween-20 al 0,1 %), HM al 50 %/50 % de SSCT 2x, HM al 25 %/75 % de SSCT 2x, 100 % de SSCT 2x y 2 x 30 min en SSCT 0,2x.

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

Tras los lavados posteriores al anticuerpo, se lavaron los embriones 3 x 5 min en tampón de tinción (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, MgCl₂ 50 mM, NaCl 100 mM, tween 20 al 0,1 %). La tinción se llevó a cabo en tampón complementado con 4,5 µl/ml de NBT (Roche, 50 mg/ml de solución madre) y 3,5 µl/ml de BCIP (Roche, 50 mg/ml de solución madre). 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) a través de una serie creciente de metanol (MeOH al 25 % en PBST, MeOH al 50 % en PBST, MeOH al 75 % en PBST, MeOH al 100 %) antes de obtener las imágenes.

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

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

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

La síntesis de la primera hebra (ADNc a partir de ARNm) se llevó a cabo usando o el kit OmniScript Reverse Transcriptase o retrotranscriptasa M-MLV (esencialmente como se describe por el fabricante (Ambion)) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen). Cuando se usó OmniScript Reverse Transcriptase, se ajustaron 0,5 µg de ARN total de cada muestra a 12 µl y se mezclaron con 0,2 µl de poli (dT)₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µl) (Life Technologies), 2 µl de mezcla de dNTP (5 mM cada uno), 2 µl de tampón RT 10x, 0,5 µl de inhibidor de RNasa RNAGuard™ (33 unidades/ml, Amersham) y 1 µl de OmniScript Reverse Transcriptase seguido de incubación a 37 °C durante 60 min e inactivación por calor a 93 °C durante 5 min.

5 Cuando la síntesis de la primera hebra se llevó a cabo usando decámeros aleatorios y retrotranscriptasa M-MLV (esencialmente como se describe por el fabricante (Ambion)) se ajustaron 0,25 µg de ARN total de cada muestra a 10,8 µl en H₂O. Se añadieron 2 µl de decámeros y 2 µl de mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno). Las muestras se calentaron a 70 °C durante 3 min y se enfriaron inmediatamente en agua y hielo y se añadieron 3,25 µl de una mezcla que contenía 2 µl de tampón RT 10x; 1 µl de retrotranscriptasa M-MLV; 0,25 µl de inhibidor de RNAsa). El ADNc se sintetizó a 42 °C durante 60 min seguido de una etapa de inactivación por calor a 95°C durante 10 min y finalmente se enfrió a 4 °C. El ADNc puede usarse además para la cuantificación del ARNm mediante, por ejemplo, PCR cuantitativa en tiempo real.

10 La expresión de ARNm puede ensayarse de diversos modos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los niveles de ARNm puede cuantificarse mediante, por ejemplo, análisis de transferencia de Northern, reacción en cadena de la polimerasa competitiva (PCR), ensayos de protección frente a ribonucleasas (RPA) o PCR en tiempo real. En la actualidad se prefiere la PCR cuantitativa en tiempo real. El análisis de ARN puede llevarse a cabo en ARN o ARNm celular total.

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

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

25 Ejemplo 11: Captación de oligonucleótido de LNA y eficacia *in vivo*.

30 Estudio *in vivo*: Se trató a seis grupos de animales (5 ratones por grupo) del siguiente modo. Se inyectaron a los animales del grupo 1 0,2 ml de suero salino por vía i.v. 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 desemparejado de LNA-antimiR™), todos del mismo modo. Todas las dosis se calcularon a partir de los pesos corporales de cada animal en el día 0.

35 Antes de la dosis (día 0) y 24 horas después de la primera dosis (día 3), se recogió sangre retroorbital en tubos que contenían EDTA y la fracción de plasma se recogió y se almacenó congelada a -80 °C para el análisis del colesterol. En el momento del sacrificio, se diseccionaron los hígados y se cortó una porción en cubos de 5 mm y se sumergieron en 5 volúmenes de RNAlater enfriado en hielo. Una segunda porción se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó para su crioseccionamiento.

40 El ARN total se extrajo de las muestras de hígado como se ha descrito anteriormente y se analizaron los niveles de miR-122a mediante qPCR específica para microARN. La figura 5 demuestra una respuesta a la dosis evidente obtenida con SPC3372 con una Cl50 de aproximadamente 3-5 mg/kg, mientras que no se detectó inhibición de miR-122a usando el antago-miR de LNA SPC 3373 para miR-122a.

Ejemplo 12: Respuesta a la dosis de LNA-antimiR-122a *in vivo* en ratones C57/BL/J hembra.

45 Estudio *in vivo*: Diez grupos de animales (hembras C57/BL6; 3 ratones por grupo) se trataron del modo siguiente. Se inyectó a los animales del grupo 1 0,2 ml de suero salino por vía i.p. en el día 0, el día 2 y el día 4. A los grupos 2-10 se les administró por vía i.p. tres concentraciones diferentes (25 mg/kg, 5 mg/kg y 1 mg/kg) de LNA-antimiR-122a/SPC3372 (grupos 2-4), LNA antimiR-122a/SPC3548 (grupos 5-7) o LNA antimiR-122a/SPC3549 (grupos 8-10); las secuencias de LNA antimiR-122a se proporcionan en la tabla 1. Los tres oligonucleótidos de LNA antimiR-122a se dirigen al miR-122a específico de hígado. Las dosis se calcularon a partir de los pesos corporales de cada animal en el día 0.

50 Los animales fueron sacrificados 48 horas después de la última dosis (día 6), se recogió sangre retroorbital en tubos que contenían EDTA y la fracción de plasma se recogió y se almacenó congelada a -80 °C para el análisis del colesterol. En el momento del sacrificio, se diseccionaron los hígados y se cortó una porción en cubos de 5 mm y se sumergieron en 5 volúmenes de RNAlater enfriado en hielo. Una segunda porción se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó para su crioseccionamiento.

55 El ARN total se extrajo de las muestras de hígado usando el reactivo Trizol de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, EE. UU.) y se analizaron los niveles de miR-122a mediante qPCR específica para microARN de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Ambion, EE. UU.). La figura 2 demuestra una respuesta a la dosis evidente obtenida con las tres moléculas de LNA antimiR-122a (SPC3372, SPC3548, SPC3549). Tanto SPC3548 como SPC3549 muestran una eficacia *in vivo* significativamente mejorada en el silenciamiento de miR-122a (como se observa a partir de los niveles de miR-122a reducidos) en comparación con SPC3372, siendo SPC3549 el más potente (Cl₅₀ de aproximadamente 1 mg/kg).

65

Se repitió el ejemplo anterior usando SPC3372 y SPC 3649 usando 5 ratones por grupo y los datos combinados (un total de ocho ratones por grupo) se muestran en la fig. 2b.

Ejemplo 12a: Transferencia de Northern.

Transferencia de Northern específica para microARN que muestra el bloqueo mejorado de miR-122 mediante SPC3649 en comparación con SPC3372 en los hígados de ratones tratados con LNA-antimiR.

Oligos usados en este ejemplo:

SPC3649: 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3'(SEQ ID NO: 539)	Nuevo diseño
SPC3372: 5'-CcAttGtcAcaCtcCa-3' (SEQ ID NO: 586)	Antiguo diseño

Los presentes inventores decidieron evaluar el efecto de SPC3649 en los niveles de miARN de miR-122 en los hígados de ratones tratados con SPC3649. Se administraron los LNA-antimiR SPC3649 y SPC3372 a ratones mediante tres inyecciones i.p. cada dos días a lo largo de un periodo de seis días a las dosis indicadas, seguido del sacrificio de los animales 48 horas después de la última dosis. El ARN total se extrajo de los hígados. Se evaluaron los niveles de miR-122 mediante transferencia de Northern específica para microARN (figura 6).

El tratamiento de ratones normales con SPC3649 dio como resultado una reducción de miR-122 dependiente de la dosis drásticamente mejorada.

Se llevó a cabo una transferencia de Northern específica para microARN que compara SPC3649 con SPC3372 (figura 6). SPC3649 bloqueó completamente a miR-122 tanto a 5 como a 25 mg/kg, como se observa por la ausencia de miR-122 monocatenario maduro y solo la presencia de la banda de dúplex entre el LNA-antimiR y miR-122. Comparando la banda de dúplex frente a la madura en la transferencia de Northern, SPC3649 parece igual de eficaz a 1 mg/kg que SPC3372 a 25 mg/kg.

Ejemplo 13: Evaluación de los niveles de colesterol en plasma en ratones tratados con LNA antimiR-122

Se midió el nivel de colesterol total en plasma usando un ensayo colorimétrico, Cholesterol CP de ABX Pentra. El colesterol se midió después de la hidrólisis enzimática y la oxidación (2,3). Se añadieron 21,5 µl de agua a 1,5 µl de plasma. Se añadieron 250 µl de reactivo y se midió el contenido de colesterol en 5 min a una longitud de onda de 540 nM. Las mediciones en cada animal se efectuaron por duplicado. La sensibilidad y linealidad se evaluó con compuesto de control diluido 2 veces (ABX Pentra N control). El nivel de colesterol se determinó restando el fondo y se presentó en relación con los niveles de colesterol en plasma de ratones tratados con suero salino.

La figura 3 demuestra un nivel notablemente reducido de colesterol en plasma en los ratones que recibieron SPC3548 y SPC3549, en comparación con el control de suero salino en el día 6.

Ejemplo 14: Evaluación de los niveles de ARNm diana de miR-122a en los ratones tratados con LNA antimiR-122a

Los animales de control de suero salino y tratados con diferentes LNA antimiR-122a fueron sacrificados 48 horas después de la última dosis (día 6) y se extrajo el ARN total de las muestras de hígado usando reactivo Trizol de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, EE. UU.). Se evaluaron los niveles de ARNm mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real para dos genes diana de miR-122a, Bckdk (cetoácidos de cadena ramificada deshidrogenasa cinasa, ENSMUSG00000030802) y aldolasa A (aldoA, ENSMUSG00000030695), respectivamente, así como para GAPDH como control, usando ensayos Taqman de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, EE. UU.). 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 LNA antimiR-122a (SPC3372, SPC3548, SPC3549). Por el contrario, los ensayos de qPCR para el control de GAPDH no revelaron diferencias en los niveles de ARNm de GAPDH en los ratones tratados con LNA antimiR-122a en comparación con los animales de control de suero salino (Fig. 4c). Los niveles de ARNm de Bckdk y AldoA fueron significativamente mayores en los ratones tratados con SPC3548 y SPC3549 en comparación con los ratones tratados con SPC3372 (Fig. 4a y 4b), demostrando de este modo su eficacia mejorada *in vivo*. Ejemplo 15: Duración de la acción del oligonucleótido de LNA *in vivo*.

Estudio *in vivo*: Se trató a dos grupos de animales (21 ratones por grupo) del siguiente modo. Se inyectaron a los animales del grupo 1 0,2 ml de suero salino por vía i.v. en 3 días sucesivos, el grupo 2 recibió 25 mg/kg de SPC3372 del mismo modo. Todas las dosis se calcularon a partir de los pesos corporales de cada animal en el día 0.

Tras la última dosis (día 3), se sacrificó a 7 animales de cada grupo en el día 9, el día 16 y el día 23, respectivamente. Antes de esto, en cada día, se recogió sangre retroorbital en tubos que contenían EDTA y la fracción de plasma se recogió y se almacenó congelada a -80 °C para el análisis de colesterol de cada día. En el momento del sacrificio, se diseccionaron los hígados y se cortó una porción en cubos de 5 mm y se sumergieron en 5 volúmenes de RNAlater

enfriado en hielo. Una segunda porción se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó para su crioseccionamiento.

5 El ARN total se extrajo de las muestras de hígado como se ha descrito anteriormente y se analizaron los niveles de miR-122a mediante qPCR específica para microARN. La figura 7 (el día de sacrificio 9, 16 o 23 corresponde a 1, 2 o 3 semanas después de la última dosis) demuestra una inhibición de factor dos en los ratones que recibieron SPC3372, en comparación con el control de suero salino y esta inhibición siguió pudiendo detectarse en el día 16, mientras que en el día 23, los niveles de miR-122a se aproximaron a los del grupo de suero salino.

10 Ejemplo 16: Duración de la acción del oligonucleótido de LNA *in vivo*.

Estudio *in vivo*: Se trató a dos grupos de animales (21 ratones por grupo) del siguiente modo. Se inyectaron a los animales del grupo 1 0,2 ml de suero salino por vía i.v. en 3 días sucesivos, el grupo 2 recibió 25 mg/kg de SPC3372 del mismo modo. Todas las dosis se calcularon a partir de los pesos corporales de cada animal en el día 0.

15 Tras la última dosis (día 3), se sacrificó a 7 animales de cada grupo en el día 9, el día 16 y el día 23, respectivamente. Antes de esto, en cada día, se recogió sangre retroorbital en tubos que contenían EDTA y la fracción de plasma se recogió y se almacenó congelada a -80 °C para el análisis de colesterol de cada día. En el momento del sacrificio, se diseccionaron los hígados y se cortó una porción en cubos de 5 mm y se sumergieron en 5 volúmenes de RNAlater enfriado en hielo. Una segunda porción se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó para su crioseccionamiento.

20 El ARN total se extrajo de las muestras de hígado como se ha descrito anteriormente y se analizaron los niveles de miR-122a mediante qPCR específica para microARN. La figura 8 demuestra una inhibición de factor dos en los ratones que recibieron SPC3372, en comparación con el control de suero salino y esta inhibición siguió pudiendo detectarse en el día 16, mientras que en el día 23, los niveles de miR-122a se aproximaron a los del grupo de suero salino.

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

30 Se administró SPC3372 por vía intravenosa a ratones NMRI usando dosis diarias en el intervalo de 2,5 a 25 mg/kg durante tres días consecutivos. Los animales fueron sacrificados 24 horas, 1, 2 o 3 semanas después de la última dosis. Los hígados se recogieron, se dividieron en trozos y se sumergieron en RNAlater (Ambion) o se congelaron inmediatamente. El ARN se extrajo con reactivo Trizol de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen) del tejido de RNAlater, salvo por que el ARN precipitado se lavó en etanol al 80 % y no se agitó vorticialmente. El ARN se usó para la qPCR TaqMan para ARNm de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems) o para transferencia de Northern (véase más adelante). Los trozos congelados de manera inmediata se crioseccionaron para hibridaciones *in situ*.

40 Además, en lo referente a las figuras 9-14, SPC3372 se denomina LNA-antimiR y SPC3373 (el control de desemparejamiento) se denomina "mm" en lugar de usar el número SPC.

Ejemplo 17: Inducción de ARNm diana dependiente de miR-122a mediante la inhibición con SPC3372 de miR-122a

45 Se trató a los ratones con diferentes dosis de SPC3372 durante tres días consecutivos, como se ha descrito anteriormente y se les sacrificó 24 horas después de la última dosis. Se sometió al ARN total extraído del hígado a qPCR. Los genes con el sitio diana de miR-122 predicho y en los que se observó que estaban regulados positivamente mediante análisis con micromatrices se investigaron respecto de su inducción dependiente de la dosis mediante dosis crecientes de SPC3372 usando qPCR. Se sometió al ARN hepático total de 2 a 3 ratones por grupo sacrificados 24 horas después de la última dosis a qPCR para los genes indicados. En la figura 9 se muestran los niveles de ARNm en relación con el grupo de suero salino, n=2-3 (2,5 - 12,5 mg/kg/día: n=2, sin DT). También se muestra el control de desemparejamiento (mm, SPC3373).

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

55 Se observó una evidente inducción dependiente de la dosis de los genes diana de miR-122a después del tratamiento con diferentes dosis de SPC3372.

Ejemplo 18: Inducción transitoria de ARNm dianas de miR-122a después del tratamiento con SPC3372

60 Se trató a ratones NMRI hembra con 25 mg/kg/día de SPC3372 junto con control de salino durante tres días consecutivos y se les sacrificó 1, 2 o 3 semanas después de la última dosis, respectivamente. Se extrajo ARN de los hígados y los niveles de ARNm de los ARNm diana de miR-122a predichos, seleccionados mediante los datos de la micromatriz se investigaron mediante qPCR. Se analizó a tres animales de cada grupo.

65

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

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

5 Los niveles de ARNm se normalizaron a los niveles de GAPDH individuales y a la media del grupo tratado con suero salino en cada punto de tiempo individual. También se incluyen los valores de los animales sacrificados 24 horas después de la última dosis. Se muestran la media y la desviación típica, n=3 (24h n=3)

10 Ejemplo 19: Inducción de Vldlr en el hígado mediante tratamiento con SPC3372

Se investigó la inducción de Vldlr en las mismas muestras de ARN de hígado del ejemplo anterior.

15 Se observó una regulación positiva transitoria tras el tratamiento con SPC3372, al igual que con los otros ARNm diana de miR-122a (figura 11)

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

20 Se comprobó la estabilidad de SPC3372 y del dúplex de SPC3372/miR-122a en plasma de ratón a 37 °C a lo largo de 96 horas. En la figura 12 se muestra un PAGE teñido con SYBR-Gold.

SPC3372 fue completamente estable a lo largo de 96 horas. El dúplex de SPC3372/miR-122a se truncó inmediatamente (degradación de la región monocatenaria de miR-122a no cubierta por SPC3372) pero posteriormente casi completamente estable durante 96 horas.

25 El hecho de que un dúplex de SPC3372/miR-122 preformado mostrase estabilidad en suero a lo largo de 96 horas, junto con la elevada estabilidad térmica del dúplex de la molécula de SPC3372 respaldó la intuición de que la inhibición de miR-122a mediante SPC3372 se debía a la formación de dúplex estable entre las dos moléculas, lo que también se ha comunicado en cultivo celular (Naguibneva et al. 2006).

30 Ejemplo 21: El secuestro de miR-122a maduro mediante SPC3372 da lugar a la formación de dúplex

35 El ARN de hígado también se sometió a transferencia de Northern de microARN. En la figura 13 se muestra una membrana sondada con una sonda específica para miR-122a (panel superior) y vuelta a sondar con una sonda específica para Let-7 (panel inferior). Con la sonda para miR-122, se pudieron detectar dos bandas, una correspondiente a miR-122 maduro y una correspondiente a un dúplex entre SPC3372 y miR-122.

40 Para confirmar el silenciamiento de miR-122, se sometió a las muestras de ARN de hígado a análisis de transferencia de Northern para ARN pequeño, que demostró niveles significativamente reducidos de miR-122 maduro detectable, de acuerdo con los presentes resultados de RT-PCR en tiempo real. En comparación, los niveles del control de let-7a no se vieron alterados. De forma interesante, los presentes inventores observaron una acumulación dependiente de la dosis de una banda de heterodúplex de miR-122/SPC3372 desplazada, lo que sugiere que SPC3372 no dirige a miR-122 para la degradación, sino que se une al microARN, de este modo, impidiendo estéricamente su función.

45 El análisis de transferencia de Northern se llevó a cabo del siguiente modo:

50 La preparación de las membranas para el Northern se llevó a cabo como se describe en Sempere et al. 2002, salvo por los siguientes cambios: ARN total, 10 µg por carril, en tampón de carga de formamida (formamida al 47,5 %, EDTA 9 mM, azul de bromofenol al 0,0125 %, xileno cianol al 0,0125 %, SDS al 0,0125 %) se cargó en un gel de poliacrilamida de TBE-Urea Novex desnaturizante al 15 % (Invitrogen) sin precalentar el ARN. El ARN se transfirió por electroforesis a una membrana de transferencia de hibridación GenScreen Plus (Perkin Elmer) a 200 mA durante 35 min. Las membranas se sondaron con oligonucleótidos modificados con LNA marcados con 32P complementarios a los microARN maduros*. Los oligonucleótidos de LNA se marcaron e hibridaron a la membrana como se describe en Válóczy et al. 2004, salvo por los siguientes cambios: Las soluciones prehibridación y de hibridación contenían formamida al 50 %, SDS al 0,5 %, SSC 5x, solución de Denhardt 5x y 20 µg/ml de ADN de esperma de arenque desnaturizado y cortado. Las hibridaciones se llevaron a cabo a 45 °C. Las transferencias se visualizaron mediante escaneo en un escáner Storm 860. La señal de la membrana de fondo se restó de las señales radiactivas procedentes de las bandas de miARN. Los valores de las señales de miR-122 se corrigieron respecto de las diferencias de carga basándose en la señal de let-7a. Para determinar el tamaño de las señales radiactivas, se usó el sistema Decade Marker (Ambion) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

60 Ejemplo 22: Secuestro de miR-122a mediante SPC3372 junto con la distribución de SPC3372 evaluada mediante hibridación *in situ* de secciones de hígado

65 Se sometieron a criosecciones de hígado 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 a miR-122a. Una segunda sonda era complementaria a SPC3372. En la figura 14 se muestra una superposición, en verde es la

distribución y las cantidades aparentes de miR-122a y SPC3372 y en azul es la tinción nuclear de DAPI, con un aumento de 10x. Las ampliaciones 100x revelan la distribución intracelular de miR-122a y SPC3372 en el interior de las células de hígado de ratón. Las secciones de hígado de los animales de control de suero salino mostraron un fuerte patrón de tinción de miR-122 a lo largo de la sección de hígado completa, mientras que las secciones de los ratones tratados con SPC3372 mostraron un patrón de tinción disperso significativamente reducido. Por el contrario, la molécula SPC3372 se detectó fácilmente en el hígado tratado con SPC3372, pero no en el hígado de control de suero salino sin tratar. Una mayor ampliación localizó a miR-122a en el citoplasma de los hepatocitos, donde el patrón *in situ* de miR-122 estaba claramente compartimentalizado, mientras que la molécula SPC3372 se distribuyó uniformemente a lo largo de todo el citoplasma.

Ejemplo 23: Análisis de micromatriz

Los presentes inventores llevaron a cabo un perfil de expresión en todo el genoma de muestras de ARN total procedentes de hígados de ratones tratados con suero salino, LNA-antimiR-122 y control de desemparejamiento de LNA 24 horas después de la última dosis usando matrices Affymetrix Mouse Genome 430 2.0. El análisis de los datos de la matriz reveló 455 transcritos que estaban regulados positivamente en los hígados de ratones tratados con LNA-antimiR en comparación con los controles de suero salino y de desemparejamiento de LNA, mientras que 54 transcritos estaban regulados negativamente (Fig. 15a). Pudo identificarse un total de 415 de los transcritos regulados positivamente y 53 de los regulados negativamente en la base de datos Ensembl. Posteriormente, los presentes inventores examinaron las regiones 3' no traducidas (UTR) de los ARNm expresados de manera diferencial respecto de la presencia de la secuencia de 6 nt, CACTCC, correspondiente al complemento inverso de los nucleótidos 2-7 de la región de semilla de miR-122 maduro. El número de transcritos que tenían al menos una secuencia de reconocimiento de miR-122 fue de 213 (51 %) entre los transcritos regulados positivamente y de 10 (19 %) entre los transcritos regulados negativamente, mientras que la frecuencia en una población de secuencia aleatoria fue del 25 %, lo que implica que un grupo significativo de los ARNm regulados positivamente representa dianas directas de miR-122 en el hígado (Fig. 15b).

El tratamiento con LNA-antimiR mostró una reducción máxima de los niveles de miR-122 a las 24 horas, una reducción del 50 % una semana después e iguales que los controles de salino a las tres semanas después de la última dosis de LNA (ejemplo 12, "antiguo diseño"). Esto coincidió con un número notablemente reducido de genes expresados de manera diferencial entre los dos grupos de ratones en los puntos de tiempo posteriores. En comparación con los 509 ARNm 24 horas después de la última dosis de LNA, los presentes inventores identificaron 251 genes expresados de manera diferencial tras una semana, pero solo 18 genes tres semanas después del tratamiento (Fig. 15c y 15d). En general, los genes regulados positivamente 24 horas después del tratamiento con LNA-antimiR revirtieron hacia los niveles de control a lo largo de las dos semanas posteriores (Fig. 15d).

En conclusión, una gran proporción de los genes regulados positivamente/desreprimidos después del tratamiento con LNA-antimiR son dianas de miR-122, lo que indica un efecto muy específico para bloquear a miR-122. Asimismo, los genes regulados positivamente/desreprimidos se aproximan a niveles normales 3 semanas después de finalizar el tratamiento, lo que sugiere un efecto terapéutico relativamente largo, que sin embargo no provoca una alteración permanente, es decir, el efecto es reversible.

MÉTODOS:

Perfiles de expresión génica de ratones tratados con LNA-antimiR.

Se compararon los perfiles de expresión de los hígados de ratones tratados con suero salino y con LNA-antimiR. Se trató a ratones NMRI hembra con 25 mg/kg/día de LNA-antimiR junto con control de salino durante tres días consecutivos y se les sacrificó a las 24 h, 1, 2 o 3 semanas después de la última dosis. Adicionalmente, se obtuvieron los perfiles de expresión de los hígados de ratones tratados con el oligonucleótido de control de LNA desemparejado 24 h después de la última dosis. Se analizaron tres ratones de cada grupo, obteniendo un total de 21 perfiles de expresión. La cantidad y la concentración de ARN se midió usando un bioanalizador Agilent 2100 y Nanodrop ND-1000, respectivamente. El ARN total se procesó siguiendo las instrucciones del kit de síntesis de ADNc GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents One-cycle (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA, EE. UU.) para producir ADNc bicatenario. Este se usó como molde para generar ARNc marcado con biotina, siguiendo las especificaciones del fabricante. Se fragmentaron quince microgramos de ARNc marcado con biotina en hebras de entre 35 y 200 bases de longitud, de los cuales se hibridaron 10 microgramos en matrices Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 durante una noche en el horno de hibridación GeneChip 6400 usando procedimientos convencionales. Las matrices se lavaron y tñieron en un dispositivo GeneChip Fluidics Station 450. El escaneo se llevó a cabo usando el escáner GeneChip 3000 y el análisis de imágenes se llevó a cabo usando el sistema operativo de GeneChip. La normalización y el análisis estadístico se efectuaron usando el paquete informático LIMMA para el ambiente de programación 27 de R. Las sondas indicadas como ausentes por el programa informático GCOS en todas las hibridaciones se retiraron del conjunto de datos. Adicionalmente, se aplicó un filtro de intensidad al conjunto de datos para retirar las sondas que mostraban intensidades corregidas respecto del fondo menores de 16. Los datos se normalizaron usando normalización de cuantil 28. La expresión diferencial se evaluó usando un método de modelo lineal. Los valores de P se ajustaron para múltiples pruebas usando el modelo de Benjamini y Hochberg. Se consideró que las pruebas eran significativas si los valores de p ajustados eran $p < 0,05$. El agrupamiento y la visualización de los datos de la matriz Affymetrix se efectuaron usando el programa informático MultiExperiment Viewer 29.

Predicción del sitio diana

5 Los transcritos con las 3' UTR anotadas se extrajeron de la base de datos Ensembl (Compilación 41) usando la herramienta de recogida de datos EnsMart 30 y se buscó la presencia de la secuencia CACTCC, que es el complemento inverso de los nucleótidos 2-7 de la semilla en la secuencia madura de miR-122. Como control de fondo, se buscaron los 6 nucleótidos coincidentes con la semilla de miR-122 en un conjunto de 1000 secuencias con una longitud de 1200 nt, correspondiente a la longitud media de la 3' UTR de los transcritos regulados positiva y negativamente 24 h después de la última dosis de LNA-antimiR. Esto se llevó a cabo 500 veces y se usó para comparación el recuento medio.

Ejemplo 24. La inhibición dependiente de la dosis de miR-122 en hígado de ratón mediante LNA-antimiR se mejora en comparación con la inhibición con antagomiR de miR-122.

15 Se trató a ratones NMRI hembra con las dosis indicadas de LNA-antimiR (SPC3372) junto con un control de desemparejamiento (mm, SPC3373), suero salino y antagomiR (SPC3595) durante tres días consecutivos y se sacrificaron 24 horas después de la última dosis (como en el ejemplo 11 "antiguo diseño", n=5). Los niveles de miR-122 se analizaron mediante qPCR y se normalizaron al grupo tratado con suero salino. Los genes con sitio diana de miR-122 y regulados positivamente en los perfiles de expresión (AldoA, Nrdg3, Bckdk y CD320) mostraron una desrepresión dependiente de la dosis mediante dosis crecientes de LNA-antimiR, medidas mediante qPCR.

20 La desrepresión fue consistentemente mayor en todos los ARNm diana de miR-122 ensayados (AldoA, Bckdk, CD320 y Nrdg3, figura 17, 18, 19, 20) en los ratones tratados con LNA-antimiR, en comparación con los ratones tratados con antagomiR. Esto también se indicó cuando se analizó la inhibición de miR-122 mediante qPCR específica para miR-122 (figura 16). De este modo, los LNA-antimiR proporcionan una inhibición funcional más potente de miR-122 que un antagomiR a la dosis correspondiente.

Ejemplo 25. Inhibición de miR-122 mediante LNA-antimiR en ratones con hipercolesterolemia, junto con reducción de colesterol y desrepresión del ARNm diana de miR-122.

30 Se alimentó con dieta alta en grasas a ratones C57BL/6J hembra durante 13 semanas antes de iniciar el tratamiento con SPC3649. Esto dio como resultado un aumento de peso de 30-35 g, en comparación con el peso de los ratones normales, que se encontraba justo por debajo de 20 g, pesados al inicio del tratamiento con LNA-antimiR. Los ratones con dieta alta en grasas tuvieron un nivel de colesterol en plasma total significativamente aumentado de aproximadamente 130 mg/dl, haciendo que los ratones tuviesen hipercolesterolemia en comparación con el nivel normal de 70 mg/dl. Los ratones tanto hipercolesterolémicos como normales se trataron por vía i.p. dos veces a la semana con 5 mg/kg de SPC3649 y el control de desemparejamiento correspondiente, SPC3744 durante un periodo de estudio de 5 1/2 semanas. Se recogieron semanalmente muestras de sangre y el colesterol total en plasma se midió durante el transcurso completo del estudio. Tras sacrificar a los ratones, se prepararon muestras de hígado y sangre para la extracción del ARN total, la cuantificación de miARN y ARNm, la evaluación de los niveles séricos de transaminasa y la histología hepática.

45 El tratamiento de los ratones hipercolesterolémicos con SPC3649 dio como resultado una reducción del colesterol total en plasma de aproximadamente el 30 % en comparación con los ratones de control de suero salino después de 10 días y se mantuvo a este nivel durante el estudio completo (figura 21). El efecto no fue tan pronunciado en los ratones con dieta normal. Por el contrario, el control de desemparejamiento SPC3744 no afectó a los niveles de colesterol en plasma en los ratones ni hipercolesterolémicos ni normales.

50 La cuantificación de la inhibición de miR-122 y la desrepresión del ARNm del gen diana de miR-122 (AldoA y Bckdk) tras el tratamiento a largo plazo con SPC3649 reveló un perfil comparable en ratones tanto hipercolesterolémicos como normales (figura 22, 23, 24), demostrando de este modo la potencia de SPC3649 para antagonizar a miR-122 en ambos grupos de animales. Los ensayos qPCR de miR-122 indicaron que también el control de desemparejamiento SPC3744 tuvo un efecto en los niveles de miR-122 en los hígados de ratones tratados, aunque en menor medida en comparación con SPC3649. Esto puede ser una reducción asociada con la qPCR de tallo-bucle. De acuerdo con esta expectativa, el tratamiento de los ratones con el control de desemparejamiento SPC3744 no dio como resultado una desrepresión funcional de los genes diana directos de miR-122 (figura 23 y 24) ni una reducción del colesterol en plasma (figura 21), lo que implica que el antagonismo mediado por SPC3649 de miR-122 es altamente específico *in vivo*.

60 Se evaluaron las enzimas hepáticas en ratones hipercolesterolémicos y normales tras un tratamiento con SPC3649 a largo plazo. No se detectaron cambios en los niveles de alanina y aspartato aminotransferasa (ALT y AST) en los ratones hipercolesterolémicos tratados con SPC3649, en comparación con los ratones de control de suero salino (figura 25 y 26). Se observó un nivel de ALT posiblemente elevado en los ratones normales tras un tratamiento a largo plazo con SPC3649 (figura 26).

65 Ejemplo 26

Métodos para llevar a cabo el experimento de LNA-antimiR/hipercolesterolemia y análisis:

Ratones y dosificación.

5 Se usaron ratones C57BL/6J hembra (Taconic M&B Laboratory Animals, Ejby, Dinamarca). Todas las sustancias se formularon en suero salino fisiológico (NaCl al 0,9 %) a una concentración final que permitía a los ratones recibir un volumen de inyección intraperitoneal de 10 ml/kg.

En el estudio de obesidad inducida por la dieta, los ratones recibieron una dieta alta en grasas (60EN%) (D12492, Research Diets) durante 13 semanas para aumentar su nivel de colesterol en sangre antes de iniciar la dosificación.
10 La pauta posológica se prolongó hasta 5 1/2 semanas de 5 mg/kg de LNA-antimiR™ dos veces a la semana. Se recogió plasma sanguíneo una vez a la semana durante el periodo de dosificación completo. Tras completarse el experimento, se sacrificó a los ratones y se extrajo el ARN de los hígados para su análisis adicional. También se recogió el suero para el análisis de las enzimas hepáticas.

15 Extracción del ARN total.

Se almacenaron en RNA later (Ambion) inmediatamente los hígados diseccionados de los ratones sacrificados. El ARN total se extrajo con reactivo Trizol de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen), salvo por que el sedimento de ARN precipitado se lavó en etanol al 80 % y no se agitó vorticialmente.

20 RT-PCR cuantitativa específica para microARN.

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

30 RT-PCR cuantitativa

La cuantificación del ARNm de los genes seleccionados se efectuó usando ensayos Taqman Convencionales (Applied Biosystems). La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo con decámeros aleatorios, 0,5 µg de ARN total y la enzima RT M-MLV de Ambion, de acuerdo con un protocolo convencional. Posteriormente, se diluyó la primera hebra de ADNc 10 veces en agua sin nucleasas antes de la adición de la mezcla de reacción de RT-PCR. Una dilución en serie de ADNc de factor dos a partir de ARN total de hígado de un animal tratado con suero salino o de la reacción de ADNc de células transfectadas de manera simulada (usando 2,5 veces más ARN total que en las muestras) sirvió como patrón para asegurar un intervalo lineal (Ct frente al número de copias relativo) de la amplificación. Para la amplificación se usó un instrumento de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 o 7900.

Mediciones metabólicas.

45 Inmediatamente antes del sacrificio, se recogió sangre del seno retroorbital en tubos recubiertos de EDTA, seguido de aislamiento de la fracción plasmática. El colesterol en plasma se analizó usando un dispositivo ABX Cholesterol CP (Horiba Group, Horiba ABX Diagnostics) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Medición de enzimas hepáticas (ALT y AST)

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

La medición de ALT y AST se llevó a cabo en placas de 96 pocillos usando reactivos para ALT y AST de ABX Penta, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En pocas palabras, las muestras de suero se diluyeron 2,5 veces con H₂O y cada muestra se ensayó por duplicado. Tras la adición de 50 µl de muestra diluida o de patrón (multical de ABX Pentra) a cada pocillo, se añadieron a cada pocillo 200 µl de mezcla de reactivo de AST o ALT a 37 °C. Las mediciones cinéticas se llevaron a cabo durante 5 min con un intervalo de 30 s a 340 nm y 37 °C usando un espectrofotómetro.

60 Ejemplo 27

Modulación de la replicación de la hepatitis C mediante LNA-antimiR (SPC3649)

Los oligos usados en este ejemplo (mayúsculas: LNA, minúsculas, DNA, las C de LNA son metil - ^mc, y los LNA son preferentemente B-D-oxi (o el subíndice después del resto de LNA, por ejemplo, c_s^o):

65

SPC3649 (LNA-antimiR que se dirige a miR-122, se encontraba en la síntesis a pequeña escala inicial denominado SPC3549) SEQ ID NO: 558
5'-mC _s ^o C _s A _s ^o t _s G _s ^o T _s ^o C _s a _s ^m C _s ^o a _s ^m C _s ^o t _s ^m C _s ^o mC ^o -3'
SPC3648 (LNA-antimiR que se dirige a miR-122, se encontraba en la síntesis a pequeña escala inicial denominado SPC3548)
5'-A _s ^o t _s G _s ^o T _s ^o C _s a _s ^m C _s ^o a _s ^m C _s ^o t _s ^m C _s ^o mC ^o -3'
SPC3550 (control de desemparejamiento de 4 nt para SPC3649) SEQ ID NO: 592
5'-mC _s ^o C _s A _s ^o t _s ^m C _s ^o T _s ^o g _s a _s ^m C _s ^o C _s ^o C _s ^o t _s A _s ^o mC ^o -3'
2'OMe anti-122: oligo modificado de 2'OMe de longitud completa (23 nt) complementario a miR-122
Control de 2'OMe: control modificado de 2'OMe reordenado

5 Se ha demostrado que la replicación de la hepatitis C (VHC) se facilita mediante miR-122 y por consiguiente, se ha demostrado que el antagonismo de miR-122 afecta a la replicación del VHC en un modelo celular de hepatoma *in vitro*. Los presentes inventores evaluaron la eficacia de SPC3649 para reducir la replicación del VHC en el modelo celular basado en Huh-7. Las diferentes moléculas de LNA-antimiR, junto con un 2'OMe antisentido y el oligonucleótido reorganizado se transfectaron en células Huh-7, el VHC se dejó replicar durante 48 horas. Las muestras de ARN total extraídas de las células Huh-7 se sometieron a análisis de transferencia de Northern.

10 Se observó una reducción significativa del ARN de VHC en células tratadas con SPC3649, en comparación con el control simulado y de desemparejamiento de SPC3550. La inhibición fue claramente dependiente de la dosis con SPC3649 y SPC3648. De forma interesante, el uso de un oligonucleótido de 2'OMe completamente complementario a miR-122 a 50 nM fue mucho menos eficaz que SPC3649 a la misma concentración final. De forma destacable, el LNA-antimiR SPC3648 de 13 nt mostró una eficacia comparable con SPC3649.

15 Ejemplo 28
Oligonucleótido antisentido de LNA-antimiR™ que se dirige a miR-21

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

20 >hsa-miR-21 MIMAT0000076
UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (SEQ ID NO: 565)
>mmu-miR-21 MIMAT0000530
25 UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (SEQ ID NO: 593)

Secuencia de los compuestos:

SPC3521 miR-215'-FAM TCAGtctgataaGCTa-3' (diseño de gapmero) - (SEQ ID NO: 594)
SPC3870 miR-21(mm) 5'-FAM TCCgtcttagaaGATa-3' - (SEQ ID NO: 595)
SPC3825 miR-21 5'-FAM TcTgtCAgaTaCgAT-3' (nuevo diseño) (SEQ ID NO: 596)
SPC3826 miR-21(mm) 5'-FAM TcAgtCTgaTaAgCT-3'- (SEQ ID NO: 597)
30 SPC3827 miR-215'-FAM TcAGtCTGaTaAgCT-3' (nuevo diseño mejorado) - (SEQ ID NO: 598)

Todos los compuestos tienen preferentemente una cadena principal completamente o casi completamente tiolada (preferentemente completamente) y en este caso también tienen un marcador de FAM en el extremo 5' (opcional).

35 Se ha demostrado que miR-21 está regulado positivamente tanto en glioblastoma (Chan et al. Cancer Research 2005, 65 (14), p6029) y cáncer de mama (Iorio et al., Cancer Research 2005, 65 (16), p7065) y por lo tanto, se ha considerado un mircoARN "oncogénico" potencial. Chan *et al.* también demostraron la inducción de la apoptosis en células de glioblastoma antagonizando a miR-21 con oligonucleótidos antisentido modificados de 2'OMe o de LNA. Por lo tanto, los agentes que antagonizan a miR-21 tienen el potencial de convertirse en agentes terapéuticos para el tratamiento del glioblastoma y otros tumores sólidos, tales como el cáncer de mama. Los presentes inventores han presentado un oligonucleótido modificado de LNA que se dirige a miR-21, un LNA-antimiR™, con propiedades sorprendentemente buenas para inhibir a miR-21, adecuado para los fines terapéuticos anteriormente mencionados.

45 Las vías de administración terapéutica adecuadas son, por ejemplo, inyecciones intracraneales en glioblastomas, inyecciones intratumorales en glioblastoma y cáncer de mama, así como administración sistémica en el cáncer de mama.

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

5 La eficacia del presente LNA-antimiR™ se evalúa mediante transfección a diferentes concentraciones, junto con oligonucleótidos de control, en las líneas celulares U373 y MCF-7 que se sabe que expresan miR-21 (o también otras líneas celulares que expresan miR-21). La transfección se lleva a cabo usando el protocolo Lipofectamine2000 convencional (Invitrogen). 24 horas después de la transfección, se recogieron las células y se extrajo el ARN total usando el protocolo de Trizol (Invitrogen). La evaluación de los niveles de miR-21, dependiendo del tratamiento y la concentración usada, se efectúa mediante RT-PCR en tiempo real de tallo-bucle específica para miR-21 (Applied Biosystems) o como alternativa, mediante análisis de transferencia de Northern no radiactivos específicos para miR-21. Los niveles de miR-21 detectados, en comparación con el control de vehículo, reflejan en potencial inhibidor del LNA-antimiR™.

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

Se investigó el efecto del antagonismo de miR-21 mediante la clonación de la secuencia diana de miR-21 perfectamente emparejada por detrás de un sistema indicador de luciferasa de *Renilla* convencional (entre la secuencia codificante y la 3' UTR, psiCHECK-2, Promega) - véase el ejemplo 29. La construcción indicadora y el LNA-antimiR™ se cotransfectaron en líneas celulares que expresan miR-21 (por ejemplo, U373, MCF-7). Las células se recogieron 24 horas después de la transfección en tampón de lisis pasiva y la actividad de luciferasa se midió de acuerdo con un protocolo estándar (Promega, Sistema de Ensayo Indicador de Luciferasa Dual). La inducción de la actividad de luciferasa se usó para demostrar el efecto funcional de LNA-antimiR™ para antagonizar miR-21.

25 Ejemplo 29: Ensayo indicador de luciferasa para evaluar la inhibición funcional de microARN mediante LNA-antimiR y otros oligos dirigidos a microARN: Generalización del nuevo diseño mejorado como diseño preferido para bloquear la función de microARN

30 Los oligos usados en este ejemplo (mayúsculas: LNA, minúsculas: ADN) para evaluar el efecto de la desrepresión de LNA-antimiR en el indicador de luciferasa con la secuencia diana de microARN clonada bloqueando el microARN respectivo:

diana: hsa-miR-122a MIMAT0000421	
uggagugugacaaugguguuugu	
explorada en la línea celular HUH-7 que expresa miR-122	
n.º de oligo, microARN diana, secuencia de oligo	Diseño
3962: miR-122 5'-ACAAacaccattgtcacacTCCA-3'	Complemento completo, hueco
3965: miR-122 5'-acaaacACCATTGTcacactcca-3'	Complemento completo, bloque
3972: miR-122 5'-acAaaCacCatTgtCacActCca-3'	Complemento completo, LNA_3
3549 (3649):miR-122 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3'	Nuevo diseño
3975: miR-122 5'-CcAtTGTcaCACtCC-3'	Nuevo diseño mejorado
diana: hsa-miR-19b MIMAT0000074	
ugugcaaauccaugcaaaacuga	
explorada en la línea celular HeLa que expresa miR-19b	
n.º de oligo, microARN diana, secuencia de oligo	Diseño
3963: miR-19b 5'-TCAGttttgcatggattgCACA-3'	Complemento completo, hueco
3967: miR-19b 5'-tcagttTTGCATGGattgcaca-3'	Complemento completo, bloque
3973: miR-19b 5'-tcAgTttGcaTggAttTgcAca-3'	Complemento completo, LNA_3
3560: miR-19b 5'-TgCatGGatTtGcAC-3'	Nuevo diseño
3976: miR-19b 5'-TgCaTGGatTTGcAC-3'	Nuevo diseño mejorado

uuaaugcuaaucgugauagggg	
explorada en la línea celular 518A2 que expresa miR-155	
n.º de oligo, microARN diana, secuencia de oligo	Diseño
3964: miR-155 5'-CCCtcatcacgattagcaTTAA-3'	Complemento completo, hueco
3968: miR-155 5'-cccctaTCACGATTgacattaa-3'	Complemento completo, bloque
3974: miR-155 5'-cCccTatCacGatTagCatTaa-3'	Complemento completo, LNA_3
3758: miR-155 5'-TcAcgATtaGcAtTA-3'	Nuevo diseño
3818: miR-155 5'-TcAcGATtaGCAtTA-3'	Nuevo diseño mejorado
SEQ ID NO como en los casos anteriores.	

Se modificó por ingeniería genética un plásmido indicador (psiCheck-2, Promega) que codifica las variantes de luciferasa tanto de renilla como de luciérnaga, de tal forma que la 3'UTR de la luciferasa de renilla incluye una sola copia de una secuencia completamente complementaria al miARN que se está investigando.

Las células que expresan de manera endógena los miARN investigados (Huh-7 para miR-122a, HeLa para miR-19b, 518A2 para miR-155) se cotransfectaron con LNA-antimiR u otros oligonucleótidos de unión a miR (el complementario completo, es decir, de longitud completa) y el plásmido indicador diana de microARN correspondiente usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Se llevaron a cabo la transfección y la medición de la actividad de luciferasa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Lipofectamine 2000 de Invitrogen/kit de luciferasa dual de Promega) usando de 150 000 a 300 000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Para compensar las diversas densidades celulares y la eficacia de la transfección, se normalizó la señal de luciferasa de renilla con la señal de luciferasa de luciérnaga. Todos los experimentos se efectuaron por triplicado.

Sorprendentemente, el nuevo diseño y el nuevo diseño mejorado fueron los mejores inhibidores funcionales para las tres dianas de microARN, miR-155, miR-19b y miR-122 (figura 27, 28, 29). Los resultados se resumen en la tabla 3 a continuación.

Resumen de resultados:

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

Diseño	miR-155	miR-19b	miR-122a
Nuevo diseño mejorado	***	***	sin datos
Nuevo diseño	***	***	***
Complemento completo, LNA_3	**	***	**
Complemento completo, bloque	**	**	**
Complemento completo, hueco	*	no significativo.	no significativo.

Ejemplo 30: Diseño de una biblioteca de LNA-antimiR para todas las secuencias de microARN humanas en la base de datos de microARN miRBase, versión 8.1, Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., Enright, A.J. 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. Nucleic Acids Res. 34: D140-4 (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>).

Los nucleótidos de LNA se muestran en letras mayúsculas, los nucleótidos de ADN en letras minúsculas, los nucleótidos de C de LNA indican metil-C (mC) de LNA. Los oligonucleótidos de LNA-antimiR pueden conjugarse con una variedad de haptenos o fluorocromos para monitorizar la captación en células y tejidos usando métodos convencionales.

Tabla 2 (SEQ ID NO se refiere al ejemplo de antimiR)

microARN	N.º de referencia	SEQ ID NO	Ejemplo de LNA antimiR 5'-3'
hsa-let-7a	MIMAT0000062	SEQ ID NO 1	AcAacCTacTaCcTC
hsa-let-7b	MIMAT0000063	SEQ ID NO 2	AcAacCTacTaCcTC
hsa-let-7c	MIMAT0000064	SEQ ID NO 3	AcAacCTacTaCcTC
hsa-let-7d	MIMAT0000065	SEQ ID NO 4	GcAacCTacTaCcTC
hsa-let-7e	MIMAT0000066	SEQ ID NO 5	AcAacCTccTaCcTC
hsa-let-7f	MIMAT0000067	SEQ ID NO 6	AcAatCTacTaCcTC
hsa-miR-15a	MIMAT0000068	SEQ ID NO 7	CcAttATgtGcTgCT

ES 2 715 625 T3

microARN	N.º de referencia	SEQ ID NO	Ejemplo de LNA anti-miR 5'-3'
hsa-miR-16	MIMAT0000069	SEQ ID NO 8	TaTttACgtGcTgCT
hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	SEQ ID NO 9	CaCtgTAagCaCtTT
hsa-miR-17-3p	MIMAT0000071	SEQ ID NO 10	GtGccTTcaCtGcAG
hsa-miR-18a	MIMAT0000072	SEQ ID NO 11	CaCtaGAtgCaCcTT
hsa-miR-19a	MIMAT0000073	SEQ ID NO 12	TgCatAGatTtGcAC
hsa-miR-19b	MIMAT0000074	SEQ ID NO 13	TgCatGGatTtGcAC
hsa-miR-20a	MIMAT0000075	SEQ ID NO 14	CaCtaTAagCaCtTT
hsa-miR-21	MIMAT0000076	SEQ ID NO 15	TcAgtCTgaTaAgCT
hsa-miR-22	MIMAT0000077	SEQ ID NO 16	CtTcaACTgGcAgCT
hsa-miR-23a	MIMAT0000078	SEQ ID NO 17	TcCctGGcaAtGtGA
hsa-miR-189	MIMAT0000079	SEQ ID NO 18	TcAgtTCagTaGgCA
hsa-miR-24	MIMAT0000080	SEQ ID NO 19	CtGctGAacTgAgCC
hsa-miR-25	MIMAT0000081	SEQ ID NO 20	CgAgaCAagTgCaAT
hsa-miR-26a	MIMAT0000082	SEQ ID NO 21	TcCtgGAttAcTtGA
hsa-miR-26b	MIMAT0000083	SEQ ID NO 22	TcCtgAAttAcTtGA
hsa-miR-27a	MIMAT0000084	SEQ ID NO 23	AcTtaGCcaCtGtGA
hsa-miR-28	MIMAT0000085	SEQ ID NO 24	AgActGTgaGcTcCT
hsa-miR-29a	MIMAT0000086	SEQ ID NO 25	AtTtcAGatGgTgCT
hsa-miR-30a-5p	MIMAT0000087	SEQ ID NO 26	GtCgaGGatGtTtAC
hsa-miR-30a-3p	MIMAT0000088	SEQ ID NO 27	AaCatCCgaCtGaAA
hsa-miR-31	MIMAT0000089	SEQ ID NO 28	AtGccAGcaTcTtGC
hsa-miR-32	MIMAT0000090	SEQ ID NO 29	TtAgtAAtgTgCaAT
hsa-miR-33	MIMAT0000091	SEQ ID NO 30	TgCaaCTacAaTgCA
hsa-miR-92	MIMAT0000092	SEQ ID NO 31	CgGgaCAagTgCaAT
hsa-miR-93	MIMAT0000093	SEQ ID NO 32	GcAcgAAcaGcAcTT
hsa-miR-95	MIMAT0000094	SEQ ID NO 33	AtAaaTaccCgTtGA
hsa-miR-96	MIMAT0000095	SEQ ID NO 34	AtGtgCTagTgCcAA
hsa-miR-98	MIMAT0000096	SEQ ID NO 35	AcAacTTacTaCcTC
hsa-miR-99a	MIMAT0000097	SEQ ID NO 36	AtCggATctAcGgGT
hsa-miR-100	MIMAT0000098	SEQ ID NO 37	TtCggATctAcGgGT
hsa-miR-101	MIMAT0000099	SEQ ID NO 38	TtAtcACagTaCtGT
hsa-miR-29b	MIMAT0000100	SEQ ID NO 39	AtTtcAAatGgTgCT
hsa-miR-103	MIMAT0000101	SEQ ID NO 40	CcTgtACaaTgCtGC
hsa-miR-105	MIMAT0000102	SEQ ID NO 41	GaGtcTGagCaTtTG
hsa-miR-106a	MIMAT0000103	SEQ ID NO 42	CaCtgTAagCaCtTT
hsa-miR-107	MIMAT0000104	SEQ ID NO 43	CcTgtACaaTgCtGC
hsa-miR-192	MIMAT0000222	SEQ ID NO 44	TcAatTCatAgGtCA
hsa-miR-196a	MIMAT0000226	SEQ ID NO 45	AaCatGAaaCtAcCT
hsa-miR-197	MIMAT0000227	SEQ ID NO 46	TgGagAAGgTgGtGA
hsa-miR-198	MIMAT0000228	SEQ ID NO 47	AtCtcCCctCtGgAC
hsa-miR-199a	MIMAT0000231	SEQ ID NO 48	TaGtcTGaaCaCtGG
hsa-miR-199a*	MIMAT0000232	SEQ ID NO 49	TgTgcAGacTaCtGT
hsa-miR-208	MIMAT0000241	SEQ ID NO 50	TtTttGCtcGtCtTA
hsa-miR-129	MIMAT0000242	SEQ ID NO 51	CcCagACcgCaAaAA
hsa-miR-148a	MIMAT0000243	SEQ ID NO 52	TtCtgTAgTgCacTG
hsa-miR-30c	MIMAT0000244	SEQ ID NO 53	GtGtaGGatGtTtAC
hsa-miR-30d	MIMAT0000245	SEQ ID NO 54	GtCggGGatGtTtAC
hsa-miR-139	MIMAT0000250	SEQ ID NO 55	AcAcgTGcaCtGtAG
hsa-miR-147	MIMAT0000251	SEQ ID NO 56	AaGcaTTtcCaCaCA
hsa-miR-7	MIMAT0000252	SEQ ID NO 57	AaTcaCTagTcTtCC
hsa-miR-10a	MIMAT0000253	SEQ ID NO 58	TcGgaTcCaCaGgGT
hsa-miR-10b	MIMAT0000254	SEQ ID NO 59	TcGgtTcCaCaGgGT
hsa-miR-34a	MIMAT0000255	SEQ ID NO 60	AgCtaAGacAcTgCC
hsa-miR-181a	MIMAT0000256	SEQ ID NO 61	GaCagCGttGaAtGT
hsa-miR-181b	MIMAT0000257	SEQ ID NO 62	GaCagCAatGaAtGT
hsa-miR-181c	MIMAT0000258	SEQ ID NO 63	CgAcaGGttGaAtGT
hsa-miR-182	MIMAT0000259	SEQ ID NO 64	TtCtaCCatTgCcAA
hsa-miR-182*	MIMAT0000260	SEQ ID NO 65	GgCaaGTctAgAaCC
hsa-miR-183	MIMAT0000261	SEQ ID NO 66	TtCtaCCagTgCcAT
hsa-miR-187	MIMAT0000262	SEQ ID NO 67	GcAacACaaGaCaCG
hsa-miR-199b	MIMAT0000263	SEQ ID NO 68	TaGtcTaaaCaCtGG
hsa-miR-203	MIMAT0000264	SEQ ID NO 69	GtCctAAacAtTtCA
hsa-miR-204	MIMAT0000265	SEQ ID NO 70	AgGatGAcAaGgGA
hsa-miR-205	MIMAT0000266	SEQ ID NO 71	CcGgtGGaaTgAaGG
hsa-miR-210	MIMAT0000267	SEQ ID NO 72	GcTgtCAcaCgCaCA

ES 2 715 625 T3

microARN	N.º de referencia	SEQ ID NO	Ejemplo de LNA anti-miR 5'-3'
hsa-miR-211	MIMAT0000268	SEQ ID NO 73	AgGatGAcaAaGgGA
hsa-miR-212	MIMAT0000269	SEQ ID NO 74	TgActGGagAcTgTT
hsa-miR-181a*	MIMAT0000270	SEQ ID NO 75	AtCaaCGgtCgAtGG
hsa-miR-214	MIMAT0000271	SEQ ID NO 76	TgTctGTgcCtGcTG
hsa-miR-215	MIMAT0000272	SEQ ID NO 77	TcAatTCatAgGtCA
hsa-miR-216	MIMAT0000273	SEQ ID NO 78	TtGccAGctGaGaTT
hsa-miR-217	MIMAT0000274	SEQ ID NO 79	AgTtcCTgaTgCaGT
hsa-miR-218	MIMAT0000275	SEQ ID NO 80	GtTagATcaAgCaCA
hsa-miR-219	MIMAT0000276	SEQ ID NO 81	TgCgtTTggAcAaTC
hsa-miR-220	MIMAT0000277	SEQ ID NO 82	GtCagATacGgTgTG
hsa-miR-221	MIMAT0000278	SEQ ID NO 83	AgCagACaaTgTaGC
hsa-miR-222	MIMAT0000279	SEQ ID NO 84	GtAgcCAgaTgTaGC
hsa-miR-223	MIMAT0000280	SEQ ID NO 85	AtTtgACaaTgAcAC
hsa-miR-224	MIMAT0000281	SEQ ID NO 86	AaCcaCTagTgAcTT
hsa-miR-200b	MIMAT0000318	SEQ ID NO 87	TtAccAGgcAgTaTT
hsa-let-7 g	MIMAT0000414	SEQ ID NO 88	AcAaaCTacTaCcTC
hsa-let-7i	MIMAT0000415	SEQ ID NO 89	AcAaaCTacTaCcTC
hsa-miR-1	MIMAT0000416	SEQ ID NO 90	AcTtcTTtaCaTtCC
hsa-miR-15b	MIMAT0000417	SEQ ID NO 91	CcAtgATgtGcTgCT
hsa-miR-23b	MIMAT0000418	SEQ ID NO 92	TcCctGGcaAtGtGA
hsa-miR-27b	MIMAT0000419	SEQ ID NO 93	AcTtaGCcaCtGtGA
hsa-miR-30b	MIMAT0000420	SEQ ID NO 94	GtGtaGGatGtTtAC
hsa-miR-122a	MIMAT0000421	SEQ ID NO 95	CcAttGTcaCaCtCC
hsa-miR-124a	MIMAT0000422	SEQ ID NO 96	TcAccGCgtGcCtTA
hsa-miR-125b	MIMAT0000423	SEQ ID NO 97	GtTagGGtcTcAgGG
hsa-miR-128a	MIMAT0000424	SEQ ID NO 98	GaCcgGTtcAcTgTG
hsa-miR-130a	MIMAT0000425	SEQ ID NO 99	TtTtaACatTgCaCT
hsa-miR-132	MIMAT0000426	SEQ ID NO 100	TgGctGTtagAcTgTT
hsa-miR-133a	MIMAT0000427	SEQ ID NO 101	GgTtgAaggGgAcCA
hsa-miR-135a	MIMAT0000428	SEQ ID NO 102	GgAatAAaaAgCcAT
hsa-miR-137	MIMAT0000429	SEQ ID NO 103	GtAttCTtaAgCaAT
hsa-miR-138	MIMAT0000430	SEQ ID NO 104	AtTcaCAacAcCaGC
hsa-miR-140	MIMAT0000431	SEQ ID NO 105	AtAggGTaaAaCcAC
hsa-miR-141	MIMAT0000432	SEQ ID NO 106	TtAccAGacAgTgTT
hsa-miR-142-5p	MIMAT0000433	SEQ ID NO 107	TgCttTctaCtTtAT
hsa-miR-142-3p	MIMAT0000434	SEQ ID NO 108	AgTagGAaaCaCtAC
hsa-miR-143	MIMAT0000435	SEQ ID NO 109	AcAgtGCttCaTcTC
hsa-miR-144	MIMAT0000436	SEQ ID NO 110	CaTcaTCtaTaCtGT
hsa-miR-145	MIMAT0000437	SEQ ID NO 111	CcTggGAaaAcTgGA
hsa-miR-152	MIMAT0000438	SEQ ID NO 112	TtCtgTCatGcAcTG
hsa-miR-153	MIMAT0000439	SEQ ID NO 113	TtTtgTGacTaTgCA
hsa-miR-191	MIMAT0000440	SEQ ID NO 114	TtTtgGGatTcCgTT
hsa-miR-9	MIMAT0000441	SEQ ID NO 115	GcTagATaaCcAaAG
hsa-miR-9*	MIMAT0000442	SEQ ID NO 116	CgGttATctAgCtTT
hsa-miR-125a	MIMAT0000443	SEQ ID NO 117	TaAagGGtcTcAgGG
hsa-miR-126*	MIMAT0000444	SEQ ID NO 118	AcCaaAAgtAaTaAT
hsa-miR-126	MIMAT0000445	SEQ ID NO 119	AtTactCacGgTaCG
hsa-miR-127	MIMAT0000446	SEQ ID NO 120	GcTcaGAcgGaTcCG
hsa-miR-134	MIMAT0000447	SEQ ID NO 121	TgGtcAAccAgTcAC
hsa-miR-136	MIMAT0000448	SEQ ID NO 122	TcAaaACaaAtGgAG
hsa-miR-146a	MIMAT0000449	SEQ ID NO 123	TgGaaTTcaGtTcTC
hsa-miR-149	MIMAT0000450	SEQ ID NO 124	AaGacACggAgCcAG
hsa-miR-150	MIMAT0000451	SEQ ID NO 125	TaCaaGGgtTgGgAG
hsa-miR-154	MIMAT0000452	SEQ ID NO 126	CaAcaCGgaTaAcCT
hsa-miR-154*	MIMAT0000453	SEQ ID NO 127	TcAacCGtgTaTgAT
hsa-miR-184	MIMAT0000454	SEQ ID NO 128	AtCagTTctCcGtCC
hsa-miR-185	MIMAT0000455	SEQ ID NO 129	AcTgcCTttCtCtCC
hsa-miR-186	MIMAT0000456	SEQ ID NO 130	AaAggAGaaTtCtTT
hsa-miR-188	MIMAT0000457	SEQ ID NO 131	CaCcaTGcaAgGgAT
hsa-miR-190	MIMAT0000458	SEQ ID NO 132	TaTatCAaaCaTaTC
hsa-miR-193a	MIMAT0000459	SEQ ID NO 133	AcTttGTtagGcCaGT
hsa-miR-194	MIMAT0000460	SEQ ID NO 134	TgGagTTgcTgTtAC
hsa-miR-195	MIMAT0000461	SEQ ID NO 135	TaTtCTgtGcTgCT
hsa-miR-206	MIMAT0000462	SEQ ID NO 136	AcTtcCTtaCaTtCC
hsa-miR-320	MIMAT0000510	SEQ ID NO 137	TcTcaACccAgCtTT

ES 2 715 625 T3

microARN	N.º de referencia	SEQ ID NO	Ejemplo de LNA anti-miR 5'-3'
hsa-miR-200c	MIMAT0000617	SEQ ID NO 138	TtAccCGgcAgTaTT
hsa-miR-155	MIMAT0000646	SEQ ID NO 139	TcAcgATtaGcAtTA
hsa-miR-128b	MIMAT0000676	SEQ ID NO 140	GaCcgGTtcAcTgTG
hsa-miR-106b	MIMAT0000680	SEQ ID NO 141	CaCtgTCagCaCtTT
hsa-miR-29c	MIMAT0000681	SEQ ID NO 142	AtTtcAAatGgTgCT
hsa-miR-200a	MIMAT0000682	SEQ ID NO 143	TtAccAGacAgTgTT
hsa-miR-302a*	MIMAT0000683	SEQ ID NO 144	AgTacATccAcGtTT
hsa-miR-302a	MIMAT0000684	SEQ ID NO 145	AaCatGGaaGcAcTT
hsa-miR-34b	MIMAT0000685	SEQ ID NO 146	CtAatGAcA CtGcCT
hsa-miR-34c	MIMAT0000686	SEQ ID NO 147	GcTaaCTacAcTgCC
hsa-miR-299-3p	MIMAT0000687	SEQ ID NO 148	TtTacCAtcCcAcAT
hsa-miR-301	MIMAT0000688	SEQ ID NO 149	CaAtaCTatTgCaCT
hsa-miR-99b	MIMAT0000689	SEQ ID NO 150	GtCggTTctAcGgGT
hsa-miR-296	MIMAT0000690	SEQ ID NO 151	AtTgaGGggGgGcCC
hsa-miR-130b	MIMAT0000691	SEQ ID NO 152	TtTcaTCatTgCaCT
hsa-miR-30e-5p	MIMAT0000692	SEQ ID NO 153	GtCaaGGatGtTtAC
hsa-miR-30e-3p	MIMAT0000693	SEQ ID NO 154	AaCatCCgaCtGaAA
hsa-miR-361	MIMAT0000703	SEQ ID NO 155	CtGgaGAttCtGaTA
hsa-miR-362	MIMAT0000705	SEQ ID NO 156	CtAggTTccAaGgAT
hsa-miR-363	MIMAT0000707	SEQ ID NO 157	TgGatACcgTgCaAT
hsa-miR-365	MIMAT0000710	SEQ ID NO 158	AtTttTAggGgCaTT
hsa-miR-302b*	MIMAT0000714	SEQ ID NO 159	AcTtcCAtgTtAaAG
hsa-miR-302b	MIMAT0000715	SEQ ID NO 160	AaCatGGaaGcAcTT
hsa-miR-302c*	MIMAT0000716	SEQ ID NO 161	GtAccCCcaTgTtAA
hsa-miR-302c	MIMAT0000717	SEQ ID NO 162	AaCatGGaaGcAcTT
hsa-miR-302d	MIMAT0000718	SEQ ID NO 163	AaCatGGaaGcAcTT
hsa-miR-367	MIMAT0000719	SEQ ID NO 164	TtGctAAagTgCaAT
hsa-miR-368	MIMAT0000720	SEQ ID NO 165	GgAatTTccTcTaTG
hsa-miR-369-3p	MIMAT0000721	SEQ ID NO 166	TcAacCAtgTaTtAT
hsa-miR-370	MIMAT0000722	SEQ ID NO 167	TtCcaCCccAgCaGG
hsa-miR-371	MIMAT0000723	SEQ ID NO 168	CaAaaGAtgGcGgCA
hsa-miR-372	MIMAT0000724	SEQ ID NO 169	AaTgtCGcaGcAcTT
hsa-miR-373*	MIMAT0000725	SEQ ID NO 170	CgCccCCatTtTgAG
hsa-miR-373	MIMAT0000726	SEQ ID NO 171	AaAatCGaaGcAcTT
hsa-miR-374	MIMAT0000727	SEQ ID NO 172	TcAggTTgTAtTaTA
hsa-miR-375	MIMAT0000728	SEQ ID NO 173	GaGccGAacGaAcAA
hsa-miR-376a	MIMAT0000729	SEQ ID NO 174	GaTttTCctCtAtGA
hsa-miR-377	MIMAT0000730	SEQ ID NO 175	GtTgcCTttGtGtGA
hsa-miR-378	MIMAT0000731	SEQ ID NO 176	GaCctGGagTcAgGA
hsa-miR-422b	MIMAT0000732	SEQ ID NO 177	CtGacTCcaAgTcCA
hsa-miR-379	MIMAT0000733	SEQ ID NO 178	GtTccATagTcTaCC
hsa-miR-380-5p	MIMAT0000734	SEQ ID NO 179	GtTctATggTcAaCC
hsa-miR-380-3p	MIMAT0000735	SEQ ID NO 180	TgGacCAtaTtAcAT
hsa-miR-381	MIMAT0000736	SEQ ID NO 181	AgCttGCCcTtGtAT
hsa-miR-382	MIMAT0000737	SEQ ID NO 182	CaCcaCGaaCaAcTT
hsa-miR-383	MIMAT0000738	SEQ ID NO 183	AaTcaCCtCtGaTC
hsa-miR-340	MIMAT0000750	SEQ ID NO 184	AaGtaACTgAgAcGG
hsa-miR-330	MIMAT0000751	SEQ ID NO 185	AgGccGTgtGcTtTG
hsa-miR-328	MIMAT0000752	SEQ ID NO 186	GgGcaGAgGgGcCA
hsa-miR-342	MIMAT0000753	SEQ ID NO 187	CgAttTCtgTgAG
hsa-miR-337	MIMAT0000754	SEQ ID NO 188	TcAtaTAggAgCtGG
hsa-miR-323	MIMAT0000755	SEQ ID NO 189	CgAccGTgtAaTgTG
hsa-miR-326	MIMAT0000756	SEQ ID NO 190	AgGaaGGgcCcAgAG
hsa-miR-151	MIMAT0000757	SEQ ID NO 191	GgAgcTTcaGtCtAG
hsa-miR-135b	MIMAT0000758	SEQ ID NO 192	GgAatGAaaAgCcAT
hsa-miR-148b	MIMAT0000759	SEQ ID NO 193	TtCtgTGatGAcTG
hsa-miR-331	MIMAT0000760	SEQ ID NO 194	GgAtaGGccCaGgGG
hsa-miR-324-5p	MIMAT0000761	SEQ ID NO 195	TgCccTAggGgAtGC
hsa-miR-324-3p	MIMAT0000762	SEQ ID NO 196	GcAccTggGcAgTG
hsa-miR-338	MIMAT0000763	SEQ ID NO 197	AaTcaCTgaTgCtGG
hsa-miR-339	MIMAT0000764	SEQ ID NO 198	TcCtgGAggAcAgGG
hsa-miR-335	MIMAT0000765	SEQ ID NO 199	TcGttATtgCtCtTG
hsa-miR-133b	MIMAT0000770	SEQ ID NO 200	GgTtgAAggGgAcCA
hsa-miR-325	MIMAT0000771	SEQ ID NO 201	CtGgaCAccTaCtAG
hsa-miR-345	MIMAT0000772	SEQ ID NO 202	GgActAGgaGtCaGC

ES 2 715 625 T3

microARN	N.º de referencia	SEQ ID NO	Ejemplo de LNA anti-miR 5'-3'
hsa-miR-346	MIMAT0000773	SEQ ID NO 203	GgCatGCggGcAgAC
ebv-miR-BHRF1-1	MIMAT0000995	SEQ ID NO 204	GgGgcTGatCaGgTT
ebv-miR-BHRF1-2*	MIMAT0000996	SEQ ID NO 205	TgCtgCAacAgAaTT
ebv-miR-BHRF1-2	MIMAT0000997	SEQ ID NO 206	TcTgcCGcaAaAgAT
ebv-miR-BHRF1-3	MIMAT0000998	SEQ ID NO 207	TaCacACttCcCgTT
ebv-miR-BART1-5p	MIMAT0000999	SEQ ID NO 208	GtCacTTccAcTaAG
ebv-miR-BART2	MIMAT0001000	SEQ ID NO 209	GcGaaTGcaGaAaAT
hsa-miR-384	MIMAT0001075	SEQ ID NO 210	AaCaaTTtcTaGgAA
hsa-miR-196b	MIMAT0001080	SEQ ID NO 211	AaCagGAaaCtAcCT
hsa-miR-422a	MIMAT0001339	SEQ ID NO 212	CtGacCCtaAgTcCA
hsa-miR-423	MIMAT0001340	SEQ ID NO 213	GgCctCAgaCcGaGC
hsa-miR-424	MIMAT0001341	SEQ ID NO 214	AcAtgAAttGcTgCT
hsa-miR-425-3p	MIMAT0001343	SEQ ID NO 215	AcAcgACatTcCcGA
hsa-miR-18b	MIMAT0001412	SEQ ID NO 216	CaCtaGAtgCaCcTT
hsa-miR-20b	MIMAT0001413	SEQ ID NO 217	CaCtaTGagCaCtTT
hsa-miR-448	MIMAT0001532	SEQ ID NO 218	CaTccTAcTaTgCA
hsa-miR-429	MIMAT0001536	SEQ ID NO 219	TtAccAGacAgTaTT
hsa-miR-449	MIMAT0001541	SEQ ID NO 220	TaAcaATacAcTgCC
hsa-miR-450	MIMAT0001545	SEQ ID NO 221	GaAcaCAtcGcAaAA
hcmv-miR-UL22A	MIMAT0001574	SEQ ID NO 222	AcGggAAggCtAgTT
hcmv-miR-UL22A*	MIMAT0001575	SEQ ID NO 223	AcTagCAttCtGgTG
hcmv-miR-UL36	MIMAT0001576	SEQ ID NO 224	CaGgtGTctTcAaCG
hcmv-miR-UL112	MIMAT0001577	SEQ ID NO 225	GaTctCAccGtCaCT
hcmv-miR-UL148D	MIMAT0001578	SEQ ID NO 226	AaGaaGGggAgGaCG
hcmv-miR-US5-1	MIMAT0001579	SEQ ID NO 227	CtCgtCAggCtTgTC
hcmv-miR-US5-2	MIMAT0001580	SEQ ID NO 228	GtCacACctAtCaTA
hcmv-miR-US25-1	MIMAT0001581	SEQ ID NO 229	GaGccACtgAgCgGT
hcmv-miR-US25-2-5p	MIMAT0001582	SEQ ID NO 230	AcCtgAAcaGaCcGC
hcmv-miR-US25-2-3p	MIMAT0001583	SEQ ID NO 231	AgCtcTccaAgTgGA
hcmv-miR-US33	MIMAT0001584	SEQ ID NO 232	CgGtcCGggCaCaAT
hsa-miR-191*	MIMAT0001618	SEQ ID NO 233	GaAatCCaaGcGcAG
hsa-miR-200a*	MIMAT0001620	SEQ ID NO 234	AcTgtCCggTaAgAT
hsa-miR-369-5p	MIMAT0001621	SEQ ID NO 235	AtAacACggTcGaTC
hsa-miR-431	MIMAT0001625	SEQ ID NO 236	GaCggCCtgCaAgAC
hsa-miR-433	MIMAT0001627	SEQ ID NO 237	AgGagCCcaTcAtGA
hsa-miR-329	MIMAT0001629	SEQ ID NO 238	GtTaaCCagGtGtGT
hsa-miR-453	MIMAT0001630	SEQ ID NO 239	CaCcaCGgaCaAcCT
hsa-miR-451	MIMAT0001631	SEQ ID NO 240	GtAatGGtaAcGgTT
hsa-miR-452	MIMAT0001635	SEQ ID NO 241	GtTtcCTctGcAaAC
hsa-miR-452*	MIMAT0001636	SEQ ID NO 242	TtGcaGAtgAgAcTG
hsa-miR-409-5p	MIMAT0001638	SEQ ID NO 243	GtTgcTCggGtAaCC
hsa-miR-409-3p	MIMAT0001639	SEQ ID NO 244	CaCcgAGcaAcAtTC
hsa-miR-412	MIMAT0002170	SEQ ID NO 245	GtGgaCCagGtGaAG
hsa-miR-410	MIMAT0002171	SEQ ID NO 246	CcAtcTGtgTtAtAT
hsa-miR-376b	MIMAT0002172	SEQ ID NO 247	GaTttTCctCtAtGA
hsa-miR-483	MIMAT0002173	SEQ ID NO 248	GgGagGAgGgAgTG
hsa-miR-484	MIMAT0002174	SEQ ID NO 249	AgGggACtgAgCcTG
hsa-miR-485-5p	MIMAT0002175	SEQ ID NO 250	AtCacGGccAgCcTC
hsa-miR-485-3p	MIMAT0002176	SEQ ID NO 251	GaGagCCgtGtAtGA
hsa-miR-486	MIMAT0002177	SEQ ID NO 252	GcAgcTCagTaCaGG
hsa-miR-487a	MIMAT0002178	SEQ ID NO 253	AtGtcCCtgTaTgAT
kshv-miR-K12-10a	MIMAT0002179	SEQ ID NO 254	CgGggGGacAaCaCT
kshv-miR-K12-10b	MIMAT0002180	SEQ ID NO 255	CgGggGGacAaCaCC
kshv-miR-K12-11	MIMAT0002181	SEQ ID NO 256	AcAggCTaaGcAtTA
kshv-miR-K12-1	MIMAT0002182	SEQ ID NO 257	CcCagTTtcCtGtAA
kshv-miR-K12-2	MIMAT0002183	SEQ ID NO 258	GaCccGGcaTaCaGT
kshv-miR-K12-9*	MIMAT0002184	SEQ ID NO 259	GtTtaCGcaGcTgGG
kshv-miR-K12-9	MIMAT0002185	SEQ ID NO 260	AgCtgCGtaTaCcCA
kshv-miR-K12-8	MIMAT0002186	SEQ ID NO 261	CtCtcAGtcGcGcCT
kshv-miR-K12-7	MIMAT0002187	SEQ ID NO 262	CaGcaACatGgGaTC
kshv-miR-K12-6-5p	MIMAT0002188	SEQ ID NO 263	GaTtaGGtgCtGcTG
kshv-miR-K12-6-3p	MIMAT0002189	SEQ ID NO 264	AgCccGAaaAcCaTC
kshv-miR-K12-5	MIMAT0002190	SEQ ID NO 265	AgTtcCaggCaTcCT
kshv-miR-K12-4-5p	MIMAT0002191	SEQ ID NO 266	GtActGCggTtTaGC
kshv-miR-K12-4-3p	MIMAT0002192	SEQ ID NO 267	AgGccTCagTaTtCT

ES 2 715 625 T3

microARN	N.º de referencia	SEQ ID NO	Ejemplo de LNA anti-miR 5'-3'
kshv-miR-K12-3	MIMAT0002193	SEQ ID NO 268	CgTccTCagAaTgTG
kshv-miR-K12-3*	MIMAT0002194	SEQ ID NO 269	CaTtcTGtgAcCgCG
hsa-miR-488	MIMAT0002804	SEQ ID NO 270	AgTgcCAAttAtCtGG
hsa-miR-489	MIMAT0002805	SEQ ID NO 271	TaTatGTgaTgTcAC
hsa-miR-490	MIMAT0002806	SEQ ID NO 272	GgAgtCCtcCaGgTT
hsa-miR-491	MIMAT0002807	SEQ ID NO 273	GgAagGGttCcCcaC
hsa-miR-511	MIMAT0002808	SEQ ID NO 274	GcAgaGCaaAaGaCA
hsa-miR-146b	MIMAT0002809	SEQ ID NO 275	TgGaaTTcaGtTcTC
hsa-miR-202*	MIMAT0002810	SEQ ID NO 276	GtAtaTGcaTaGgAA
hsa-miR-202	MIMAT0002811	SEQ ID NO 277	CaTgcCCtaTaCcTC
hsa-miR-492	MIMAT0002812	SEQ ID NO 278	TtGtcCCgcAgGtCC
hsa-miR-493-5p	MIMAT0002813	SEQ ID NO 279	AgCctACcaTgTaCA
hsa-miR-432	MIMAT0002814	SEQ ID NO 280	AtGacCTacTcCaAG
hsa-miR-432*	MIMAT0002815	SEQ ID NO 281	TgGagGAgcCaTcCA
hsa-miR-494	MIMAT0002816	SEQ ID NO 282	TcCcgTGtaTgTtTC
hsa-miR-495	MIMAT0002817	SEQ ID NO 283	TgCacCAtgTtTgTT
hsa-miR-496	MIMAT0002818	SEQ ID NO 284	AgAttGGccAtGtAA
hsa-miR-193b	MIMAT0002819	SEQ ID NO 285	AcTttGAggGcCaGT
hsa-miR-497	MIMAT0002820	SEQ ID NO 286	CcAcaGTgtGcTgCT
hsa-miR-181d	MIMAT0002821	SEQ ID NO 287	GaCaaCAatGaAtGT
hsa-miR-512-5p	MIMAT0002822	SEQ ID NO 288	CcCtcAAGgCtGgGT
hsa-miR-512-3p	MIMAT0002823	SEQ ID NO 289	AgCtaTGacAgCaCT
hsa-miR-498	MIMAT0002824	SEQ ID NO 290	GcCccCTggCtTgAA
hsa-miR-520e	MIMAT0002825	SEQ ID NO 291	AaAaaGGaaGcAcTT
hsa-miR-515-5p	MIMAT0002826	SEQ ID NO 292	GcTttCTttTgGaGA
hsa-miR-515-3p	MIMAT0002827	SEQ ID NO 293	CcAaaAGaaGgCaCT
hsa-miR-519e*	MIMAT0002828	SEQ ID NO 294	GcTccCTttTgGaGA
hsa-miR-519e	MIMAT0002829	SEQ ID NO 295	TaAaaGGagGcAcTT
hsa-miR-520f	MIMAT0002830	SEQ ID NO 296	CtAaaAGgaAgCaCT
hsa-miR-526c	MIMAT0002831	SEQ ID NO 297	GcGctTCccTcTaGA
hsa-miR-519c	MIMAT0002832	SEQ ID NO 298	TaAaaAGatGcAcTT
hsa-miR-520a*	MIMAT0002833	SEQ ID NO 299	GtActTCccTcTgGA
hsa-miR-520a	MIMAT0002834	SEQ ID NO 300	CaAagGGaaGcAcTT
hsa-miR-526b	MIMAT0002835	SEQ ID NO 301	GtGctTCccTcAaGA
hsa-miR-526b*	MIMAT0002836	SEQ ID NO 302	TaAaaGGaaGcAcTT
hsa-miR-519b	MIMAT0002837	SEQ ID NO 303	TaAaaGGatGcAcTT
hsa-miR-525	MIMAT0002838	SEQ ID NO 304	GtGcaTCccTcTgGA
hsa-miR-525*	MIMAT0002839	SEQ ID NO 305	AaAggGAagCgCcTT
hsa-miR-523	MIMAT0002840	SEQ ID NO 306	TaTagGGaaGcGcGT
hsa-miR-518f*	MIMAT0002841	SEQ ID NO 307	GtGctTCccTcTaGA
hsa-miR-518f	MIMAT0002842	SEQ ID NO 308	TaAagAGaaGcGcTT
hsa-miR-520b	MIMAT0002843	SEQ ID NO 309	TaAaaGGaaGcAcTT
hsa-miR-518b	MIMAT0002844	SEQ ID NO 310	AaAggGGagCgCtTT
hsa-miR-526a	MIMAT0002845	SEQ ID NO 311	GtGctTCccTcTaGA
hsa-miR-520c	MIMAT0002846	SEQ ID NO 312	TaAaaGGaaGcAcTT
hsa-miR-518c*	MIMAT0002847	SEQ ID NO 313	TgCttCCctCcAgAG
hsa-miR-518c	MIMAT0002848	SEQ ID NO 314	AaAgaGAagCgCtTT
hsa-miR-524*	MIMAT0002849	SEQ ID NO 315	GtGctTCccTtTgTA
hsa-miR-524	MIMAT0002850	SEQ ID NO 316	AaAggGAagCgCcTT
hsa-miR-517*	MIMAT0002851	SEQ ID NO 317	TgCttCCatCtAgAG
hsa-miR-517a	MIMAT0002852	SEQ ID NO 318	TaAagGGatGcAcGA
hsa-miR-519d	MIMAT0002853	SEQ ID NO 319	AaAggGAagCaCtTT
hsa-miR-521	MIMAT0002854	SEQ ID NO 320	TaAagGGaaGtGcGT
hsa-miR-520d*	MIMAT0002855	SEQ ID NO 321	GgCttCCctTtGtAG
hsa-miR-520d	MIMAT0002856	SEQ ID NO 322	CaAagAGaaGcAcTT
hsa-miR-517b	MIMAT0002857	SEQ ID NO 323	CtAaaGGgaTgCaCG
hsa-miR-520g	MIMAT0002858	SEQ ID NO 324	AaGggAAGcAcTtTG
hsa-miR-516-5p	MIMAT0002859	SEQ ID NO 325	TtCttACctCcAgAT
hsa-miR-516-3p	MIMAT0002860	SEQ ID NO 326	CcTctGAaaGgAaGC
hsa-miR-518e	MIMAT0002861	SEQ ID NO 327	TgAagGGaaGcGcTT
hsa-miR-527	MIMAT0002862	SEQ ID NO 328	GgGctTCccTtTgCA
hsa-miR-518a	MIMAT0002863	SEQ ID NO 329	CaAagGGaaGcGcTT
hsa-miR-518d	MIMAT0002864	SEQ ID NO 330	AaAggGAagCgCtTT
hsa-miR-517c	MIMAT0002866	SEQ ID NO 331	TaAaaGGatGcAcGA
hsa-miR-520h	MIMAT0002867	SEQ ID NO 332	AaGggAAGcAcTtTG

ES 2 715 625 T3

microARN	N.º de referencia	SEQ ID NO	Ejemplo de LNA anti-miR 5'-3'
hsa-miR-522	MIMAT0002868	SEQ ID NO 333	TaAagGGaaCcAtTT
hsa-miR-519a	MIMAT0002869	SEQ ID NO 334	TaAaaGGatGcAcTT
hsa-miR-499	MIMAT0002870	SEQ ID NO 335	TcActGCaaGtCtTA
hsa-miR-500	MIMAT0002871	SEQ ID NO 336	CcTtgCCcaGgTgCA
hsa-miR-501	MIMAT0002872	SEQ ID NO 337	CcAggGAcaAaGgAT
hsa-miR-502	MIMAT0002873	SEQ ID NO 338	CcCagATagCaAgGA
hsa-miR-503	MIMAT0002874	SEQ ID NO 339	AcTgtTCccGcTgCT
hsa-miR-504	MIMAT0002875	SEQ ID NO 340	GtGcaGAccAgGgTC
hsa-miR-505	MIMAT0002876	SEQ ID NO 341	AcCagCAagTgTtGA
hsa-miR-513	MIMAT0002877	SEQ ID NO 342	GaCacCTccCtGtGA
hsa-miR-506	MIMAT0002878	SEQ ID NO 343	TcAgaAGggTgCcTT
hsa-miR-507	MIMAT0002879	SEQ ID NO 344	TcCaaAAGgTgCaAA
hsa-miR-508	MIMAT0002880	SEQ ID NO 345	CaAaaGGctAcAaTC
hsa-miR-509	MIMAT0002881	SEQ ID NO 346	AcAgaCGtaCcAaTC
hsa-miR-510	MIMAT0002882	SEQ ID NO 347	GcCacTCtcCtGaGT
hsa-miR-514	MIMAT0002883	SEQ ID NO 348	TcAcaGAagTgTcAA
hsa-miR-532	MIMAT0002888	SEQ ID NO 349	CtAcaCTcaAgGcAT
hsa-miR-299-5p	MIMAT0002890	SEQ ID NO 350	GtGggACggTaAaCC
hsa-miR-18a*	MIMAT0002891	SEQ ID NO 351	GaGcaCTtaGgGcAG
hsa-miR-455	MIMAT0003150	SEQ ID NO 352	AgTccAAagGcAcAT
hsa-miR-493-3p	MIMAT0003161	SEQ ID NO 353	AcAcaGTagAcCtTC
hsa-miR-539	MIMAT0003163	SEQ ID NO 354	CaAggATaaTtTcTC
hsa-miR-544	MIMAT0003164	SEQ ID NO 355	GcTaaAAatGcAgAA
hsa-miR-545	MIMAT0003165	SEQ ID NO 356	AtAaaTGttTgCtGA
hsa-miR-487b	MIMAT0003180	SEQ ID NO 357	AtGacCCtgTaCgAT
hsa-miR-551a	MIMAT0003214	SEQ ID NO 358	AcCaaGAgTgGtCG
hsa-miR-552	MIMAT0003215	SEQ ID NO 359	TaAccAGtcAcCtGT
hsa-miR-553	MIMAT0003216	SEQ ID NO 360	AaAatCTcaCcGTTT
hsa-miR-554	MIMAT0003217	SEQ ID NO 361	CtGagTCagGaCtAG
hsa-miR-92b	MIMAT0003218	SEQ ID NO 362	CgGgaCGagTgCaAT
hsa-miR-555	MIMAT0003219	SEQ ID NO 363	AgGttCAGcTtAcCC
hsa-miR-556	MIMAT0003220	SEQ ID NO 364	TtAcaATgaGcTcAT
hsa-miR-557	MIMAT0003221	SEQ ID NO 365	GcCcaCCcgTgCaAA
hsa-miR-558	MIMAT0003222	SEQ ID NO 366	TtGgtACagCaGcTC
hsa-miR-559	MIMAT0003223	SEQ ID NO 367	GtGcaTAttTaCtTT
hsa-miR-560	MIMAT0003224	SEQ ID NO 368	GcCggCCcgCgCaCG
hsa-miR-561	MIMAT0003225	SEQ ID NO 369	AgGatCTtaAaCtTT
hsa-miR-562	MIMAT0003226	SEQ ID NO 370	AtGgtACagCtAcTT
hsa-miR-563	MIMAT0003227	SEQ ID NO 371	AaAcgTAtgTcAaCC
hsa-miR-564	MIMAT0003228	SEQ ID NO 372	TgCtgACacCgTgCC
hsa-miR-565	MIMAT0003229	SEQ ID NO 373	AcAtcGCgaGcCaGC
hsa-miR-566	MIMAT0003230	SEQ ID NO 374	GgGatCAcaGcCgCC
hsa-miR-567	MIMAT0003231	SEQ ID NO 375	CcTggAAGAacAtAC
hsa-miR-568	MIMAT0003232	SEQ ID NO 376	GtAtaCAttTaTaCA
hsa-miR-551b	MIMAT0003233	SEQ ID NO 377	AcCaaGTatGgGtCG
hsa-miR-569	MIMAT0003234	SEQ ID NO 378	CcAggATtcAtTaAC
hsa-miR-570	MIMAT0003235	SEQ ID NO 379	GgTaaTTgcTgTtTT
hsa-miR-571	MIMAT0003236	SEQ ID NO 380	TcAgaTGgcCaAcTC
hsa-miR-572	MIMAT0003237	SEQ ID NO 381	CcAccGCcgAgCgGA
hsa-miR-573	MIMAT0003238	SEQ ID NO 382	TtAcaCAtcAcTtCA
hsa-miR-574	MIMAT0003239	SEQ ID NO 383	TgTgtGCatGaGcGT
hsa-miR-575	MIMAT0003240	SEQ ID NO 384	CcTgtCCaaCtGgCT
hsa-miR-576	MIMAT0003241	SEQ ID NO 385	GtGgaGAaaTtAgAA
hsa-miR-577	MIMAT0003242	SEQ ID NO 386	AcCaaTAttTtAtCT
hsa-miR-578	MIMAT0003243	SEQ ID NO 387	CcTagAGcaCaAgAA
hsa-miR-579	MIMAT0003244	SEQ ID NO 388	TtTatACcaAaTgAA
hsa-miR-580	MIMAT0003245	SEQ ID NO 389	GaTtcATcaTtCtCA
hsa-miR-581	MIMAT0003246	SEQ ID NO 390	TcTagAGaaCaCaAG
hsa-miR-582	MIMAT0003247	SEQ ID NO 391	GgTtgAAcaAcTgTA
hsa-miR-583	MIMAT0003248	SEQ ID NO 392	GgGacCTtcCtCtTT
hsa-miR-584	MIMAT0003249	SEQ ID NO 393	CcCagGCaaAcCaTA
hsa-miR-585	MIMAT0003250	SEQ ID NO 394	CaTacAGatAcGcCC
hsa-miR-548a	MIMAT0003251	SEQ ID NO 395	GtAatTGccAgTtTT
hsa-miR-586	MIMAT0003252	SEQ ID NO 396	AaAaaTAcAAtGcAT
hsa-miR-587	MIMAT0003253	SEQ ID NO 397	TcAtcACctAtGgAA

ES 2 715 625 T3

microARN	N.º de referencia	SEQ ID NO	Ejemplo de LNA antimiR 5'-3'
hsa-miR-548b	MIMAT0003254	SEQ ID NO 398	GcAacTGagGtTcTT
hsa-miR-588	MIMAT0003255	SEQ ID NO 399	AaCccATtgTgGcCA
hsa-miR-589	MIMAT0003256	SEQ ID NO 400	CcGgcATtGtTcTG
hsa-miR-550	MIMAT0003257	SEQ ID NO 401	CtGagGGagTaAgAC
hsa-miR-590	MIMAT0003258	SEQ ID NO 402	TtTtaTGaaTaAgCT
hsa-miR-591	MIMAT0003259	SEQ ID NO 403	TgAgaACccAtGgTC
hsa-miR-592	MIMAT0003260	SEQ ID NO 404	TcGcaTAttGaCaCA
hsa-miR-593	MIMAT0003261	SEQ ID NO 405	TgCctGGctGgTgCC
hsa-miR-595	MIMAT0003263	SEQ ID NO 406	CaCcaCGgcAcAcTT
hsa-miR-596	MIMAT0003264	SEQ ID NO 407	GgAgcCGggCaGgCT
hsa-miR-597	MIMAT0003265	SEQ ID NO 408	GtCatCGagTgAcAC
hsa-miR-598	MIMAT0003266	SEQ ID NO 409	TgAcaACgaTgAcGT
hsa-miR-599	MIMAT0003267	SEQ ID NO 410	GaTaaACtgAcAcAA
hsa-miR-600	MIMAT0003268	SEQ ID NO 411	GcTctTGtcTgTaAG
hsa-miR-601	MIMAT0003269	SEQ ID NO 412	CaAcaATccTaGaCC
hsa-miR-602	MIMAT0003270	SEQ ID NO 413	AgCtgTCgcCcGtGT
hsa-miR-603	MIMAT0003271	SEQ ID NO 414	GtAatTGcaGtGtGT
hsa-miR-604	MIMAT0003272	SEQ ID NO 415	CtGaaTTccGcAgCC
hsa-miR-605	MIMAT0003273	SEQ ID NO 416	GgCacCAtgGgAtTT
hsa-miR-606	MIMAT0003274	SEQ ID NO 417	TgAttTTcaGtAgTT
hsa-miR-607	MIMAT0003275	SEQ ID NO 418	AgAtcTGgaTtTgAA
hsa-miR-608	MIMAT0003276	SEQ ID NO 419	TcCcaACacCaCcCC
hsa-miR-609	MIMAT0003277	SEQ ID NO 420	AtGagAGaaAcAcCC
hsa-miR-610	MIMAT0003278	SEQ ID NO 421	GcAcaCAttTaGcTC
hsa-miR-611	MIMAT0003279	SEQ ID NO 422	CcCgaGGggTcCtCG
hsa-miR-612	MIMAT0003280	SEQ ID NO 423	AgAagCCctGcCcAG
hsa-miR-613	MIMAT0003281	SEQ ID NO 424	AaGaaGGaaCaTcCC
hsa-miR-614	MIMAT0003282	SEQ ID NO 425	GcAagAAcaGgCgTT
hsa-miR-615	MIMAT0003283	SEQ ID NO 426	GaGacCCagGcTcGG
hsa-miR-616	MIMAT0003284	SEQ ID NO 427	CtGaaGGgtTtTgAG
hsa-miR-548c	MIMAT0003285	SEQ ID NO 428	GtAatTGagAttTT
hsa-miR-617	MIMAT0003286	SEQ ID NO 429	TtCaaATggGaAgTC
hsa-miR-618	MIMAT0003287	SEQ ID NO 430	AgGacAAgtAgAgTT
hsa-miR-619	MIMAT0003288	SEQ ID NO 431	CaAacATgtCcAgGT
hsa-miR-620	MIMAT0003289	SEQ ID NO 432	CtAtaTctaTcTcCA
hsa-miR-621	MIMAT0003290	SEQ ID NO 433	AgCgcTGttGcTaGC
hsa-miR-622	MIMAT0003291	SEQ ID NO 434	AaCctCAGcAgAcTG
hsa-miR-623	MIMAT0003292	SEQ ID NO 435	AgCccCTgcAaGgGA
hsa-miR-624	MIMAT0003293	SEQ ID NO 436	CaAggTActGgTaCT
hsa-miR-625	MIMAT0003294	SEQ ID NO 437	AtAgaActTcCcCC
hsa-miR-626	MIMAT0003295	SEQ ID NO 438	AcAttTTcaGaCaGC
hsa-miR-627	MIMAT0003296	SEQ ID NO 439	TtTctTAgAcaCtCA
hsa-miR-628	MIMAT0003297	SEQ ID NO 440	TgCcaCTctTaCtAG
hsa-miR-629	MIMAT0003298	SEQ ID NO 441	CtTacGTtgGgAgAA
hsa-miR-630	MIMAT0003299	SEQ ID NO 442	CcTggTAcAgaAtAC
hsa-miR-631	MIMAT0003300	SEQ ID NO 443	GgTctGGgcCaGgTC
hsa-miR-33b	MIMAT0003301	SEQ ID NO 444	TgCaaCAgcAaTgCA
hsa-miR-632	MIMAT0003302	SEQ ID NO 445	CaCagGAagCaGaCA
hsa-miR-633	MIMAT0003303	SEQ ID NO 446	TgGtaGAtaCtAtTA
hsa-miR-634	MIMAT0003304	SEQ ID NO 447	AgTtgGGgtGcTgGT
hsa-miR-635	MIMAT0003305	SEQ ID NO 448	GtTtcAGtgCcCaAG
hsa-miR-636	MIMAT0003306	SEQ ID NO 449	GgGacGAgcAaGcAC
hsa-miR-637	MIMAT0003307	SEQ ID NO 450	CcCgaAAgcCcCcAG
hsa-miR-638	MIMAT0003308	SEQ ID NO 451	CcCgcCCgcGaTcCC
hsa-miR-639	MIMAT0003309	SEQ ID NO 452	TcGcaACcgCaGcGA
hsa-miR-640	MIMAT0003310	SEQ ID NO 453	CaGgtTCctGgAtCA
hsa-miR-641	MIMAT0003311	SEQ ID NO 454	TcTatCCtaTgTcTT
hsa-miR-642	MIMAT0003312	SEQ ID NO 455	AcAttTGgaGaGgGA
hsa-miR-643	MIMAT0003313	SEQ ID NO 456	GaGctAGcaTaCaAG
hsa-miR-644	MIMAT0003314	SEQ ID NO 457	CtAagAAagCcAcAC
hsa-miR-645	MIMAT0003315	SEQ ID NO 458	GcAgtACcaGcCtAG
hsa-miR-646	MIMAT0003316	SEQ ID NO 459	TcAgaGGcaGcTgCT
hsa-miR-647	MIMAT0003317	SEQ ID NO 460	AaGtgAGtgCaGcCA
hsa-miR-648	MIMAT0003318	SEQ ID NO 461	AgTgcCCtgCaCaCT
hsa-miR-649	MIMAT0003319	SEQ ID NO 462	TgAacAAcaCaGgTT

ES 2 715 625 T3

microARN	N.º de referencia	SEQ ID NO	Ejemplo de LNA anti-miR 5'-3'
hsa-miR-650	MIMAT0003320	SEQ ID NO 463	GaGagCGctGcCtCC
hsa-miR-651	MIMAT0003321	SEQ ID NO 464	TcAagCTtaTcCtAA
hsa-miR-652	MIMAT0003322	SEQ ID NO 465	CcCtaGTggCgCcAT
hsa-miR-548d	MIMAT0003323	SEQ ID NO 466	GaAacTGtgGtTtTT
hsa-miR-661	MIMAT0003324	SEQ ID NO 467	GcCagAGacCcAgGC
hsa-miR-662	MIMAT0003325	SEQ ID NO 468	GgGccACaaCgTgGG
hsa-miR-663	MIMAT0003326	SEQ ID NO 469	CcGcgGCgcCcCgCC
hsa-miR-449b	MIMAT0003327	SEQ ID NO 470	TaAcaATacAcTgCC
hsa-miR-653	MIMAT0003328	SEQ ID NO 471	GtAgaGAttGtTtCA
hsa-miR-411	MIMAT0003329	SEQ ID NO 472	GcTatACggTcTaCT
hsa-miR-654	MIMAT0003330	SEQ ID NO 473	GtTctGCggCcCaCC
hsa-miR-655	MIMAT0003331	SEQ ID NO 474	GtTaaCCatGtAtTA
hsa-miR-656	MIMAT0003332	SEQ ID NO 475	TtGacTGtaTaAtAT
hsa-miR-549	MIMAT0003333	SEQ ID NO 476	TcAtcCAtaGtTgTC
hsa-miR-657	MIMAT0003335	SEQ ID NO 477	AgGgtGAgAaCtGcGC
hsa-miR-658	MIMAT0003336	SEQ ID NO 478	CcTacTTccCtCcGC
hsa-miR-659	MIMAT0003337	SEQ ID NO 479	CcCtcCctgAaCcAA
hsa-miR-660	MIMAT0003338	SEQ ID NO 480	CgAtaTGcaAtGgGT
hsa-miR-421	MIMAT0003339	SEQ ID NO 481	AtTaaTGtcTgTtGA
hsa-miR-542-5p	MIMAT0003340	SEQ ID NO 482	AcAtgATgaTcCcCG
hcmv-miR-US4	MIMAT0003341	SEQ ID NO 483	CtGcaCGcCaTgTC
hcmv-miR-UL70-5p	MIMAT0003342	SEQ ID NO 484	AcGagGCcgAgAcGC
hcmv-miR-UL70-3p	MIMAT0003343	SEQ ID NO 485	GcGccAGccCaTcCC
hsa-miR-363*	MIMAT0003385	SEQ ID NO 486	CaTcgTGatCcAcCC
hsa-miR-376a*	MIMAT0003386	SEQ ID NO 487	AgAagGAgAaTcTAC
hsa-miR-542-3p	MIMAT0003389	SEQ ID NO 488	TtAtcAAtcTgTcAC
ebv-miR-BART1-3p	MIMAT0003390	SEQ ID NO 489	GtGgaTAGcGgTgCT
hsa-miR-425-5p	MIMAT0003393	SEQ ID NO 490	GaGtgATcgTgTcAT
ebv-miR-BART3-5p	MIMAT0003410	SEQ ID NO 491	AcActAAcaCtAgGT
ebv-miR-BART3-3p	MIMAT0003411	SEQ ID NO 492	GgTgaCTagTgGtGC
ebv-miR-BART4	MIMAT0003412	SEQ ID NO 493	CcAgcAGcaTcAgGT
ebv-miR-BART5	MIMAT0003413	SEQ ID NO 494	AgCtaTAttCaCcTT
ebv-miR-BART6-5p	MIMAT0003414	SEQ ID NO 495	AtGgaTTggAcCaAC
ebv-miR-BART6-3p	MIMAT0003415	SEQ ID NO 496	GcTagTcCgAtCcCC
ebv-miR-BART7	MIMAT0003416	SEQ ID NO 497	AcActGGacTaTgAT
ebv-miR-BART8-5p	MIMAT0003417	SEQ ID NO 498	AaTctAGgaAaCcGT
ebv-miR-BART8-3p	MIMAT0003418	SEQ ID NO 499	CcCcaTAgAtTtGtGA
ebv-miR-BART9	MIMAT0003419	SEQ ID NO 500	GaCccATgaAgTgTT
ebv-miR-BART10	MIMAT0003420	SEQ ID NO 501	AaCtcCAtgGtTaTG
ebv-miR-BART11-5p	MIMAT0003421	SEQ ID NO 502	AgCgcACcaAaCtGT
ebv-miR-BART11-3p	MIMAT0003422	SEQ ID NO 503	TcAgcCTggTgTgCG
ebv-miR-BART12	MIMAT0003423	SEQ ID NO 504	AcCaaACacCaCaGG
ebv-miR-BART13	MIMAT0003424	SEQ ID NO 505	TcCctGGcaAgTtAC
ebv-miR-BART14-5p	MIMAT0003425	SEQ ID NO 506	TcGgcAGcgTaGgGT
ebv-miR-BART14-3p	MIMAT0003426	SEQ ID NO 507	AcTacTGcaGcAtTT
kshv-miR-K12-12	MIMAT0003712	SEQ ID NO 508	GgAatGGtgGcCtGG
ebv-miR-BART15	MIMAT0003713	SEQ ID NO 509	AgGaaACaaAaCcAC
ebv-miR-BART16	MIMAT0003714	SEQ ID NO 510	CaCacACccAcTcTA
ebv-miR-BART17-5p	MIMAT0003715	SEQ ID NO 511	AtGccTGcgTcCtCT
ebv-miR-BART17-3p	MIMAT0003716	SEQ ID NO 512	GaCacCAggCaTaCA
ebv-miR-BART18	MIMAT0003717	SEQ ID NO 513	AgGaaGTgcGaAcTT
ebv-miR-BART19	MIMAT0003718	SEQ ID NO 514	CcAagCAaaCaAaAC
ebv-miR-BART20-5p	MIMAT0003719	SEQ ID NO 515	AaGacATgcCtGcTA
ebv-miR-BART20-3p	MIMAT0003720	SEQ ID NO 516	AgGctGTgcCtTcAT
hsv1-miR-H1	MIMAT0003744	SEQ ID NO 517	AcTtcCCgtCcTtCC
hsa-miR-758	MIMAT0003879	SEQ ID NO 518	TgGacCAggTcAcAA
hsa-miR-671	MIMAT0003880	SEQ ID NO 519	CcCtcCAggGcTtCC
hsa-miR-668	MIMAT0003881	SEQ ID NO 520	GcCgaGCcgAgTgAC
hsa-miR-767-5p	MIMAT0003882	SEQ ID NO 521	AgAcaACcaTgGtGC
hsa-miR-767-3p	MIMAT0003883	SEQ ID NO 522	AtGggGTatGaGcAG
hsa-miR-454-5p	MIMAT0003884	SEQ ID NO 523	AcAatATtgAtAgGG
hsa-miR-454-3p	MIMAT0003885	SEQ ID NO 524	AaGcaATatTgCaCT
hsa-miR-769-5p	MIMAT0003886	SEQ ID NO 525	GaAccCAGAgtTcTC
hsa-miR-769-3p	MIMAT0003887	SEQ ID NO 526	AcCccGGagAtCcCA
hsa-miR-766	MIMAT0003888	SEQ ID NO 527	GcTgtGGggCtGgAG

microARN	N.º de referencia	SEQ ID NO	Ejemplo de LNA anti-miR 5'-3'
hsa-miR-765	MIMAT0003945	SEQ ID NO 528	CcTtcCTtcTcCtCC
hsa-miR-768-5p	MIMAT0003946	SEQ ID NO 529	AcTttCAtcCtCcAA
hsa-miR-768-3p	MIMAT0003947	SEQ ID NO 530	AgTgtCAgcAtTgTG
hsa-miR-770-5p	MIMAT0003948	SEQ ID NO 531	GaCacGTggTaCtGG
hsa-miR-802	MIMAT0004185	SEQ ID NO 532	TgAatCTttGtTaCT
hsa-miR-801	MIMAT0004209	SEQ ID NO 533	CgCacGCagAgCaAT
hsa-miR-675	MIMAT0004284	SEQ ID NO 534	GgCccTcTcCgCaCC

ENSEÑANZAS

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido monocatenario o un conjugado de dicho oligonucleótido, que tiene una longitud de entre 8 y 17 unidades de nucleobase y un diluyente, transportador o adyuvante farmacéuticamente aceptable; en donde al menos una de las unidades de nucleobase del oligonucleótido monocatenario es una unidad de nucleobase de ácido nucleico bloqueado (LNA) y en donde el oligonucleótido monocatenario es complementario a una secuencia de microARN humana.
- 10 2. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 1, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende una región de secuencia de nucleobases contigua que es 100 % complementaria a la región de semilla de microARN humana.
- 15 3. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 1 o 2, en donde el oligonucleótido monocatenario es complementario a la secuencia madura de microARN humana.
- 20 4. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 3, en donde el oligonucleótido monocatenario es complementario a una secuencia de microARN seleccionada entre el grupo que consiste en: hsa-let-7a, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7d, hsa-let-7e, hsa-let-7f, hsa-miR-15a, hsa-miR-16, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-17-3p, hsa-miR-18a, hsa-miR-19a, hsa-miR-19b, hsa-miR-20a, hsa-miR-21, hsa-miR-22, hsa-miR-23a, hsa-miR-189, hsa-miR-24, hsa-miR-25, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-27a, hsa-miR-28, hsa-miR-29a, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-31, hsa-miR-32, hsa-miR-33, hsa-miR-92, hsa-miR-93, hsa-miR-95, hsa-miR-96, hsa-miR-98, hsa-miR-99a, hsa-miR-100, hsa-miR-101, hsa-miR-29b, hsa-miR-103, hsa-miR-105, hsa-miR-106a, hsa-miR-107, hsa-miR-192, hsa-miR-196a, hsa-miR-197, hsa-miR-198, hsa-miR-199a, hsa-miR-199a*, hsa-miR-208, hsa-miR-129, hsa-miR-148a, hsa-miR-30c, hsa-miR-30d, hsa-miR-139, hsa-miR-147, hsa-miR-7, hsa-miR-10a, hsa-miR-10b, hsa-miR-34a, hsa-miR-181a, hsa-miR-181b, hsa-miR-181c, hsa-miR-182, hsa-miR-182*, hsa-miR-183, hsa-miR-187, hsa-miR-199b, hsa-miR-203, hsa-miR-204, hsa-miR-205, hsa-miR-210, hsa-miR-211, hsa-miR-212, hsa-miR-181a*, hsa-miR-214, hsa-miR-215, hsa-miR-216, hsa-miR-217, hsa-miR-218, hsa-miR-219, hsa-miR-220, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-223, hsa-miR-224, hsa-miR-200b, hsa-let-7 g, hsa-let-7i, hsa-miR-1, hsa-miR-15b, hsa-miR-23b, hsa-miR-27b, hsa-miR-30b, hsa-miR-122a, hsa-miR-124a, hsa-miR-125b, hsa-miR-128a, hsa-miR-130a, hsa-miR-132, hsa-miR-133a, hsa-miR-135a, hsa-miR-137, hsa-miR-138, hsa-miR-140, hsa-miR-141, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-143, hsa-miR-144, hsa-miR-145, hsa-miR-152, hsa-miR-153, hsa-miR-191, hsa-miR-9, hsa-miR-9*, hsa-miR-125a, hsa-miR-126*, hsa-miR-126, hsa-miR-127, hsa-miR-134, hsa-miR-136, hsa-miR-146a, hsa-miR-149, hsa-miR-150, hsa-miR-154, hsa-miR-154*, hsa-miR-184, hsa-miR-185, hsa-miR-186, hsa-miR-188, hsa-miR-190, hsa-miR-193a, hsa-miR-194, hsa-miR-195, hsa-miR-206, hsa-miR-320, hsa-miR-200c, hsa-miR-155, hsa-miR-128b, hsa-miR-106b, hsa-miR-29c, hsa-miR-200a, hsa-miR-302a*, hsa-miR-302a, hsa-miR-34b, hsa-miR-34c, hsa-miR-299-3p, hsa-miR-301, hsa-miR-99b, hsa-miR-296, hsa-miR-130b, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-361, hsa-miR-362, hsa-miR-363, hsa-miR-365, hsa-miR-302b*, hsa-miR-302b, hsa-miR-302c*, hsa-miR-302c, hsa-miR-302d, hsa-miR-367, hsa-miR-368, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-370, hsa-miR-371, hsa-miR-372, hsa-miR-373*, hsa-miR-373, hsa-miR-374, hsa-miR-375, hsa-miR-376a, hsa-miR-377, hsa-miR-378, hsa-miR-422b, hsa-miR-379, hsa-miR-380-5p, hsa-miR-380-3p, hsa-miR-381, hsa-miR-382, hsa-miR-383, hsa-miR-340, hsa-miR-330, hsa-miR-328, hsa-miR-342, hsa-miR-337, hsa-miR-323, hsa-miR-326, hsa-miR-151, hsa-miR-135b, hsa-miR-148b, hsa-miR-331, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-338, hsa-miR-339, hsa-miR-335, hsa-miR-133b, hsa-miR-325, hsa-miR-345, hsa-miR-346, ebv-miR-BHRF1-1, ebv-miR-BHRF1-2*, ebv-miR-BHRF1-2, ebv-miR-BHRF1-3, ebv-miR-BART1-5p, ebv-miR-BART2, hsa-miR-384, hsa-miR-196b, hsa-miR-422a, hsa-miR-423, hsa-miR-424, hsa-miR-425-3p, hsa-miR-18b, hsa-miR-20b, hsa-miR-448, hsa-miR-429, hsa-miR-449, hsa-miR-450, hcmv-miR-UL22A, hcmv-miR-UL22A*, hcmv-miR-UL36, hcmv-miR-UL112, hcmv-miR-UL148D, hcmv-miR-US5-1, hcmv-miR-US5-2, hcmv-miR-US25-1, hcmv-miR-US25-2-5p, hcmv-miR-US25-2-3p, hcmv-miR-US33, hsa-miR-191*, hsa-miR-200a*, hsa-miR-369-5p, hsa-miR-431, hsa-miR-433, hsa-miR-329, hsa-miR-453, hsa-miR-451, hsa-miR-452, hsa-miR-452*, hsa-miR-409-5p, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-412, hsa-miR-410, hsa-miR-376b, hsa-miR-483, hsa-miR-484, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-486, hsa-miR-487a, kshv-miR-K12-10a, kshv-miR-K12-10b, kshv-miR-K12-11, kshv-miR-K12-1, kshv-miR-K12-2, kshv-miR-K12-9*, kshv-miR-K12-9, kshv-miR-K12-8, kshv-miR-K12-7, kshv-miR-K12-6-5p, kshv-miR-K12-6-3p, kshv-miR-K12-5, kshv-miR-K12-4-5p, kshv-miR-K12-4-3p, kshv-miR-K12-3, kshv-miR-K12-3*, hsa-miR-488, hsa-miR-489, hsa-miR-490, hsa-miR-491, hsa-miR-511, hsa-miR-146b, hsa-miR-202*, hsa-miR-202, hsa-miR-492, hsa-miR-493-5p, hsa-miR-432, hsa-miR-432*, hsa-miR-494, hsa-miR-495, hsa-miR-496, hsa-miR-193b, hsa-miR-497, hsa-miR-181d, hsa-miR-512-5p, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-498, hsa-miR-520e, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-515-3p, hsa-miR-519e*, hsa-miR-519e, hsa-miR-520f, hsa-miR-526c, hsa-miR-519c, hsa-miR-520a*,
- 55

- 5 hsa-miR-520a, hsa-miR-526b, hsa-miR- 526b*, hsa-miR-519b, hsa-miR-525, hsa-miR-525*, hsa-miR-523, hsa-miR-518f*, hsa-miR-518f, hsa-miR-520b, hsa-miR-518b, hsa-miR-526a, hsa-miR-520c, hsa-miR-518c*, hsa-miR-518c, hsa-miR-524*, hsa-miR-524, hsa-miR-517*, hsa-miR-517a, hsa-miR-519d, hsa-miR-521, hsa-miR-520d*, hsa-miR-520d, hsa-miR-517b, hsa-miR- 520 g, hsa-miR-516-5p, hsa-miR-516-3p, hsa-miR-518e, hsa-miR-527, hsa-miR-518a, hsa-miR-518d, hsa-miR- 517c, hsa-miR-520 h, hsa-miR-522, hsa-miR-519a, hsa-miR-499, hsa-miR-500, hsa-miR-501, hsa-miR-502, hsa-miR-503, hsa-miR-504, hsa-miR-505, hsa-miR-513, hsa-miR-506, hsa-miR-507, hsa-miR-508, hsa-miR-509, hsa-miR-510, hsa-miR-514, hsa-miR-532, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-18a*, hsa-miR-455, hsa-miR-493-3p, hsa-miR- 539, hsa-miR-544, hsa-miR-545, hsa-miR-487b, hsa-miR-551a, hsa-miR-552, hsa-miR-553, hsa-miR-554, hsa-miR-92b, hsa-miR-555, hsa-miR-556, hsa-miR-557, hsa-miR-558, hsa-miR-559, hsa-miR-560, hsa-miR-561, hsa-miR-562, hsa-miR-563, hsa-miR-564, hsa-miR-565, hsa-miR-566, hsa-miR-567, hsa-miR-568, hsa-miR-551b, hsa-miR-569, hsa-miR-570, hsa-miR-571, hsa-miR-572, hsa-miR-573, hsa-miR-574, hsa-miR-575, hsa-miR-576, hsa-miR-577, hsa-miR-578, hsa-miR-579, hsa-miR-580, hsa-miR-581, hsa-miR-582, hsa-miR-583, hsa-miR-584, hsa-miR-585, hsa-miR-548a, hsa-miR-586, hsa-miR-587, hsa-miR-548b, hsa-miR-588, hsa-miR-589, hsa-miR-550, hsa-miR-590, hsa-miR-591, hsa-miR-592, hsa-miR-593, hsa-miR-595, hsa-miR-596, hsa-miR-597, hsa-miR-598, hsa-miR-599, hsa-miR-600, hsa-miR-601, hsa-miR-602, hsa-miR-603, hsa-miR-604, hsa-miR-605, hsa-miR-606, hsa-miR-607, hsa-miR-608, hsa-miR-609, hsa-miR-610, hsa-miR-611, hsa-miR-612, hsa-miR-613, hsa-miR-614, hsa-miR-615, hsa-miR-616, hsa-miR-548c, hsa-miR-617, hsa-miR-618, hsa-miR-619, hsa-miR-620, hsa-miR-621, hsa-miR-622, hsa-miR-623, hsa-miR-624, hsa-miR-625, hsa-miR-626, hsa-miR-627, hsa-miR-628, hsa-miR-629, hsa-miR-630, hsa-miR-631, hsa-miR-33b, hsa-miR-632, hsa-miR-633, hsa-miR-634, hsa-miR-635, hsa-miR-636, hsa-miR-637, hsa-miR-638, hsa-miR-639, hsa-miR-640, hsa-miR-641, hsa-miR-642, hsa-miR-643, hsa-miR-644, hsa-miR-645, hsa-miR-646, hsa-miR-647, hsa-miR-648, hsa-miR-649, hsa-miR-650, hsa-miR-651, hsa-miR-652, hsa-miR-548d, hsa-miR-661, hsa-miR-662, hsa-miR-663, hsa-miR-449b, hsa-miR-653, hsa-miR-411, hsa-miR-654, hsa-miR-655, hsa-miR-656, hsa-miR-549, hsa-miR-657, hsa-miR-658, hsa-miR-659, hsa-miR-660, hsa-miR-421, hsa-miR-542-5p, hcmv-miR-US4, hcmv-miR-UL70-5p, hcmv-miR-UL70-3p, hsa-miR-363*, hsa-miR-376a*, hsa-miR-542-3p, ebv-miR-BART1-3p, hsa-miR-425-5p, ebv-miR-BART3-5p, ebv-miR-BART3-3p, ebv-miR-BART4, ebv-miR-BART5, ebv-miR-BART6-5p, ebv-miR-BART6-3p, ebv-miR-BART7, ebv-miR-BART8-5p, ebv-miR- BART8-3p, ebv-miR-BART9, ebv-miR-BART10, ebv-miR-BART11-5p, ebv-miR-BART11-3p, ebv-miR-BART12, ebv-miR-BART13, ebv-miR-BART14-5p, ebv-miR-BART14-3p, kshv-miR-K12-12, ebv-miR-BART15, ebv-miR- BART16, ebv-miR-BART17-5p, ebv-miR-BART17-3p, ebv-miR-BART18, ebv-miR-BART19, ebv-miR-BART20-5p, ebv-miR-BART20-3p, hsv1-miR-H1, hsa-miR-758, hsa-miR-671, hsa-miR-668, hsa-miR-767-5p, hsa-miR-767-3p, hsa-miR-454-5p, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-769-3p, hsa-miR-766, hsa-miR-765, hsa-miR-768-5p, hsa-miR-768-3p, hsa-miR-770-5p, hsa-miR-802, hsa-miR-801, hsa-miR-675.
- 35 5. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 4, en donde la primera nucleobase del oligonucleótido monocatenario, contando desde el extremo 3', es un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA.
- 40 6. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 5, en donde la segunda nucleobase del oligonucleótido monocatenario, contando desde el extremo 3', es un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA.
- 45 7. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 -6, en donde el noveno y/o el décimo nucleótido del oligonucleótido monocatenario, contando desde el extremo 3', es un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA.
- 50 8. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 7, en donde la novena nucleobase del oligonucleótido monocatenario, contando desde el extremo 3', es un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA.
- 55 9. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 7, en donde la décima nucleobase del oligonucleótido monocatenario, contando desde el extremo 3', es un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA.
- 60 10. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 7, en donde tanto la novena como la décima nucleobase del oligonucleótido monocatenario, calculada desde el extremo 3', es un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA.
- 65 11. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 10, en donde el oligonucleótido monocatenario no comprende una región de más de 5 unidades de nucleótido de ADN consecutivas.
- 60 12. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 11, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende al menos una región de al menos dos unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tal como al menos dos unidades consecutivas de LNA.
- 65 13. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 12, en donde el oligonucleótido monocatenario no comprende una región de más de 7 unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tales como unidades de LNA.

14. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 13, en donde el oligonucleótido monocatenario no comprende una región de más de 3 unidades de análogo de nucleótido consecutivas, tales como unidades de LNA.
- 5 15. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 14, en donde la primera o la segunda nucleobase 3' del oligonucleótido monocatenario corresponde al segundo nucleótido 5' de la secuencia de microARN.
- 10 16. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 15, en donde las unidades de nucleobase 1 a 6 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' de la región del oligonucleótido monocatenario son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN.
- 15 17. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 15, en donde las unidades de nucleobase 1 a 7 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' de la región del oligonucleótido monocatenario son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN.
- 20 18. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 15, en donde las unidades de nucleobase 2 a 7 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' de la región del oligonucleótido monocatenario son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN.
- 25 19. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 18, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende al menos una unidad de análogo de nucleótido, tal como al menos una unidad de LNA, en una posición que se encuentra dentro de la región complementaria a la región de semilla de miARN.
- 30 20. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 19, en donde la secuencia de nucleobases del oligonucleótido monocatenario que es complementaria a la secuencia de la región de semilla de microARN, se selecciona entre el grupo que consiste en (X)Xxxxxx, (X)xXxxxx, (X)xxXxxx, (X)xxxXxx, (X)xxxxXx y (X)xxxxxX, leída en la dirección 3' - 5', en donde "X" indica un análogo de nucleótido, (X) indica un análogo de nucleótido opcional, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 35 21. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 19, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende al menos dos unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos dos unidades de LNA, en posiciones que son complementarias a la región de semilla de miARN.
- 40 22. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 21, en donde la secuencia de nucleobases del oligonucleótido monocatenario que es complementaria a la secuencia de la región de semilla de microARN, se selecciona entre el grupo que consiste en (X)XXxxxx, (X)XxXxxx, (X)XxxXxx, (X)XxxxXx, (X)XxxxxX, (X)xXXxxx, (X)xXxXxx, (X)xXxxXx, (X)xXxxxX, (X)xxXXxx, (X)xxXxXx, (X)xxXxxX, (X)xxxXXx, (X)xxxXxX y (X)xxxxXX, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, (X) indica un análogo de nucleótido opcional, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 45 23. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 19, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende al menos tres unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos tres unidades de LNA, en posiciones que son complementarias a la región de semilla de miARN.
- 50 24. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 21, en donde la secuencia de nucleobases del oligonucleótido monocatenario que es complementaria a la secuencia de la región de semilla de microARN, se selecciona entre el grupo que consiste en (X)XXXxxx, (X)xXXXxx, (X)xxXXXx, (X)xxxXXX, (X)XXxXxx, (X)XXxxXx, (X)XXxxxX, (X)xXXxXx, (X)xXXxxX, (X)xxXXxX, (X)XxXXxx, (X)XxxXXx, (X)XxxxXX, (X)xXxXXx, (X)xXxxXX, (X)xxXxXX, (X)xXxXxX y (X)XxXxXx, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, (X) indica un análogo de nucleótido opcional, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 55 25. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 19, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende al menos cuatro unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos cuatro unidades de LNA, en posiciones que son complementarias a la región de semilla de miARN.
- 60 26. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 25, en donde la secuencia de nucleobases del oligonucleótido monocatenario que es complementaria a la secuencia de la región de semilla de microARN, se selecciona entre el grupo que consiste en (X)xxXXX, (X)xXxXXX, (X)xXXxXX, (X)xXXXxX, (X)xXXXXx, (X)XxxXXXX, (X)XxXxXX, (X)XxXXxX, (X)XxXXx, (X)XxxxXX, (X)XXxXxX, (X)XXxXXx, (X)XXXxxX, (X)XXxXxX y (X)XXXXxx, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, (X) indica un análogo de nucleótido opcional, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.

27. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 19, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende al menos cinco unidades de análogo de nucleótido, tal como al menos cinco unidades de LNA, en posiciones que son complementarias a la región de semilla de miARN.
- 5 28. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 27, en donde la secuencia de nucleobases del oligonucleótido monocatenario que es complementaria a la secuencia de la región de semilla de microARN, se selecciona entre el grupo que consiste en (X)xXXXXXX, (X)XxXXXX, (X)XXxXXX, (X)XXXxXX, (X)XXXXxX y (X)XXXXXx, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, (X) indica un análogo de nucleótido opcional, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 10 29. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 19, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende seis o siete unidades de análogo de nucleótido, tal como seis o siete unidades de LNA, en posiciones que son complementarias a la región de semilla de miARN.
- 15 30. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 29, en donde la secuencia de nucleobases del oligonucleótido monocatenario que es complementaria a la secuencia de la región de semilla de microARN, se selecciona entre el grupo que consiste en XXXXXX, XxXXXXX, XXxXXXX, XXXxXXX, XXXXxXX, XXXXXxX y XXXXXXx, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 20 31. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 30, en donde el motivo de dos nucleobases en la posición 7 a 8, que continúa desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario se selecciona entre el grupo que consiste en xx, XX, xX y Xx, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 25 32. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 31, en donde el motivo de dos nucleobases en la posición 7 a 8, que continúa desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario se selecciona entre el grupo que consiste en XX, xX y Xx, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 30 33. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 32, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende al menos 12 nucleobases y en donde el motivo de dos nucleobases en la posición 11 a 12, que continúa desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario se selecciona entre el grupo que consiste en xx, XX, xX y Xx, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 35 34. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 33, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende al menos 12 nucleobases y en donde el motivo de dos nucleobases en la posición 11 a 12, que continúa desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario se selecciona entre el grupo que consiste en XX, xX y Xx, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 40 35. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 34, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende al menos 13 nucleobases y en donde el motivo de tres nucleobases en la posición 11 a 13, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xxx, Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX y XXX, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 45 36. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 35, en donde el motivo de tres nucleobases en la posición 11 a 13, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX y XXX, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 50 37. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 36, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende al menos 14 nucleobases y en donde el motivo de cuatro nucleobases en las posiciones 11 a 14, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en xxxx, Xxxx, xXxx, xxXx, xxxX, XXxx, XxXx, XxxX, xXXx, xXxX, xxXX, XXXx, XxXX, xXXX, XXxX y XXXX, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 55 38. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 37, en donde el motivo de cuatro nucleobases en la posición 11 a 14, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en Xxxx, xXxx, xxXx, xxxX, XXxx, XxXx, XxxX, xXXx, xXxX, xxXX, XXXx, XxXX, xXXX, XXxX y XXXX, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
- 60 65

39. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 38, en donde dicho oligonucleótido comprende 15 nucleobases y el motivo de cinco nucleobases en la posición 11 a 15, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en Xxxxx, xXxxx, xxLxx, xxxXx, xxxxX, XXxxx, XxXxx, XxxXx, XxxxX, xXxxx, xXxXx, xXxxX, xxXXx, xxXxX, xxxXX, XXXxx, XXxxX, XxxXX, xXXXx, xxXXX, XXxXX, XxXXx, XXXXx, XXXxX, XXxXX, XxXXXX, xXXXX y XXXXX, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
40. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 39, en donde dicho oligonucleótido comprende 16 nucleobases y el motivo de seis nucleobases en las posiciones 11 a 16, contando desde el extremo 3', se selecciona entre el grupo que consiste en Xxxxxx, xXxxxx, xxLxxx, xxxXxx, xxxxXx, xxxxxX, XXxxxx, XxXxxx, XxxXxx, XxxxXx, XxxxxX, xXXxxx, xXxXxx, xXxxXx, xXxxxX, xxXXxx, xxXxXx, xxXxxX, xxxXxx, xxxxxX, XXXxxx, XXxXxx, XXxxXx, XXxxxX, XxXXxx, XxXxXx, XxXxxX, XxxXXx, XxxXxx, XxxxXX, xXXxx, xXxXx, xXXxxX, xXxXXx, xXxxXX, xxXXXx, xxXxXX, xxxXXX, XXXXxx, XXXxxX, XXxxXX, XxxXXX, xXxXXX, XxXxxx, XxXxXX, XXxXxx, XXXxXx, xXXxXX, XxXXxx, XXxXXx, xXXXxx, XxXXXX, xXXXXX, XxXXXX, XXxXXX, XXXxXX, XXXxXX, XXXXXx y XXXXXX, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
41. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 40, en donde el motivo de seis nucleobases en las posiciones 11 a 16 del oligonucleótido monocatenario, contando desde el extremo 3', es xxXxxX, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
42. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 41, en donde el motivo de nucleobases para las tres nucleobases más en 5', se selecciona entre el grupo que consiste en Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX y XXX, en donde "X" indica un análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, tal como una unidad de LNA y "x" indica una unidad de nucleótido de ADN o ARN.
43. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 18 - 42, en donde "x" indica una unidad de ADN.
44. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 43, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende una unidad de análogo de nucleótido, tal como una unidad de LNA, en el extremo 5'.
45. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 44, en donde las unidades de análogo de nucleótido, tal como X, se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: unidad de 2'-O-alkuil-ARN, unidad de 2'-OMe-ARN, unidad de 2'-amino-ADN, unidad de 2'-fluoro-ADN, unidad de LNA, unidad de PNA, unidad de HNA, unidad de INA.
46. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 45, en donde todas las nucleobases son unidades de análogo de nucleótido.
47. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 45 o 46, en donde las unidades de análogo de nucleótido, tal como X, se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: unidades de 2'-OMe-ARN, unidad de 2'-fluoro-ADN y unidades de LNA.
48. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 45 - 47, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende dicha al menos una unidad de análogo de LNA y al menos una unidad de análogo de nucleótido adicional distinto de LNA.
49. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 48, en donde la unidad o unidades de análogo de nucleótido distinto de LNA se seleccionan independientemente entre unidades de 2'-OMe ARN y unidades de 2'-fluoro ADN.
50. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 49, en donde el oligonucleótido monocatenario consiste en al menos una secuencia XYX o YXY, en donde X es LNA e Y es o bien una unidad de 2'-OMe-ARN o una unidad de 2'-fluoro-ADN.
51. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 50, en donde la secuencia de nucleobases del oligonucleótido monocatenario consiste en unidades de X e Y alternas.
52. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 45, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende unidades de LNA y ADN alternas (Xx) o (xX).
53. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 45, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende un motivo alterno de LNA seguido de 2 unidades de ADN (Xxx), xXx o xxX.

54. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 51 - 53, en donde al menos una de las unidades de ADN o de análogo de nucleótido distinto de LNA se reemplaza con una nucleobase de LNA en una posición seleccionada entre las posiciones identificadas como unidades de nucleobase de LNA en una cualquiera de los párrafos anteriores.
55. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 19 - 54, en donde "X" indica una unidad de LNA.
56. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 55, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende al menos 5 unidades de LNA.
57. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 57, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende al menos 7 unidades de LNA.
58. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 57, en donde al menos una de las nucleobases de LNA es de citosina o de guanina.
59. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 58, en donde al menos tres de las nucleobases de LNA se seleccionan independientemente entre citosina o guanina.
60. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 59, en donde los análogos de nucleótido tienen una mayor estabilidad térmica de dúplex con un nucleótido de ARN complementario que la estabilidad térmica de dúplex de un nucleótido de ADN equivalente con dicho nucleótido de ARN complementario.
61. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 60, en donde los análogos de nucleótido confieren estabilidad en suero mejorada respecto del oligonucleótido monocatenario.
62. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 61, en donde el oligonucleótido monocatenario adopta una conformación de hélice A con una molécula de ARN monocatenario complementaria.
63. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 62, en donde el oligonucleótido no media la escisión basada en RNAsH de una molécula de ARN monocatenaria complementaria.
64. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 63, en donde el oligonucleótido monocatenario es capaz de formar un dúplex con una molécula de ácido nucleico de ARN monocatenario complementaria con enlaces internucleósido fosfodiéster, en donde el dúplex tiene una T_m de al menos aproximadamente 60 °C.
65. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 64, en donde el oligonucleótido monocatenario es capaz de formar un dúplex con una molécula de ácido nucleico de ARN monocatenario complementaria con enlaces internucleósido fosfodiéster, en donde el dúplex tiene una T_m de entre aproximadamente 70 °C a aproximadamente 95 °C.
66. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 64, en donde el oligonucleótido monocatenario es capaz de formar un dúplex con una molécula de ácido nucleico de ARN monocatenario complementaria con enlaces internucleósido fosfodiéster, en donde el dúplex tiene una T_m de entre aproximadamente 70 °C a aproximadamente 90 °C, tal como entre aproximadamente 70 °C y aproximadamente 85 °C.
67. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 66, en donde el oligonucleótido monocatenario es capaz de formar un dúplex con una molécula de ácido nucleico de ADN monocatenario complementaria con enlaces internucleósido fosfodiéster, en donde el dúplex tiene una T_m de entre aproximadamente 50 °C a aproximadamente 90 °C.
68. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 67, en donde el oligonucleótido monocatenario tiene una longitud de entre 10 a 16 nucleobases, tal como una longitud de 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleobases.
69. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 68, en donde el oligonucleótido monocatenario tiene una longitud de 15 o 16 nucleobases.
70. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 69, en donde la unidad o unidades de LNA se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en oxi-LNA, tio-LNA y amino-LNA, en las configuraciones D-β y L-α o combinaciones de las mismas.

71. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 70, en donde la unidad o las unidades de LNA son beta D oxi-LNA.
- 5 72. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 70, en donde las unidades de LNA son de alfa-L amino LNA.
73. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 72, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende entre 3 y 17 unidades de LNA.
- 10 74. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 73, en donde el oligonucleótido comprende al menos un grupo de enlace internucleósido que difiere de fosfato.
75. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 74, en donde el oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleósido de fosforotioato.
- 15 76. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 75, en donde el oligonucleótido comprende enlaces fosfodiéster y fosforotioato.
77. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 75, en donde todos los enlaces internucleósido son enlaces fosforotioato.
- 20 78. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 76, en donde el oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleósido de fosfodiéster.
- 25 79. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 78, en donde todos los enlaces internucleósido son enlaces fosfodiéster.
80. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 79, en donde dicho transportador es suero salino o suero salino tamponado.
- 30 81. Un oligonucleótido monocatenario como se define en uno cualquiera de los párrafos 1 - 80, en donde dicho oligonucleótido monocatenario comprende al menos un enlace fosforotioato y/o en donde al menos la primera nucleobase 5' y/o la última 3' es una nucleobase de LNA.
- 35 82. Uso de un oligonucleótido como se define en uno cualquiera de los párrafos 1-81, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno médico asociado con la presencia o sobreexpresión del microARN.
- 40 83. Un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno médico asociado con la presencia o la sobreexpresión del microARN, que comprende la etapa de administrar una composición de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 81 a una persona que necesita tratamiento.
84. Un método para reducir la cantidad eficaz de una diana de miARN en una célula o un organismo, que comprende administrar una composición o un oligonucleótido monocatenario de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 81 a la célula u organismo.
- 45 85. El método de acuerdo con el párrafo 84, en donde la reducción de la cantidad eficaz de diana de miARN se produce mediante antagonismo *in vivo*.
- 50 86. Un método para la desrepresión de un ARNm diana de un miARN en una célula o un organismo, que comprende administrar una composición o un oligonucleótido monocatenario de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 81 a la célula u organismo.
- 55 87. Un método para la síntesis de un oligonucleótido monocatenario dirigido contra un microARN humano, tal como un oligonucleótido monocatenario de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 - 81, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 60 a. Opcionalmente, seleccionar una primera nucleobase, contando desde el extremo 3', que es una nucleobase de LNA.
- b. Opcionalmente, seleccionar una segunda nucleobase, contando desde el extremo 3', que es una nucleobase de LNA.
- 65 c. Seleccionar una región del oligonucleótido monocatenario que corresponde a la región de semilla de miARN, en donde dicha región es como se define en uno cualquiera de los párrafos 16 - 30.

d. Opcionalmente, seleccionar una séptima y una octava nucleobase de acuerdo con el párrafo 31 o 32.

e. Opcionalmente, seleccionar una región 5' del oligonucleótido monocatenario de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 33 - 41.

5 f. Opcionalmente, seleccionar un terminal 5' del oligonucleótido monocatenario de acuerdo con el párrafo 42.

En donde la síntesis se lleva a cabo mediante la síntesis secuencial de las regiones definidas en las etapas a - f, en donde dicha síntesis puede llevarse a cabo en la dirección 3'-5' (a a f) o 5' - 3' (f a a) y en donde dicho oligonucleótido monocatenario es complementario a una secuencia de la diana de miARN.

88. El método de acuerdo con el párrafo 87, en donde la síntesis se lleva en la dirección 3' a 5' a - f.

89. El método de acuerdo con el párrafo 87 y 88, en donde la diana de miARN se selecciona entre el grupo que consiste en las dianas de miARN mostradas en la tabla 2.

90. El uso de un oligonucleótido monocatenario de entre 8 - 16 nucleobases de longitud, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno médico asociado con la presencia o sobreexpresión del microARN.

91. El uso de un oligonucleótido monocatenario de entre 8 - 16 nucleobases de longitud, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno médico asociado con la presencia o sobreexpresión del microARN.

92. El tratamiento de una enfermedad o trastorno médico asociado con la presencia o la sobreexpresión del microARN, que comprende la etapa de administrar una composición (tal como la composición farmacéutica) que comprende un oligonucleótido monocatenario de entre 8 - 16 nucleobases de longitud a una persona que necesite tratamiento.

93. Un método para reducir la cantidad eficaz de una diana de miARN en una célula o un organismo, que comprende administrar una composición (tal como la composición farmacéutica) que comprende un oligonucleótido monocatenario de entre 8 - 16 nucleobases a la célula o el organismo.

94. Un método para la desrepresión de un ARNm diana de un miARN en una célula o un organismo, que comprende un oligonucleótido monocatenario de entre 8 - 16 nucleobases (o una composición que comprende dicho oligonucleótido) a la célula o al organismo.

95. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido monocatenario de una longitud de entre 8 y 16 unidades de nucleobase, un diluyente, transportador o adyuvante farmacéuticamente aceptable, en donde al menos una de las unidades de nucleobase del oligonucleótido monocatenario es un análogo de nucleótido y en donde el oligonucleótido monocatenario es complementario a una secuencia de microARN humana.

LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

<130> 2763.0140006

<140> 12/295.960

<141> 20/08/2009

<150> PCT/DK2007/000168

<151> 30/03/2007

<150> PA 2006 00478

<151> 03/04/2006

<150> US 60/788.995

<151> 03/04/2006

<150> PA 2006 00615

<151> 01/05/2006

<150> US 60/796.813

<151> 01/05/2006
 <150> US 60/838.710
 <151> 18/08/2006
 5
 <150> PA 2006 01401
 <151> 30/10/2006
 <160> 110
 10
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 1
 uggaguguga caaugguguu ugu 23
 20
 <210> 2
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 2
 ugugcaaauc caugcaaaac uga 23
 <210> 3
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <400> 3
 uuaaugcuaa ucgugauagg gg 22
 35
 <210> 4
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 4
 uagcuuauca gacugauguu ga 22
 45
 <210> 5
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <400> 5
 uuuguucguu cggcucgcu ga 22
 <210> 6
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 60
 <400> 6
 ttgca 6
 <210> 7

<211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 7
 acactc 6

10

<210> 8
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 8
 agcatt 6

20

<210> 9
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30

<400> 9
 cgaaca 6

<210> 10
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

40

<400> 10
 ataagc 6

<210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 1,2, 3, 4, 20, 21,22, 23
 <223> Nucleótido de LNA modificado

55

<400> 11
 acaaacacca ttgtcacact cca 23

60

<210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14
 <223> Nucleótido de LNA modificado

10 <400> 12
 acaaacacca ttgtcacact cca 23

15 <210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21
 <223> Nucleótido de LNA modificado

30 <400> 13
 acaaacacca ttgtcacact cca 23

35 <210> 14
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

50 <400> 14
 ccattgtcac actcc 15

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

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

70 <400> 15
 ccattgtcac actcc 15

75 <210> 16
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

80 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> 1,2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13
 <223> Nucleótido de LNA modificado
 <400> 16
 attgtcacac tcc 13
 10
 <210> 17
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> 1,2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11
 <223> Nucleótido de LNA modificado
 <400> 17
 25 tgcacactc c 11
 <210> 18
 <211> 15
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13
 <223> Unidades de 2-prima-OME-ARN
 45 <400> 18
 ccattgtcac actcc 15
 <210> 19
 <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 de LNA modificado
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13
 <223> Unidades de 2-prime-fluoro ADN
 65

<400> 19
 ccattgtcac actcc 15

5 <210> 20
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1,2, 3, 4, 20, 21,22, 23
 <223> Nucleótido de LNA modificado

<400> 20
 tcagtttgc atggattgc aca 23

20 <210> 21
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14
 <223> Nucleótido de LNA modificado

<400> 21
 tcagtttgc atggattgc aca 23

35 <210> 22
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21
 <223> Nucleótido de LNA modificado

50 <400> 22
 tcagtttgc atggattgc aca 23

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

55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

65 <400> 23

5 tgcattgatt tgcac 15
 <210> 24
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

 15 <400> 24
 tgcattgatt tgcac 15

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

 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13
 <223> Nucleótido de LNA modificado

 25 <400> 25
 catgatttg cac 13

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

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11
 <223> Nucleótido de LNA modificado

 35 <400> 26
 tggattgca c 11

 <210> 27
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

 55 <220>

 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

 <220>

<221> misc_feature
 <222> 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13
 <223> Unidades de 2-prima-OME-ARN

5 <400> 27
 tgcatggatt tgcac 15

<210> 28
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13
 <223> Unidades de 2-prime-fluoro ADN

25 <400> 28
 tgcatggatt tgcac 15

30 <210> 29
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 2, 3, 4, 20, 21, 22, 23
 <223> Nucleótido de LNA modificado

<400> 29
 cccctatcac gattagcatt aa 22

45 <210> 30
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14
 <223> Nucleótido de LNA modificado

<400> 30
 cccctatcac gattagcatt aa 22

60 <210> 31
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20
 <223> Nucleótido de LNA modificado

10
 <400> 31
 cccctatcac gattagcatt aa 22

15
 <210> 32
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

30
 <400> 32
 tcacgattag catta 15

35
 <210> 33
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

50
 <400> 33
 tcacgattag catta 15

55
 <210> 34
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13
 <223> Nucleótido de LNA modificado

70
 <400> 34
 acgattagca tta 13

75
 <210> 35
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1,2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11
 <223> Nucleótido de LNA modificado

10
 <400> 35
 gattagcatt a 11

15
 <210> 36
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 4, 5, 9, 11, 13
 <223> Unidades de 2-prima-OME ARN

35
 <400> 36
 tcacgattag catta 15

40
 <210> 37
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13
 <223> Unidades de 2-prime-fluoro ADN

60
 <400> 37
 tcacgattag catta 15

65
 <210> 38
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1,2, 3, 4, 20, 21,22, 23
 <223> Nucleótido de LNA modificado

<400> 38
 tcaacatcag tctgataagc ta 22

5 <210> 39
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14
 <223> Nucleótido de LNA modificado

<400> 39
 tcaacatcag tctgataagc ta 22

20 <210> 40
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3, 6, 9, 12, 15, 18, 19, 21
 <223> Nucleótido de LNA modificado

35 <400> 40
 tcatcatcag tctgataagc tt 22

40 <210> 41
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

<400> 41
 tcagtctgat aagct 15

55 <210> 42
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

tcagtctgat aagct 15

5 <210> 43
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1,2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13
 <223> Nucleótido de LNA modificado

20 <400> 43
 agtctgataa gct 13

25 <210> 44
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1,2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11
 <223> Nucleótido de LNA modificado

40 <400> 44
 tctgataagc t 15

45 <210> 45
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13
 <223> Unidades de 2-prima-OME ARN

65 <400> 45
 tcagtctgat aagct 15

70 <210> 46
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

80 <220>
 <221> misc_feature

<222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13
 <223> Unidades de 2-prime-fluoro ADN

10
 <400> 46
 tcagtctgat aagct 15

15
 <210> 47
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 2, 3, 4, 19, 20, 21,22
 <223> Nucleótido de LNA modificado

30
 <400> 47
 tctcgcgtgc cgttcgttct tt 22

35
 <210> 48
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14
 <223> Nucleótido de LNA modificado

50
 <400> 48
 tctcgcgtgc cgttcgttct tt 22

55
 <210> 49
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21
 <223> Nucleótido de LNA modificado

<400> 49
 tctcgcgtgc cgttcgttct tt 22

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

<220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado
 <400> 50
 gtgccgttcg ttctt 15
 10
 <210> 51
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado
 <400> 51
 25 gtgccgttcg ttctt 15
 <210> 52
 <211> 13
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13
 <223> Nucleótido de LNA modificado
 40 <400> 52
 gccgttcggtt ctt 13
 <210> 53
 <211> 11
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11
 <223> Nucleótido de LNA modificado
 55 <400> 53
 cgttcgttct t 11
 <210> 54
 <211> 15
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13
 <223> Unidades de 2-prima-OME ARN
 <400> 54
 15 gtgccgttcg ttctt 15
 <210> 55
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13
 <223> Unidades de 2-prime-fluoro ARN
 <400> 55
 35 gtgccgttcg ttctt 15
 <210> 56
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (1)..(16)
 <223> enlace fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> 2, 8, 14
 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> 5, 11
 <223> Nucleótido de LNA modificado
 <400> 56
 60 ccattgtcac actcca 16
 <210> 57
 <211> 16
 <212> ADN
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(16)
 <223> enlace fosforotioato
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3, 6, 9
 <223> Nucleótido de LNA modificado
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 12, 15
 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada
 20
 <400> 57
 ccattgtcac actcca 16
 25
 <210> 58
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(16)
 <223> enlace fosforotioato
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 2, 14, 15
 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3, 13
 <223> Nucleótido de LNA modificado
 <400> 58
 ccattgtcac actcca 16
 50
 <210> 59
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(15)
 <223> enlace fosforotioato
 65
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 10, 12, 14, 15

<223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> 3, 6, 7
 <223> Nucleótido de LNA modificado
 <400> 59
 10 ccattgtcac actcc 15
 <210> 60
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)...(15)
 <223> enlace fosforotioato
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> 1, 6, 10, 12, 15
 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> 3, 7, 14
 <223> Nucleótido de LNA modificado
 <400> 60
 35 ccattctgac cctac 15
 <210> 61
 <211> 16
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(16)
 <223> enlace fosforotioato
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3, 6, 9, 12
 <223> Nucleótido de LNA modificado
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 15
 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada
 60 <400> 61
 ccattgtctc aatcca 16
 <210> 62
 <211> 13

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 10 <223> enlace fosforotioato

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 4, 5
 15 <223> Nucleótido de LNA modificado

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 8, 10, 12, 13
 20 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

 <220>
 <400> 62
 25 **atgtcacac tcc** 13

 <210> 63
 <211> 15
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(15)
 <223> Enlace fosforotioato

 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 6, 10, 12, 15
 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3, 7, 14
 <223> Nucleótido de LNA modificado

 50 <400> 63
 ccattctgac cctac 15

 <210> 64
 <211> 22
 55 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 64
 60 uagcuauca gacugauguu ga 22

 <210> 65
 <211> 16
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 2, 3, 13, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

10 <400> 65
 tcagtctgat aagcta 16

15 <210> 66
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 2, 3, 13, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

30 <400> 66
 tccgtcttag aagata 16

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

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 3, 6, 7, 10 12, 14, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

50 <400> 67
 tctgtcagat acgat 15

55 <210> 68
 <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 de LNA modificado

<400> 68
 tcagtctgat aagct 15

<210> 69
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

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

5 <210> 75
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

10 <400> 75
 gtcacactc 9

<210> 76
 <211> 7
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 76
 tagcatt 7

<210> 77
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30 <400> 77
 ttagcatt 8

<210> 78
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

40 <400> 78
 attagcatt 9

<210> 79
 <211> 7
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 79
 acgaaca 7

<210> 80
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

60 <400> 80

65

ES 2 715 625 T3

aacgaaca 8

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

10 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 81
gaacgaaca 9

20 <210> 82
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

30 <220>
<221> misc_feature
<222> 3, 15
<223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

35 <220>
<221> misc_feature
<222> 6, 9, 12
<223> Nucleótido de LNA modificado

40 <400> 82
tgcattgatt tgcaca 16

45 <210> 83
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

55 <220>
<221> misc_feature
<222> 3, 15
<223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

60 <220>
<221> misc_feature
<222> 6, 9, 12
<223> Nucleótido de LNA modificado

65 <400> 83
tgcattgatt tgcac 15

70 <210> 84
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

75 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

80 <220>

<221> misc_feature
 <222> 1, 13
 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 4, 7, 10
 <223> Nucleótido de LNA modificado

10

<400> 84
 catggattg cac 13

<210> 85
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14
 <223> Nucleótido de LNA modificado

25

<400> 85
 tgcattgatt tgac 15

<210> 86
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12
 <223> Nucleótido de LNA modificado

40

<400> 86
 catggattg cac 13

45

<210> 87
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 13
 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 4, 5, 8, 10, 12
 <223> Nucleótido de LNA modificado

60

<400> 87
 catggattg cac 13

65

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

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 14
 10 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 5, 8, 11
 15 <223> Nucleótido de LNA modificado

 <400> 91
 ccattgtaac tctcca 16

 20 <210> 92
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 12, 15
 30 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3, 6, 9
 35 <223> Nucleótido de LNA modificado

 <400> 92
 ccattgtcac actcca 16
 40
 <210> 93
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 8, 14
 50 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 5, 11
 55 <223> Nucleótido de LNA modificado

 <400> 93
 ccattgtcac actcc 15
 60
 <210> 94
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 6, 12
 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3, 9
 <223> Nucleótido de LNA modificado

15 <400> 94
 attgtcacac tcc 13

 <210> 95
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

25

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 12, 15
 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

30

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3, 6, 9
 <223> Nucleótido de LNA modificado

35

 <400> 95
 ccattgtcac actcc 15

40

 <210> 96
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 10, 13
 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

50

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1,4, 7
 <223> Nucleótido de LNA modificado

55

 <400> 96
 attgtcacac tcc 13

60

 <210> 97
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

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

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1, 15
 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 4, 7, 11
 <223> Nucleótido de LNA modificado

15
 <400> 100
 ccattgtcac actcca 16

20
 <210> 101
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1,2, 14, 15
 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3, 13
 <223> Nucleótido de LNA modificado

40
 <400> 101
 ccattgtcac actcca 16

45
 <210> 102
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 11
 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 5, 8, 14
 <223> Nucleótido de LNA modificado

65
 <400> 102
 tcacgattag cattaa 16

70
 <210> 103
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

80
 <220>
 <221> misc_feature

ES 2 715 625 T3

<222> 5
<223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

5 <220>
<221> misc_feature
<222> 2, 8, 11, 14
<223> Nucleótido de LNA modificado

10 <400> 103
atcacgatta gcatta 16

15 <210> 104
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

25 <220>
<221> misc_feature
<222> 11
<223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

30 <220>
<221> misc_feature
<222> 1, 3, 5, 7, 9, 13, 15
<223> Nucleótido de LNA modificado

35 <400> 104
tcacgattag catta 16

40 <210> 105
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

50 <220>
<221> misc_feature
<222> 12
<223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

55 <220>
<221> misc_feature
<222> 1, 4, 6, 8, 10, 14
<223> Nucleótido de LNA modificado

60 <400> 105
atcacgatta gcatta 16

65 <210> 106
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

70 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

75 <220>
<221> misc_feature
<222> 5
<223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 8, 11, 14
 5 <223> Nucleótido de LNA modificado

 <400> 106
 gagccgaacg aaca 15

 10 <210> 107
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> 3
 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> 6, 9, 12
 <223> Nucleótido de LNA modificado

 <400> 107
 gccgaacgaa caa 13
 30
 <210> 108
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> 5, 9, 13
 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> 1, 3, 7, 11, 15
 <223> Nucleótido de LNA modificado

 <400> 108
 50 gagccgaacg aaca 15

 <210> 109
 <211> 13
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3, 7, 11
 <223> Citosina 5-prima metilada de LNA modificada

 65 <220>

ES 2 715 625 T3

<221> misc_feature
<222> 1, 5, 9, 13
<223> Nucleótido de LNA modificado

5 <400> 109
gccgaacgaa caa 13

<210> 110
<211> 15
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido generado de manera sintética

15 <400> 110
ccattgtcac actcc 15

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido monocatenario, de 8-17 nucleótidos de longitud, capaz de reducir la cantidad eficaz de un microARN humano maduro en una célula, en donde al menos una de las unidades de nucleobases del oligonucleótido es una unidad de nucleótido de LNA y en donde todos los enlaces internucleósido son enlaces de fosforotioato, en donde el oligonucleótido es complementario a la secuencia de microARN humana madura, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende una región de secuencia de nucleobases contigua que es un 100 % complementaria a la región de semilla de microARN humana y en donde el oligonucleótido comprende al menos una unidad de nucleótido de LNA en una posición que se encuentra dentro de la región complementaria a la región de semilla de miARN, además en donde:
- (a) las unidades de nucleobases 1 a 6 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario, son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN; o
 - (b) las unidades de nucleobases 1 a 7 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario, son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN; o
 - (c) las unidades de nucleobases 2 a 7 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario, son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN.
2. Un oligonucleótido monocatenario, de 8-17 nucleótidos de longitud, capaz de reducir la cantidad eficaz de un microARN humano maduro en una célula, en donde al menos una de las unidades de nucleobases del oligonucleótido es una unidad de nucleótido de LNA y en donde todos los enlaces internucleósido son enlaces de fosforotioato, en donde el oligonucleótido es complementario a la secuencia de microARN humana madura, en donde el oligonucleótido monocatenario comprende una región de secuencia de nucleobases contigua que es un 100 % complementaria a la región de semilla de microARN humana y en donde el oligonucleótido comprende al menos una unidad de nucleótido de LNA en una posición que se encuentra dentro de la región complementaria a la región de semilla de miARN, en donde el oligonucleótido es para su uso como un medicamento, además en donde:
- (a) las unidades de nucleobases 1 a 6 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario, son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN; o
 - (b) las unidades de nucleobases 1 a 7 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario, son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN; o
 - (c) las unidades de nucleobases 2 a 7 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario, son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN.
3. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la primera o la segunda nucleobase 3' del oligonucleótido monocatenario corresponde al segundo nucleótido 5' de la secuencia de microARN.
4. El oligonucleótido de la reivindicación 1 o la reivindicación 3 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el oligonucleótido es capaz de formar un dúplex con una molécula de ácido nucleico de ARN monocatenario complementaria con enlaces internucleósido fosfodiéster, en donde el dúplex tiene una Tm de al menos aproximadamente 60 °C.
5. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde el oligonucleótido es capaz de formar un dúplex con una molécula de ácido nucleico de ADN monocatenario complementaria con enlaces internucleósido fosfodiéster, en donde el dúplex tiene una Tm de 60 - 90 °C.
6. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-5 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, que comprende al menos una unidad de nucleótido de LNA 3' terminal.
7. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-6 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, que comprende al menos una unidad de nucleótido de LNA 5' terminal.
8. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-7 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en donde al menos un 30 % de las nucleobases son unidades de LNA.
9. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-8 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en donde el oligonucleótido comprende al menos una región de al menos dos unidades de LNA consecutivas.
10. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en donde el oligonucleótido no comprende una región de más de 7 unidades de nucleótido de LNA consecutivas.

11. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-10 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-10, en donde el oligonucleótido no comprende una región de más de 6 o de más de 5 o de más de 4 o de más de 3 o de más de 2 unidades de nucleótido de LNA consecutivas.
- 5 12. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-11 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-11, que no comprende una región de más de 5 unidades de nucleótidos de ADN consecutivas.
- 10 13. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-12 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-12, en donde el oligonucleótido no media la escisión basada en RNAsaH de una molécula de ARN monocatenaria complementaria.
- 15 14. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-13 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-13, en donde el oligonucleótido tiene una longitud de entre 8-16 nucleobases.
- 20 15. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-13 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-13, en donde el oligonucleótido tiene una longitud de entre 12-17 nucleobases.
- 25 16. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-13 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-13, en donde el oligonucleótido tiene una longitud de entre 14-17 nucleobases.
- 30 17. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-14 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-14, en donde el oligonucleótido tiene una longitud de 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleobases.
- 35 18. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-15 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-15, en donde el oligonucleótido tiene una longitud de 14 nucleobases.
- 40 19. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-15 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-15, en donde el oligonucleótido tiene una longitud de 15 nucleobases.
- 45 20. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-15 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-15, en donde el oligonucleótido tiene una longitud de 16 nucleobases.
- 50 21. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-15 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-15, en donde el oligonucleótido tiene una longitud de 17 nucleobases.
- 55 22. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-14 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-14, en donde el oligonucleótido tiene una longitud de entre 8-16 nucleobases y en donde el oligonucleótido no comprende una región de más de 7 unidades de nucleótido de LNA consecutivas.
- 60 23. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-14 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-14, en donde el oligonucleótido tiene una longitud de entre 8-16 nucleobases y en donde las unidades de nucleobases 1 a 6 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario, son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN.
- 65 24. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-14 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-14, en donde el oligonucleótido tiene una longitud de entre 8-16 nucleobases y en donde el oligonucleótido no comprende una región de más de 7 unidades de nucleótido de LNA consecutivas, además en donde las unidades de nucleobases 1 a 6 (inclusive) del oligonucleótido monocatenario, medidas desde el extremo 3' del oligonucleótido monocatenario, son complementarias a la secuencia de la región de semilla de microARN.
25. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 22-24 o el oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 22-24, en donde el oligonucleótido tiene una longitud de 14 nucleobases.
26. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 22-24 o el oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 22-24, en donde el oligonucleótido tiene una longitud de 15 nucleobases.
27. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 22-24 o el oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 22-24, en donde el oligonucleótido tiene una longitud de 16 nucleobases.

- 5 28. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-27 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-27, en donde el oligonucleótido tiene al menos dos unidades de LNA en posiciones que son complementarias a la región de semilla de miARN.
- 10 29. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-28 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-28, en donde el oligonucleótido tiene al menos tres unidades de LNA en posiciones que son complementarias a la región de semilla de miARN.
- 15 30. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-29 o el oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-29, en donde el oligonucleótido tiene al menos cuatro unidades de LNA en posiciones que son complementarias a la región de semilla de miARN.
31. Una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido monocatenario de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-30 y un diluyente, transportador o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Regulación negativa de miR-122a con LNA anti-miR122a, en la línea celular Huh-7

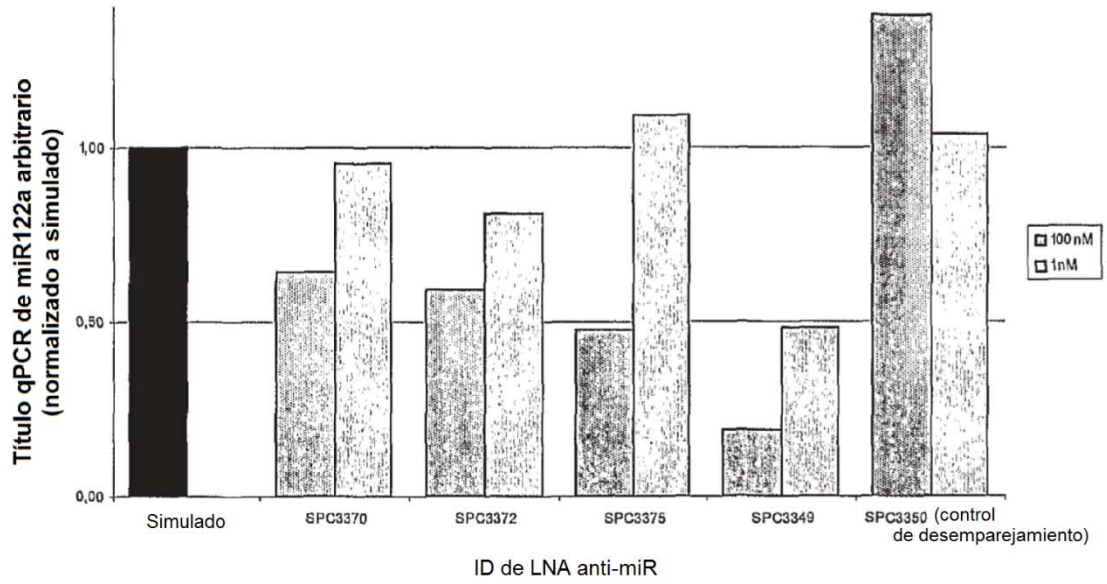


Figura 1

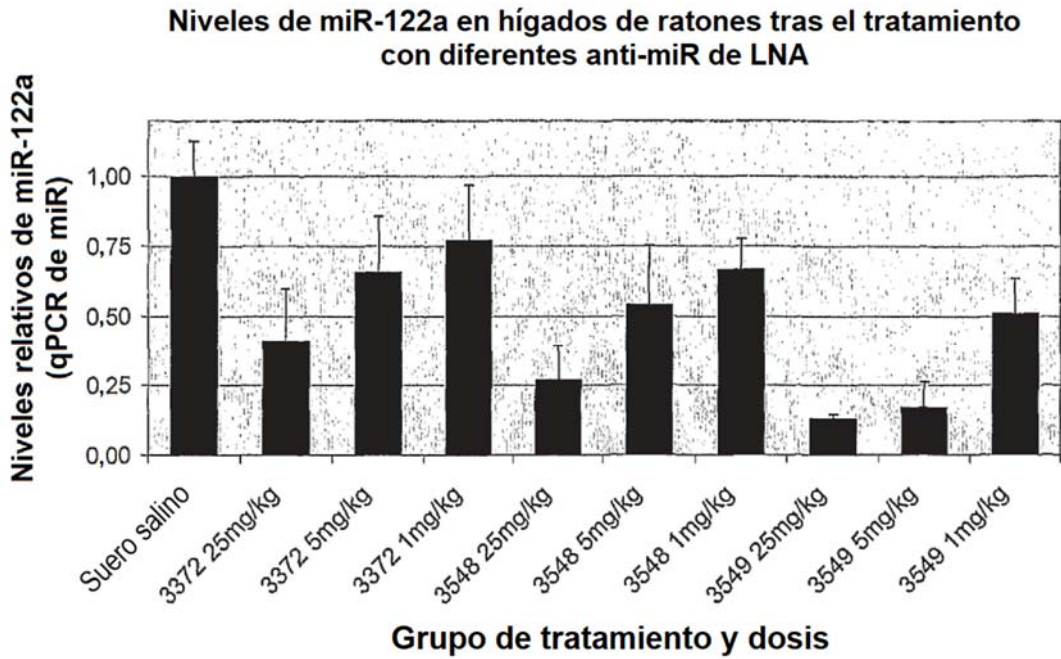


Figura 2

Inhibición con LNA-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 DT, n=8)

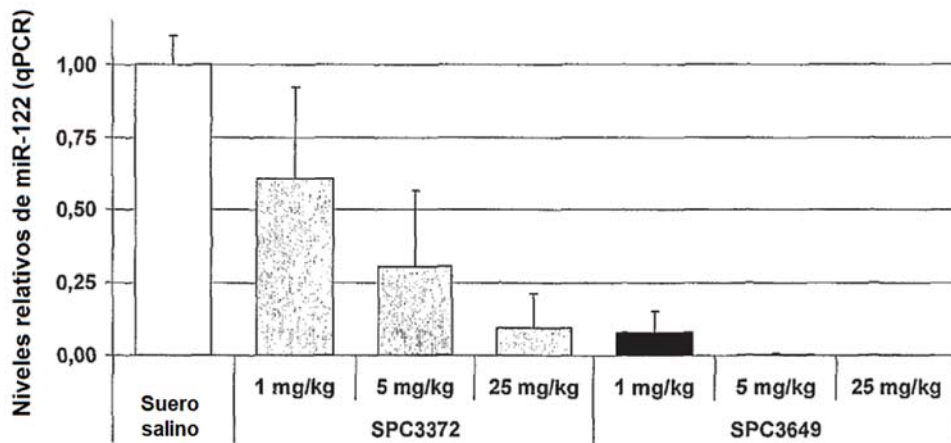
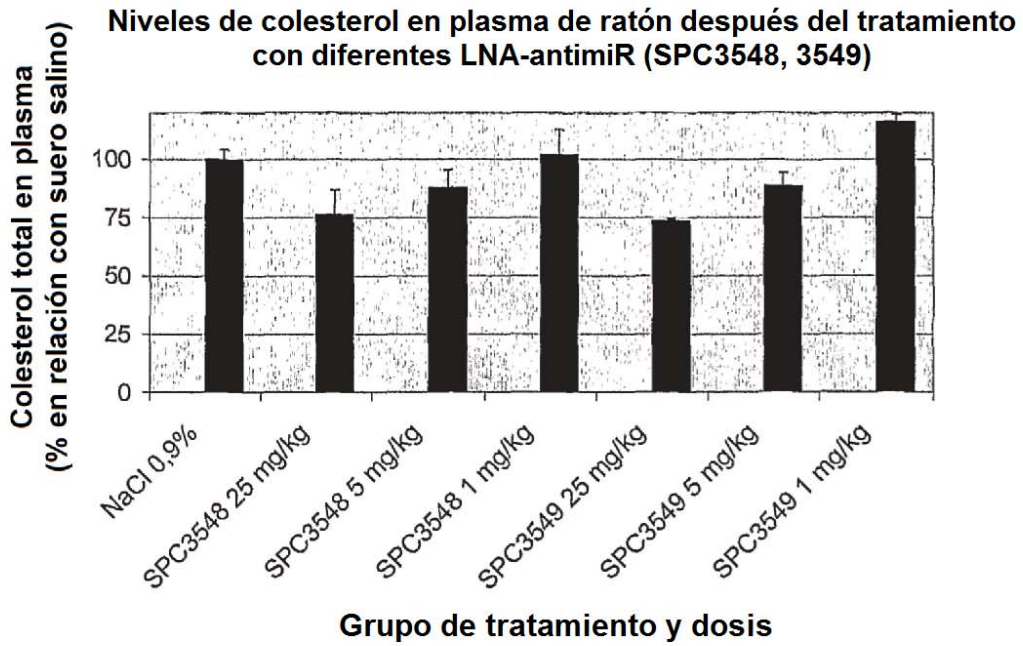


Figura 2b.



Colesterol en plasma total en ratones tratados con LNA-antimiR
 (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 DT, n=8, col. total medio del grupo de salino: 78 mg/dl)

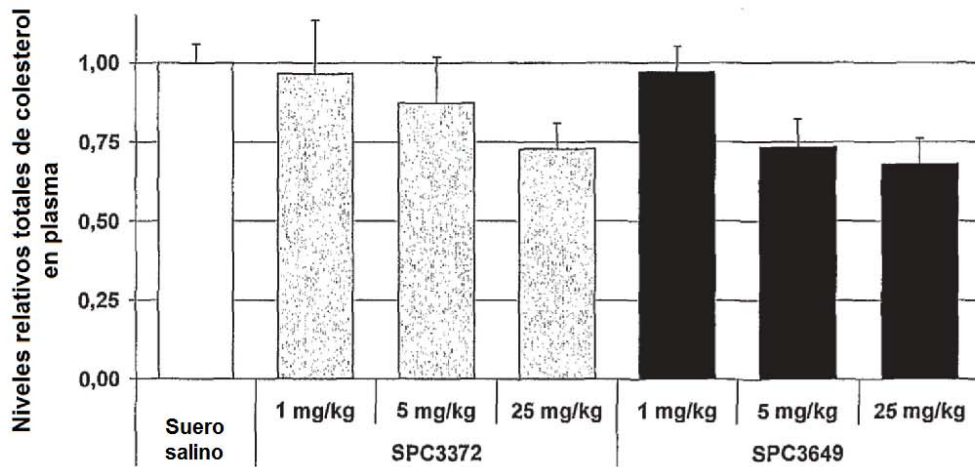


Figura 3 (A y B)

Niveles relativos de ARNm de Bckdk

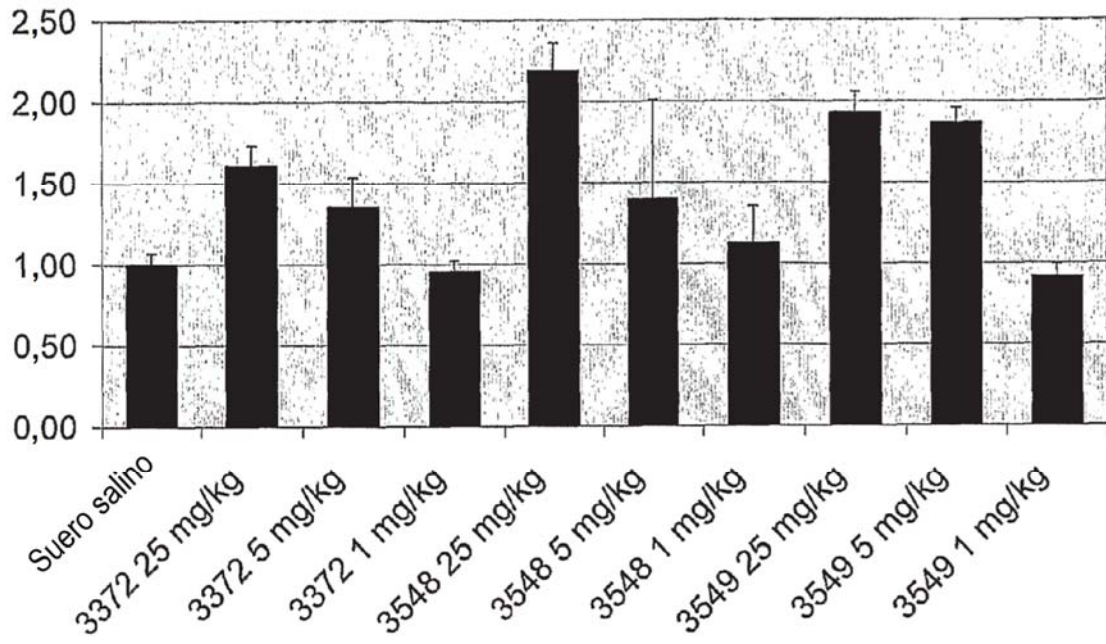


Figura 4a

Niveles relativos de ARNm de Aldo A

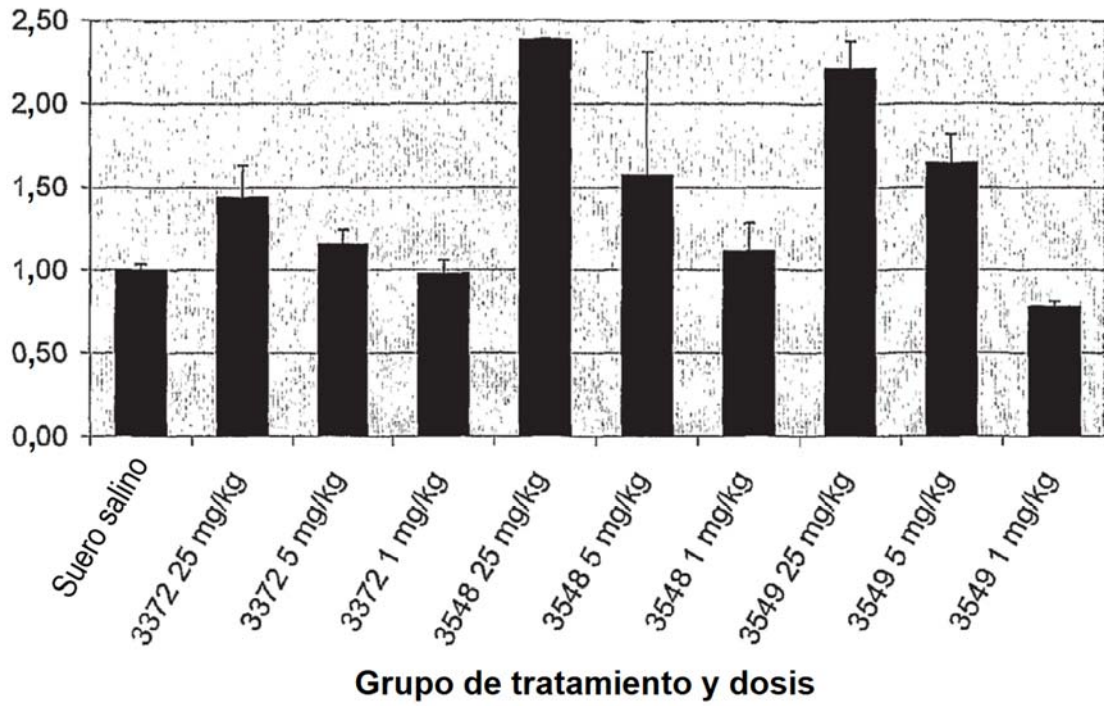


Figura 4b

Niveles de ARNm de GAPDH

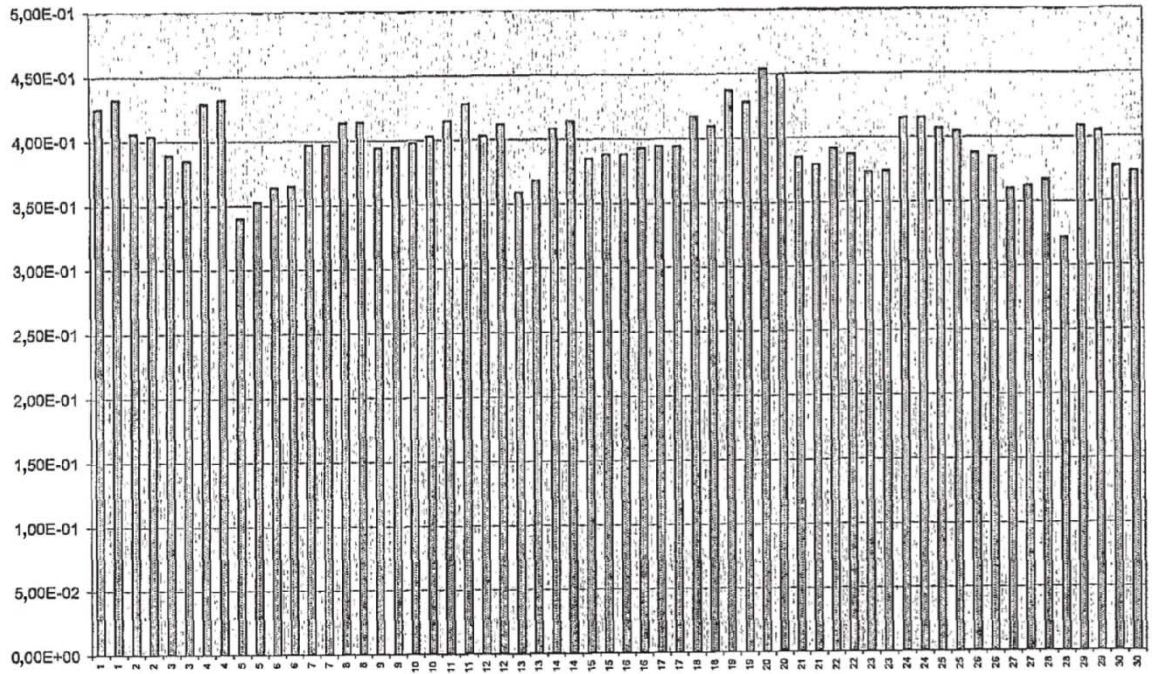


Figura 4c

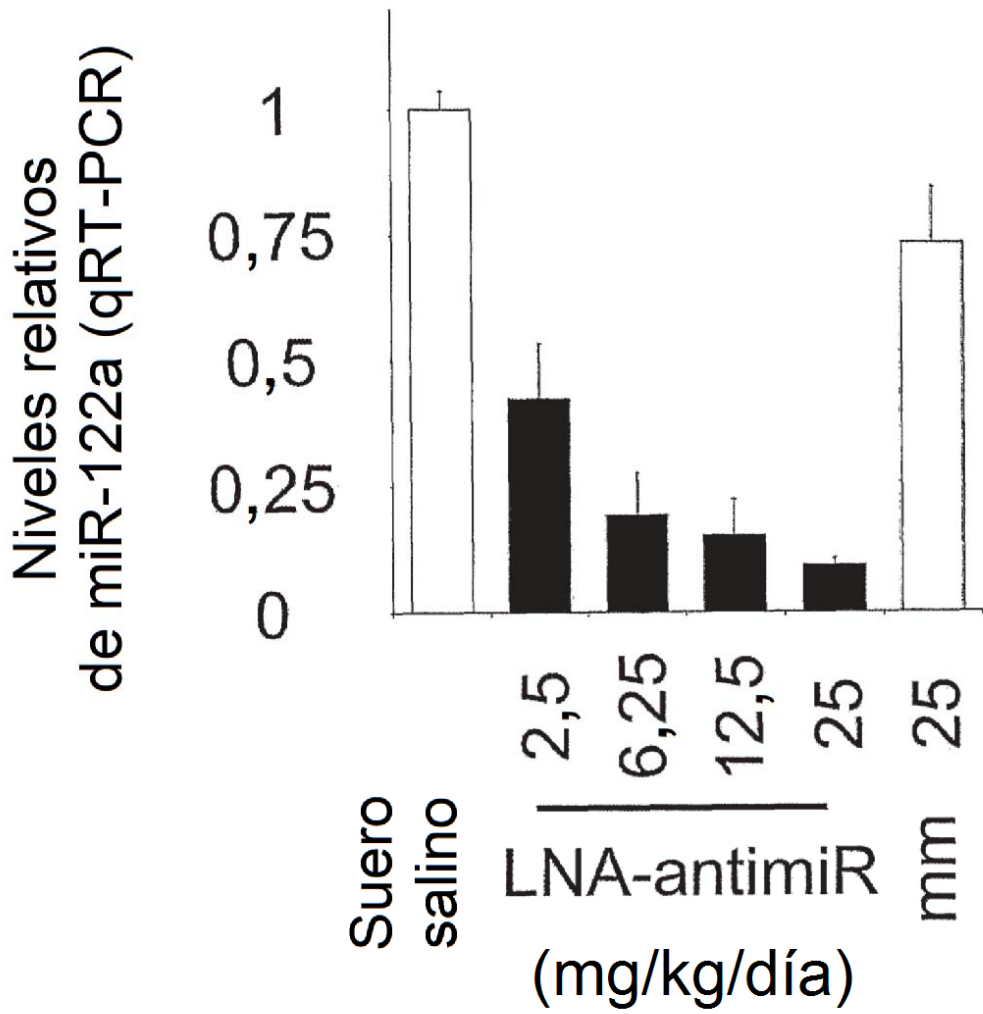


Figura 5

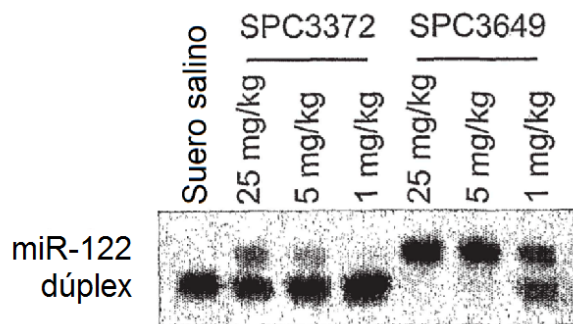


Figura 6

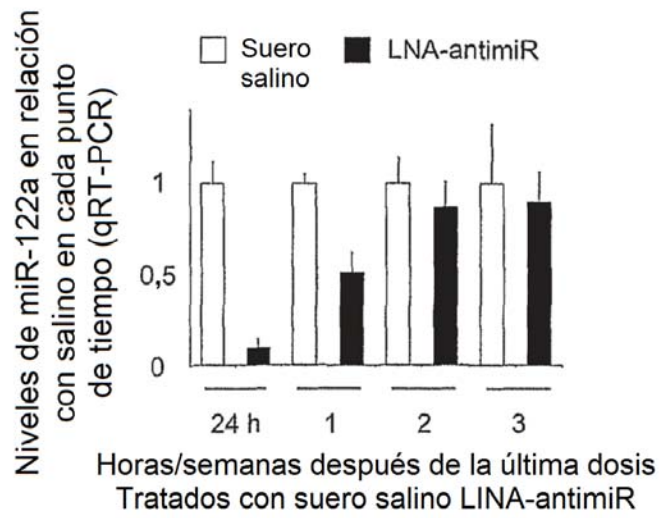


Figura 7

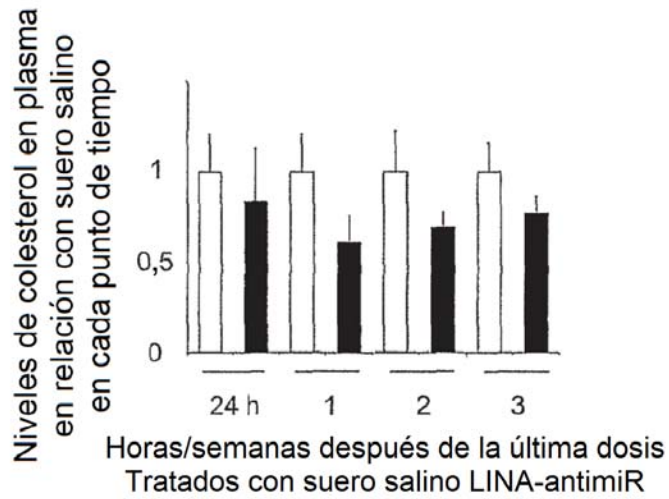


Figura 8

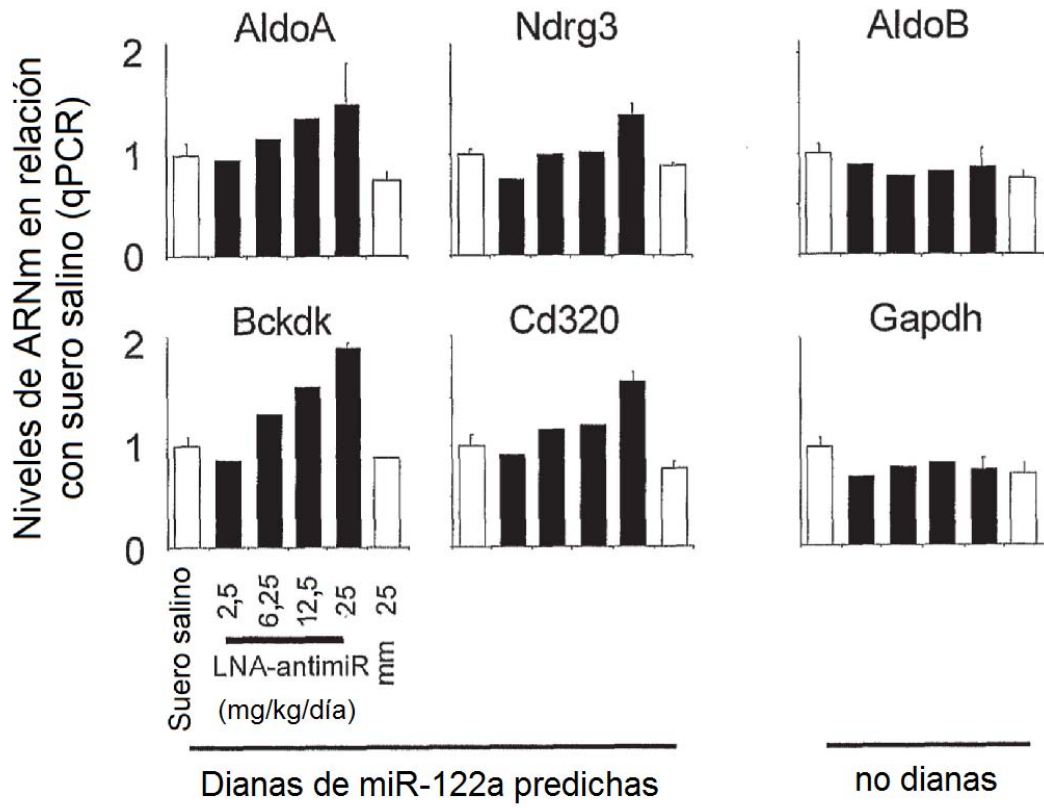


Figura 9

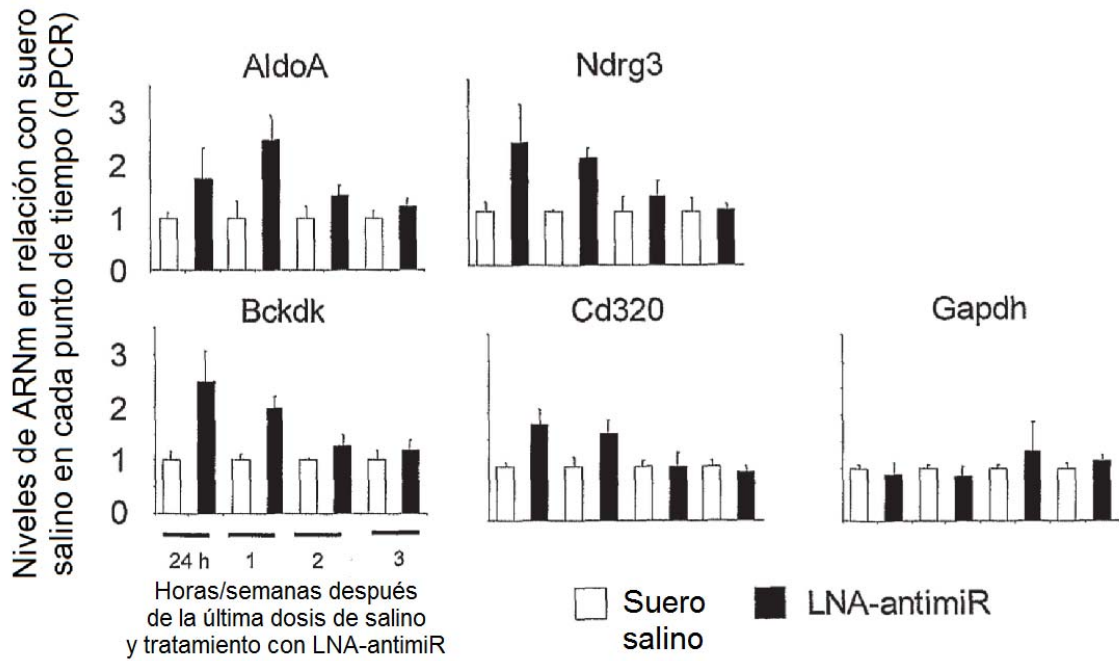


Figura 10

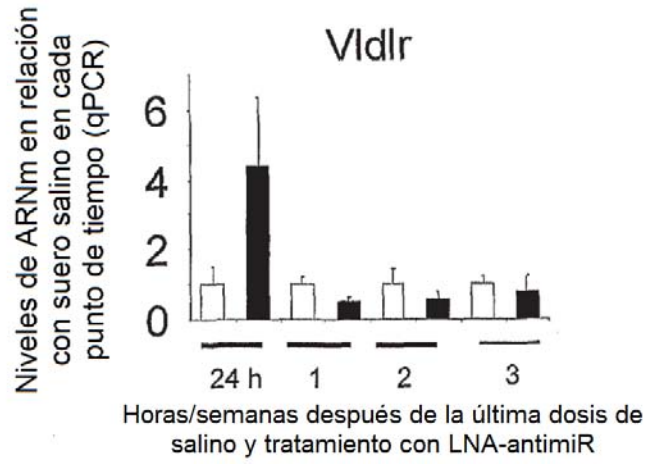


Figura 11

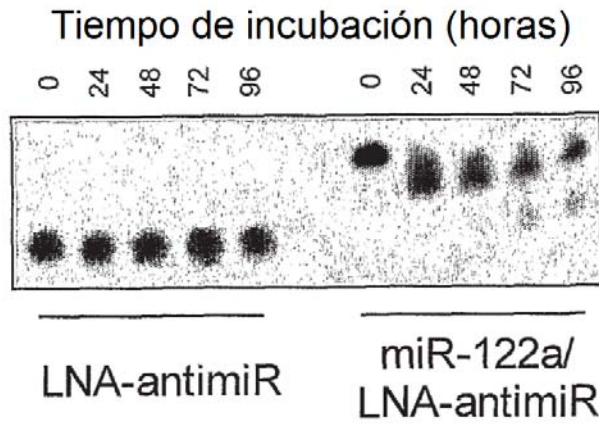


Figura 12

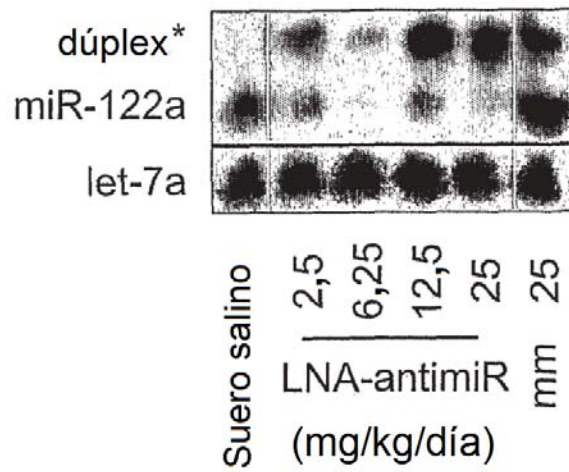


Figura 13

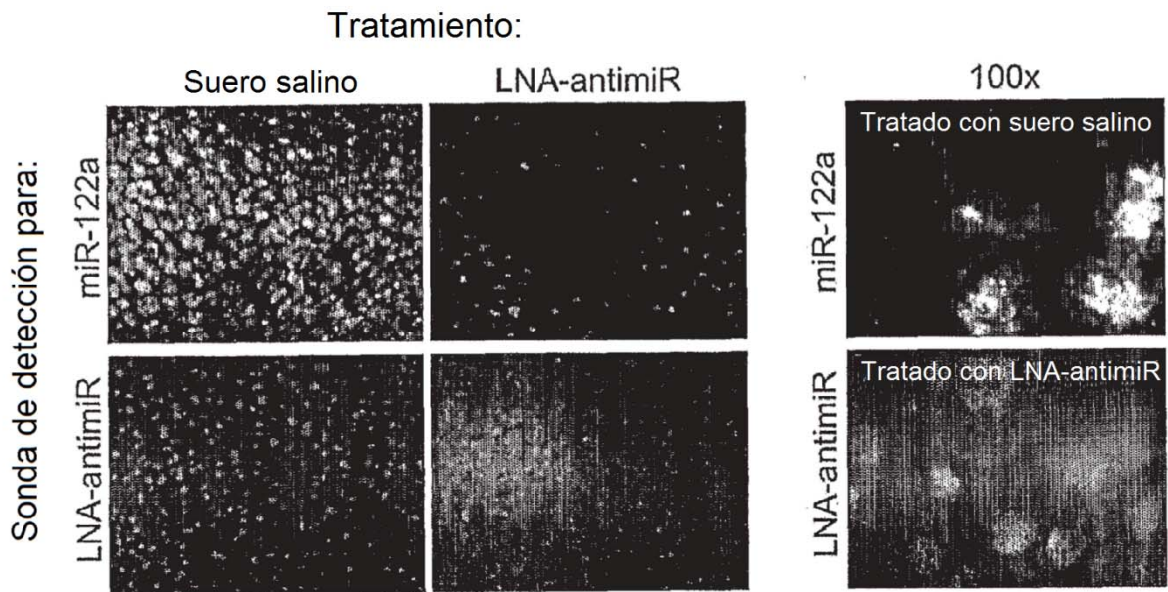


Figura 14

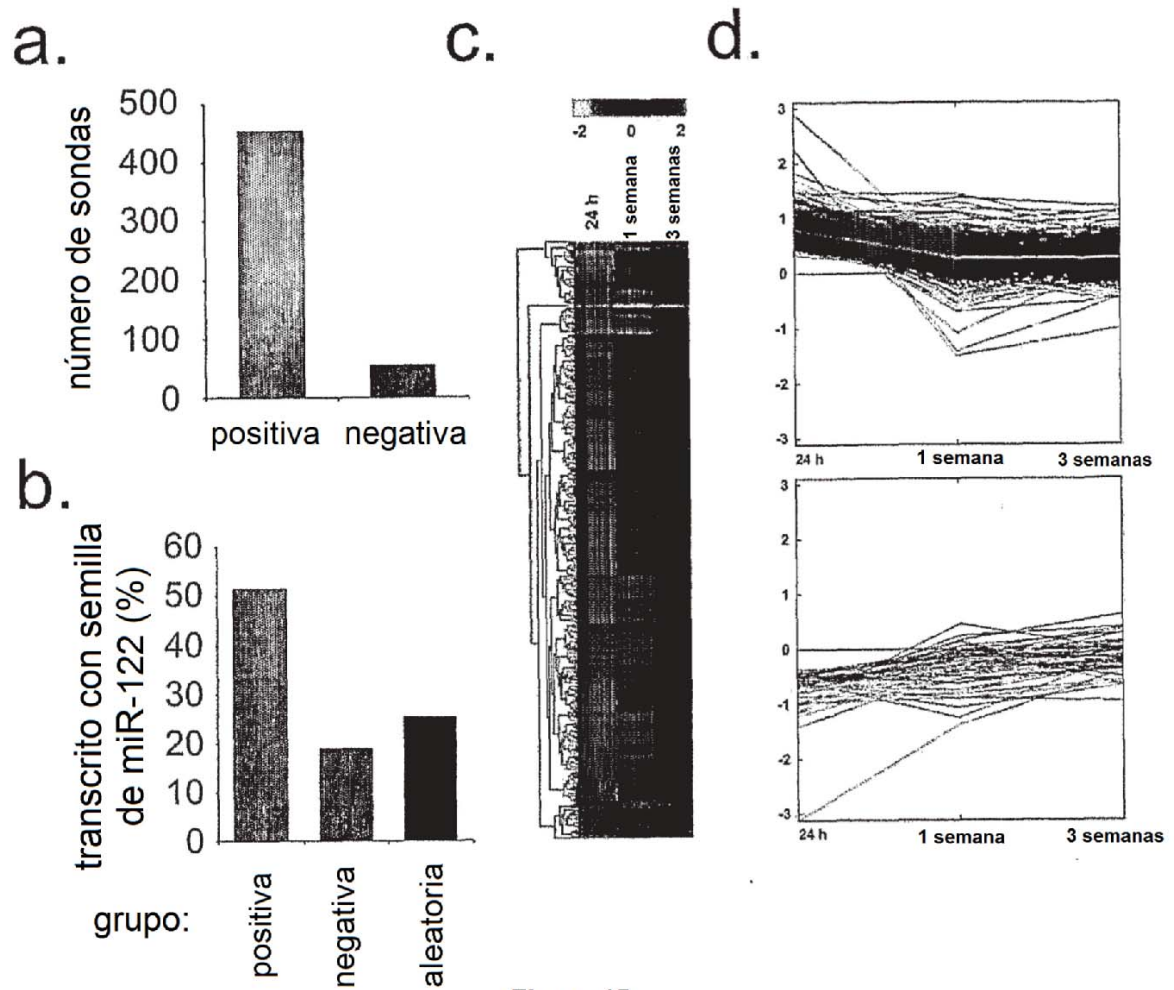


Figura 15

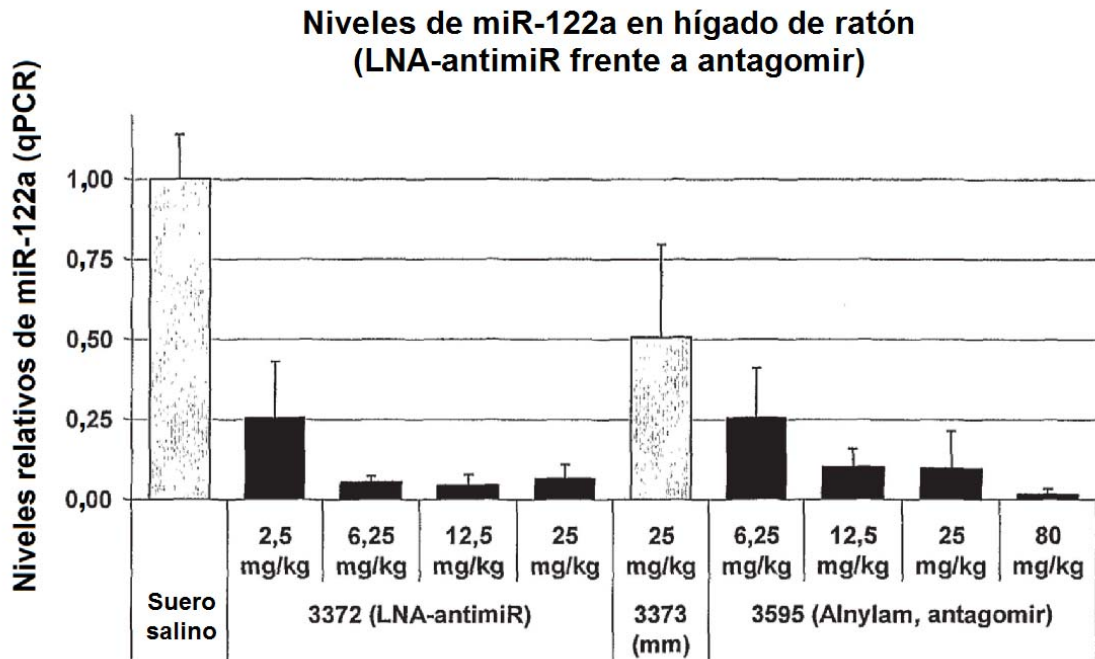


Figura 16

**Inducción de Aldo A por PD-06-030
(normalizado a GAPDH, no normalizado al grupo de NaCl)**

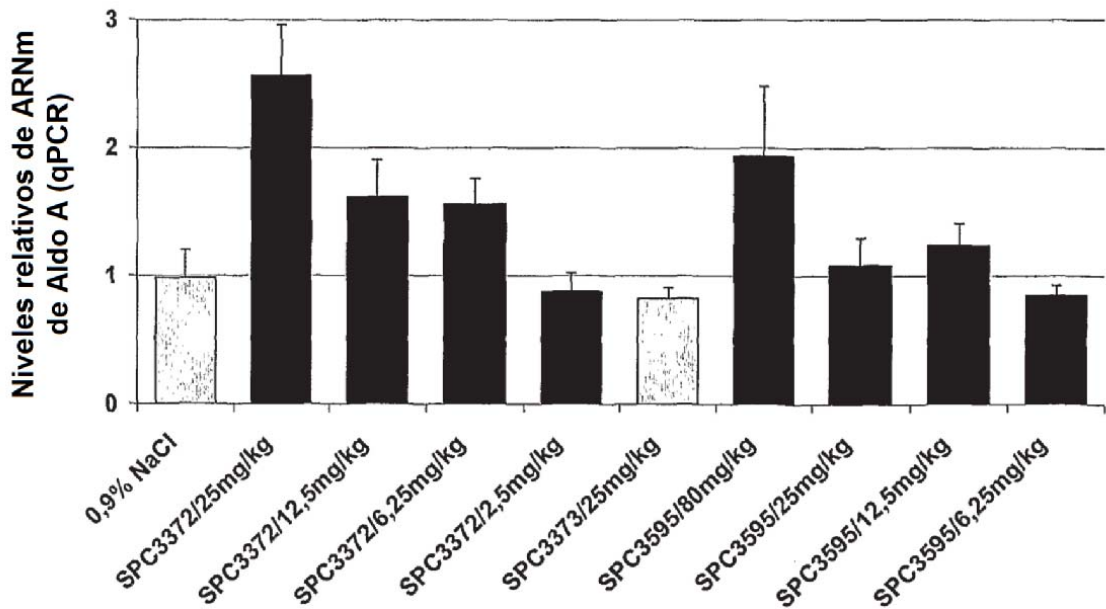


Figura 17

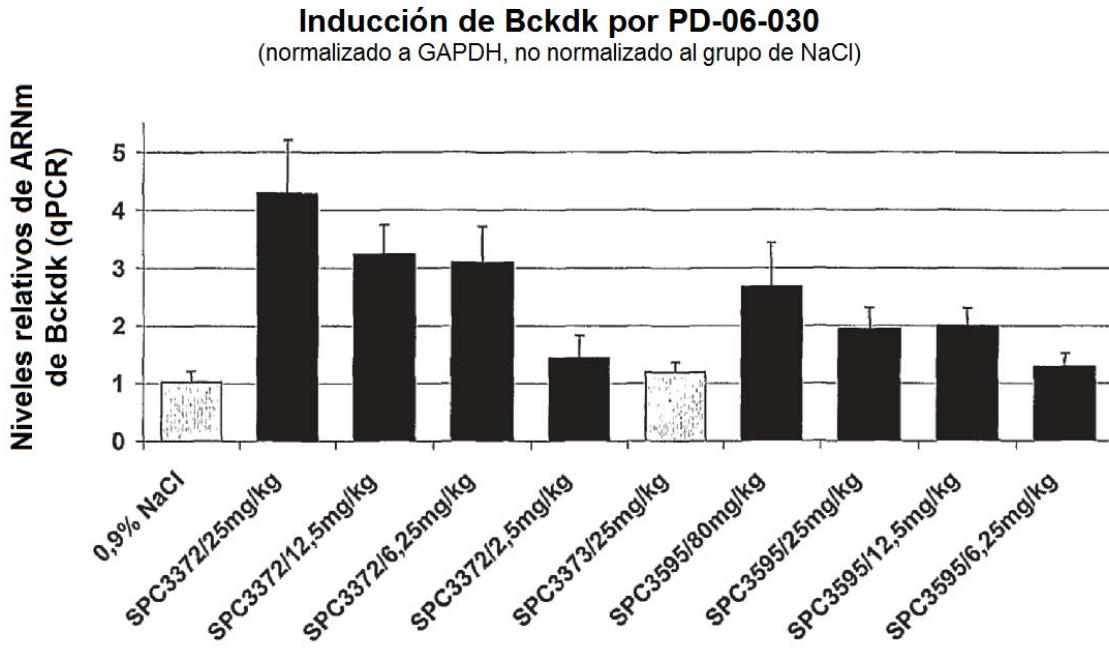


Figura 18

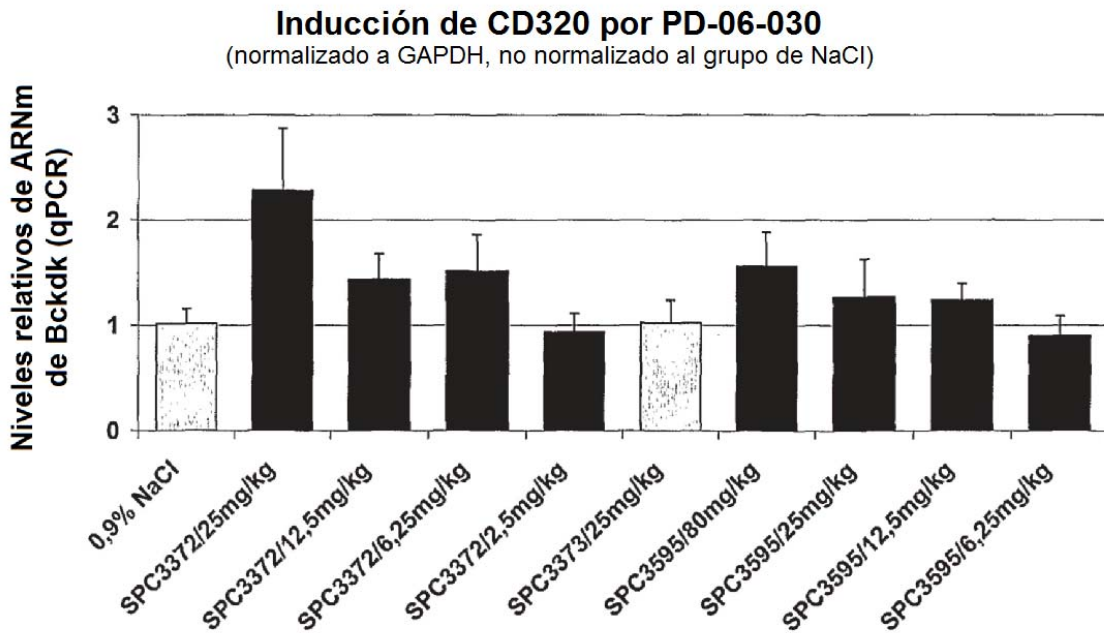


Figura 19

Inducción de Ndr3 por PD-06-030
(normalizado a GAPDH, no normalizado al grupo de NaCl)

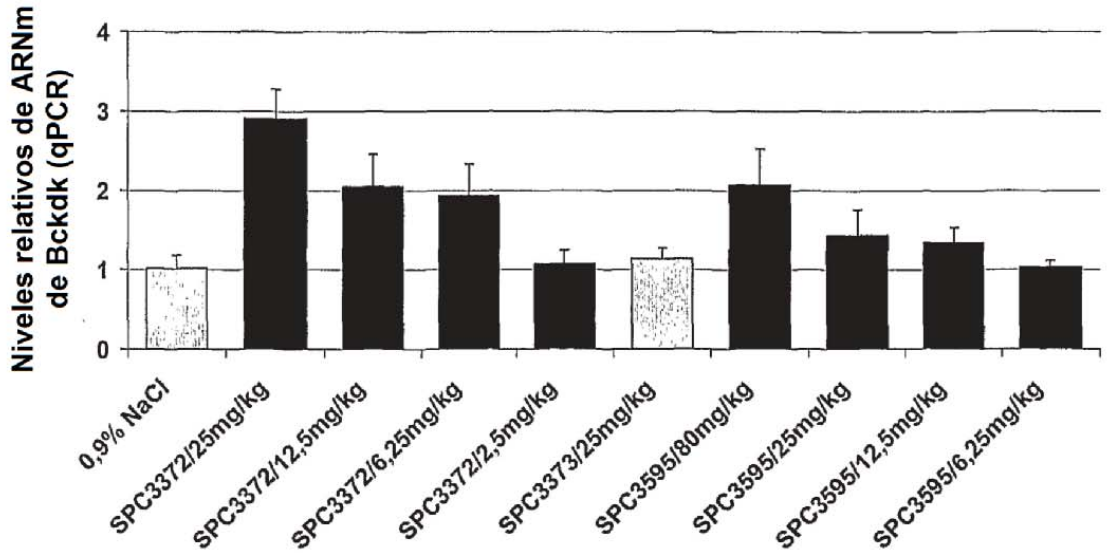


Figura 20

Niveles plasmáticos de colesterol total con el paso del tiempo en ratones con obesidad inducida por la dieta tratados con LNA-antimiR contra miR-122
(SPC3649, control de desemparejamiento SPC3744, PD-06-053/miR-06-036/IB-06-203, media y DT (únicamente NaCl y 3649), n=10 para inducidos por la dieta, n=5 para dieta normal)

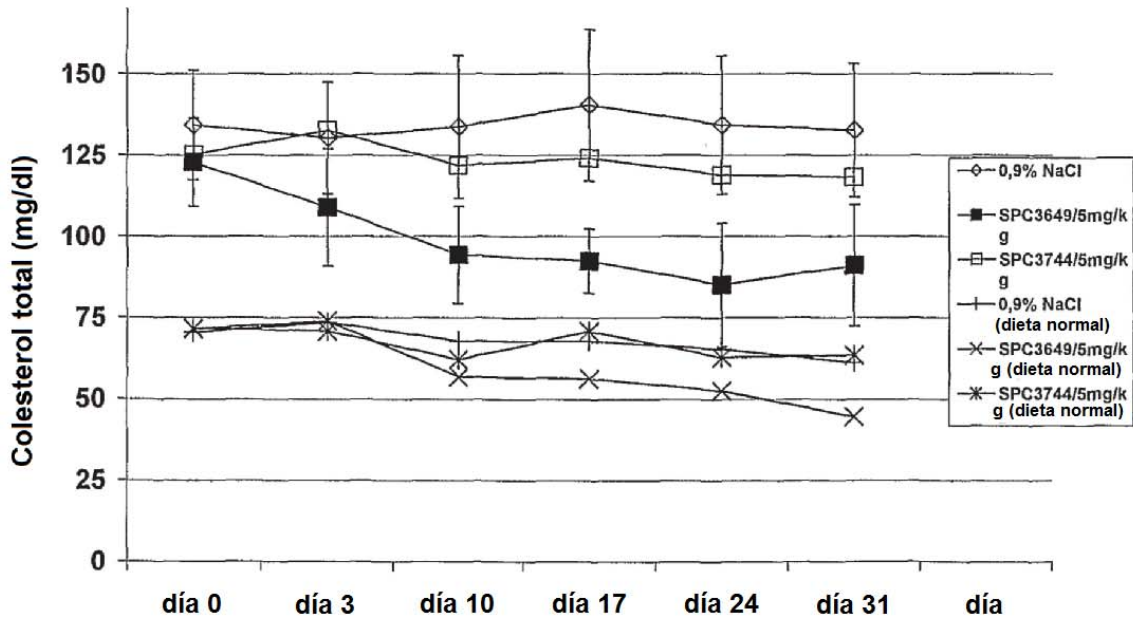


Figura 21

Niveles de miR-122a en el hígado de ratones con obesidad inducida por la dieta tras el tratamiento con LNA-antimiR

(SPC3649, control de desemparejamiento SPC3744, PD-06-053/miR-06-036/IB-06-203, media y DT, norm. a los gr. respectivos de suero salino, n=10 para inducidos por la dieta, n=5 para dieta normal)

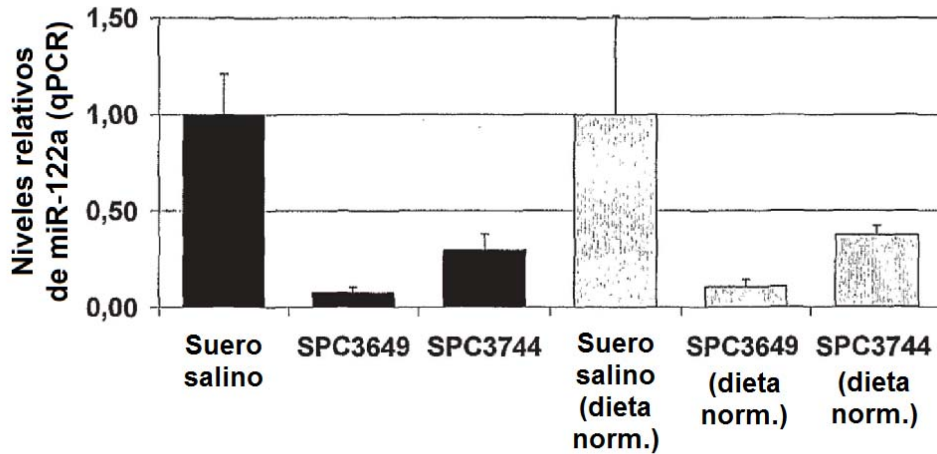


Figura 22

Expresión de ARNm de aldolasa A en hígado de ratones con obesidad inducida por la dieta tras el tratamiento con LNA-antimiR

(SPC3649, control de desemparejamiento SPC3744, PD-06-053/miR-06-036/IB-06-203, media y DT, norm. a los gr. respectivos de suero salino, n=10 para inducidos por la dieta, n=5 para dieta normal)

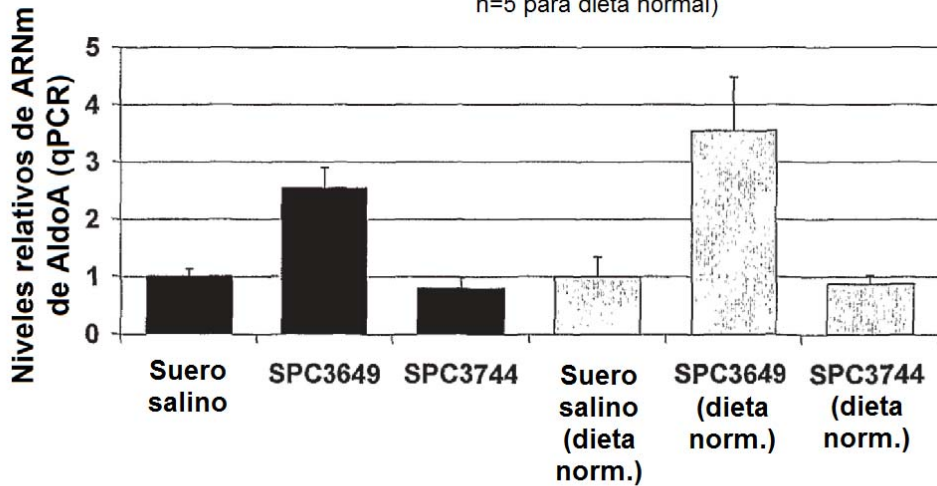


Figura 23

Expresión de ARNm de Bckdk en hígado de ratones con obesidad inducida por la dieta tras el tratamiento con LNA-antimiR

(SPC3649, control de desemparejamiento SPC3744, PD-06-053/miR-06-036/IB-06-203, media y DT, norm. a los gr. respectivos de suero salino, n=10 para inducidos por la dieta, n=5 para dieta normal)

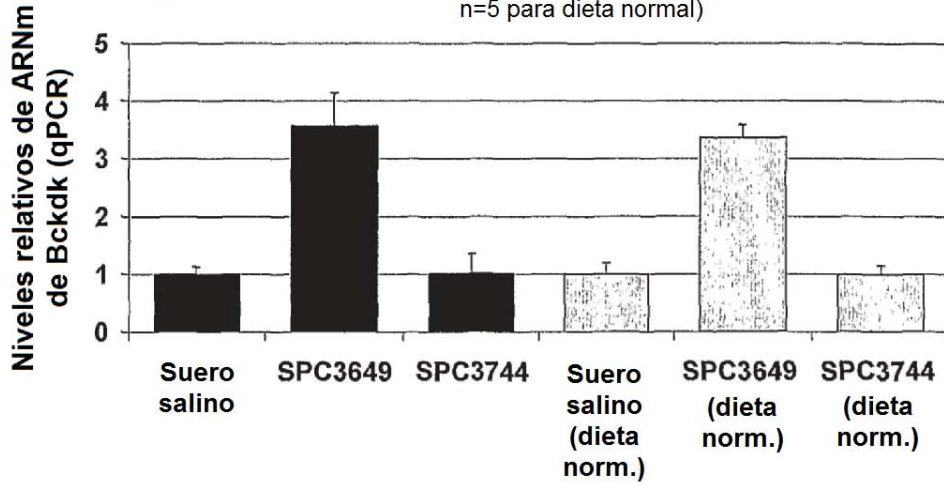


Figura 24

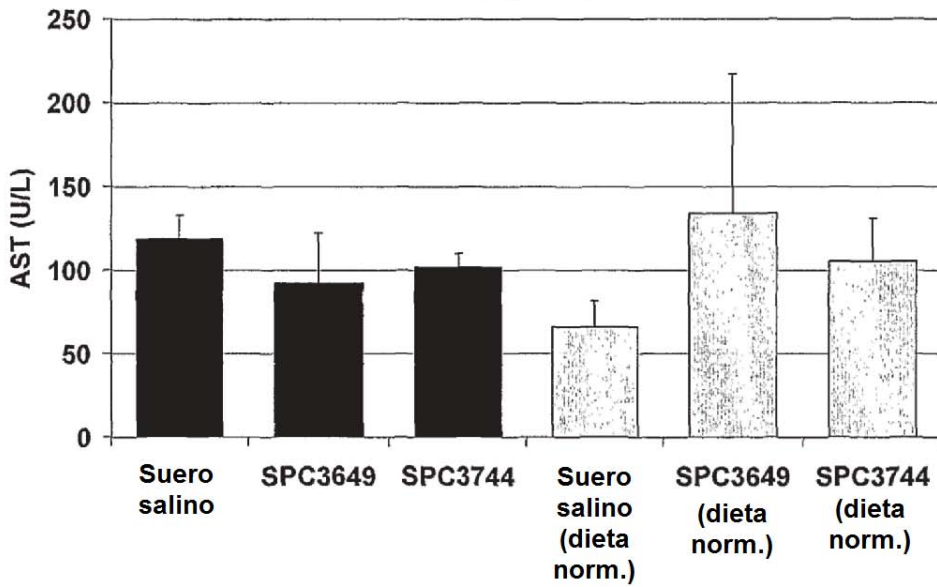


Figura 25

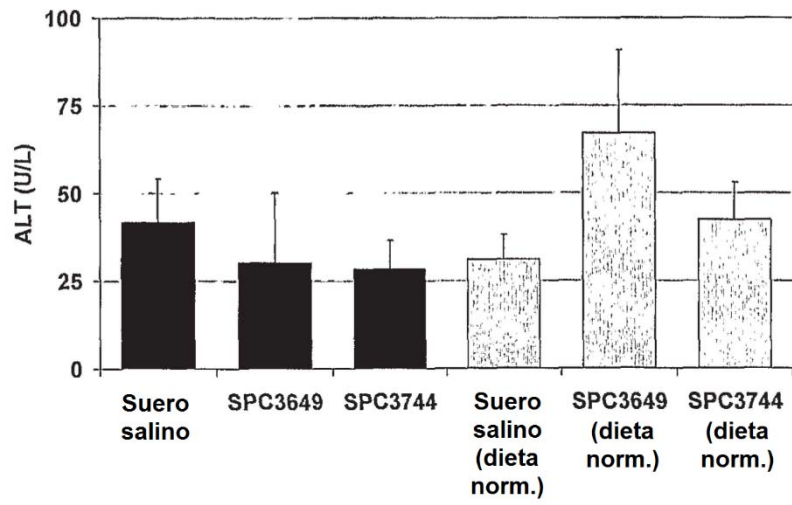


Figura 26

LNA-antimiR, 0,1 nM, células 518A2

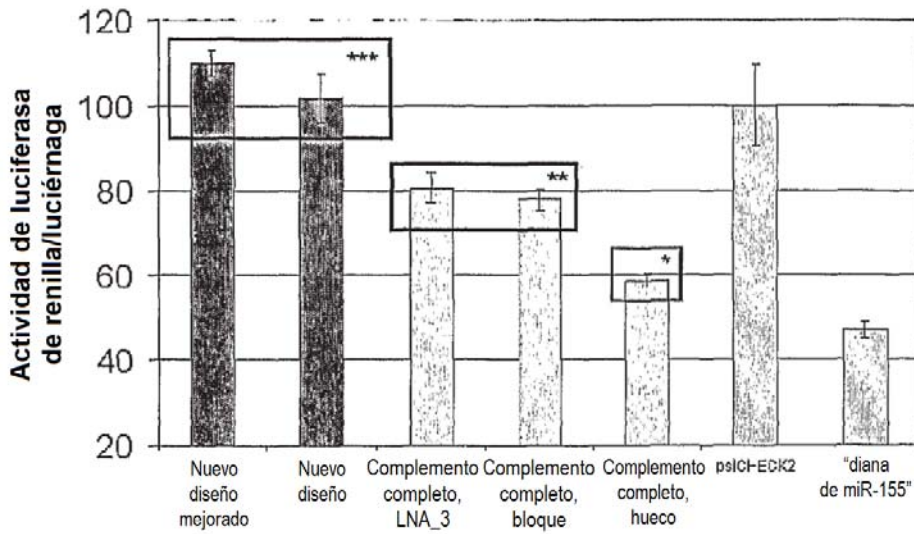


Figura 27

LNA-antimiR, 5 nM, HeLa

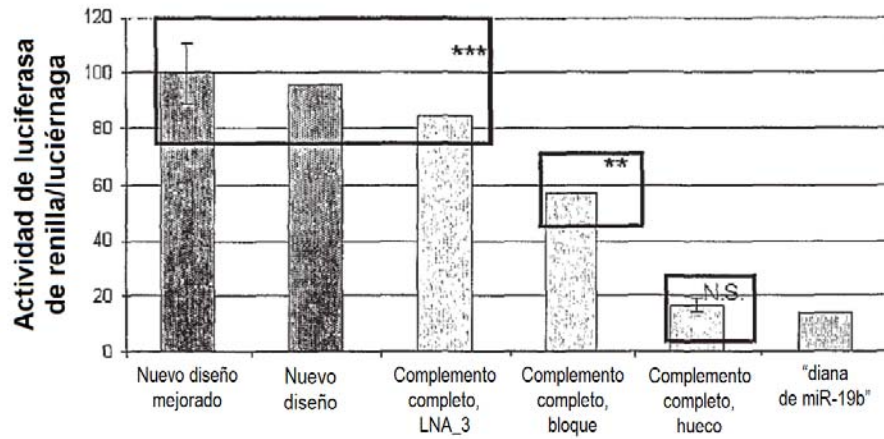


Figura 28

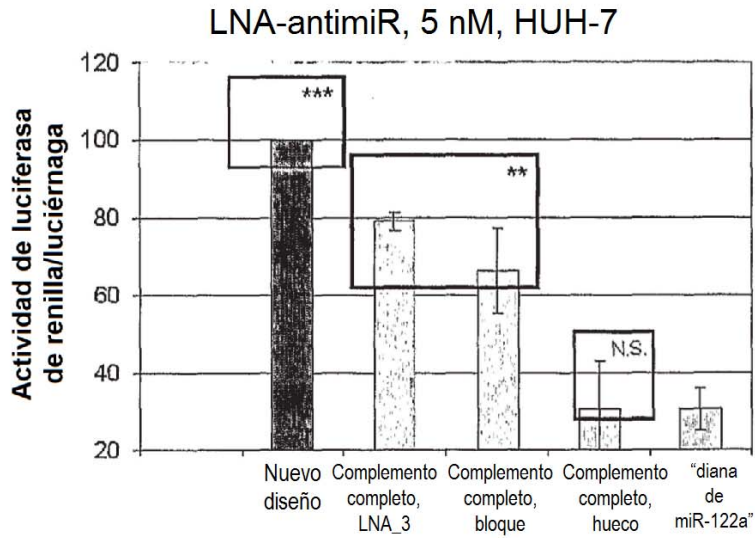


Figura 29

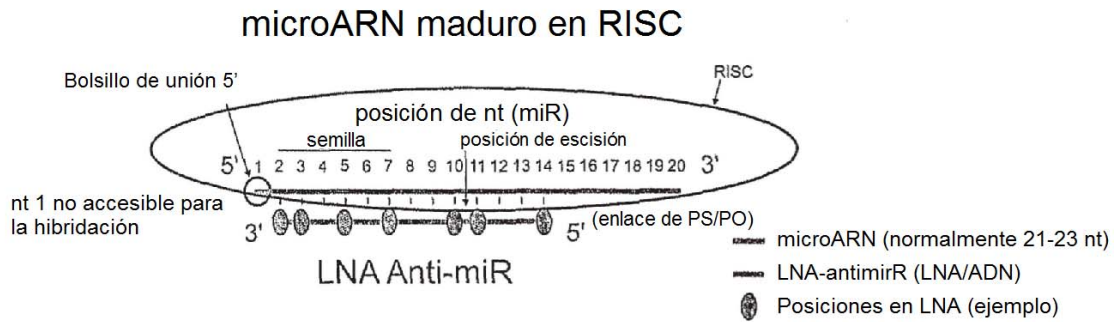


Figura 30