



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 458**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/113** (2006.01)  
**A61K 31/712** (2006.01)  
**A61P 31/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05749437 .9**  
96 Fecha de presentación : **03.05.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1747023**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.01.2007**

54 Título: **Procedimiento y composiciones para reducir las cantidades de genoma viral de VHC en una célula diana.**

30 Prioridad: **04.05.2004 US 568358 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.06.2011**

73 Titular/es: **The Board of Trustees of the Leland  
Stanford Junior University  
1705 El Camino Real  
Palo Alto, California 94306-1106, US**

72 Inventor/es: **Sarnow, Peter;  
Jopling, Catherine, L. y  
Lancaster, Alissa, M.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 361 458 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

Procedimientos y composiciones para reducir las cantidades de genoma viral de VHC en una célula diana

**Introducción****Antecedentes de la invención**

- 5 Las infecciones virales son un problema médico continuo debido a que, como cualquier agente infeccioso que se divide rápidamente, existen mutaciones continuas que ayudan a algunas subpoblaciones de virus a continuar siendo resistentes a los regímenes de tratamiento actuales. Muchas enfermedades basadas en virus no tienen tratamientos antivirales eficaces, debido a que tales tratamientos se dirigen a los síntomas de la enfermedad viral y no la causa raíz de la enfermedad. Existe una necesidad en la técnica de descubrir y desarrollar terapias antivirales.
- 10 Los MicroARN (miARN) son una clase de pequeñas moléculas de ARN, de aproximadamente 21 - 22 nts de longitud, que se han detectado en muchas especies de plantas y animales. Incluso ciertos genomas de ARN viral se han encontrado que codifican ARNm. Los esfuerzos de clonación y predicciones de ordenador han indicado que existen probablemente sobre 200 genes que codifican en seres humanos, que pueden regular aproximadamente 1000 - 2000 ARNm. Ciertos ARNm se expresan de manera ubicua, mientras que otros se expresan de una manera
- 15 altamente específica en tejidos. Por ejemplo, miR-122 se observó que se expresaba de manera específica en el hígado, donde constituye el 70 % de la población total de ARNm.

**Bibliografía Relevante**

- Tomari y Zamore, *Genes Dev.* 19, 517 (2005); Bennasser, et al., *Retrovirology* 1, 43 (2004); Pfeffer et al., *Science* 304, 734 (2004); Baskerville y Bartel, *RNA* 11, 241 (2005); John et al., *PLoS Biol.* 2, e363 (2004); Lim et al., *Nature* 433, 769 (2005); Hutvagner, *Science* 297, 2056 (2002); Yekta, et al., *Science* 304, 594 (2004); Chen, *Science* 303, 2022 (2004); Doench, et al., *Genes Dev.* 17, 438 (2003); Doench & Sharp, *Genes Dev.* 18, 504 (2004); Olsen, *Dev. Biol.* 216, 671 (1999); Saxena y Dutta, *J. Biol. Chem.* 278, 44312 (2003); Zeng, et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U S A* 100, 9779 (2003); Lagos-Quintana et al., *Curr. Biol.* 12, 735 (2002); Sempere et al., *Genome Biol.* 5, R13 (2004); Chang, et al., *RNA Biology* 1, 106 (2004); Lewis, et al., *Cell* 120, 15 (2005); Lewis et al., *Cell* 115, 787 (2003); Ikeda, et al., *J. Virol.* 76, 2997 (2002). Friebe, et al., *J. Virol.* 75, 12047 (2001); Sunkar, et al., *Plant Cell* 16, 2001 (2004).

El documento WO 02/081494 se refiere a moléculas de ácido nucleico antisentido que modulan la síntesis, expresión y / o estabilidad de VHC o HBV. McCaffrey, A. et al., *Nature*, 418 (6893), páginas 38 - 39, se refiere a la fijación como diana de una secuencia del virus de hepatitis C por interferencia de ARN en ratones.

**Sumario de la invención**

- 30 La invención proporciona agentes inhibidores de miR122 para uso en el tratamiento de un huésped que padece una afección patológica mediada por VHC, en la que dicho agente es un oligonucleótido antisentido o un agente de ARNi. Otros aspectos de la invención se definen en las reivindicaciones.

- 35 Procedimientos y composiciones para reducir cantidades de genoma viral en una célula diana se describen en el presente documento en los procedimientos presentes, la actividad de un ARNm se inhibe de una manera suficiente para reducir la cantidad de genoma viral en la célula diana, por ejemplo, mediante la inhibición de un agente inhibidor de ARNm en la célula diana. También se proporcionan composiciones farmacéuticas, kits y sistemas para uso en la práctica de los procedimientos presentes. La invención sujeto encuentra uso en una diversidad de aplicaciones, incluyendo el tratamiento de sujetos que padecen de una afección patológica mediada por virus, por ejemplo, una afección patológica mediada por VHC.

**Breve descripción de los dibujos**

- 45 Figuras 1A-1C. miR-122 se expresa en células Huh7 y tiene dos sitios de unión predichos en el genoma de VHC. (A) análisis de transferencia de Northern de la expresión de miR-122 en el ARN total extraído de hígado de ratón y humano, y células HeLa, HepG2 y no expuestas, curadas y Huh7 de replicón. (B) Secuencia de miR-122 con las secuencias de siembra rodeadas por una caja. (C) Estructura secundaria de las regiones antisentido de 3' y 5' del genotipo 1 de VHC una cepa H77c, con sitios de unión de miR-122 predichos. La parejas de siembra están encerradas en cajas.

- 50 Figuras 2A-C. El secuestro de miR-122 reduce la abundancia de ARN y proteína de VHC en células de replicón. (A) análisis de transferencia de Northern de replicón, ARN de eGFP y actina en la línea celular de replicón NNeo/C-5B. La organización del replicón está indicada. Los plásmidos sensores de eGFP y los oligonucleótidos 2'-O-metil se introdujeron en las células por transfección mediada por lipofectamina 2000, y se extrajo ARN total 48 horas después, eGFP-124 y eGFP-122 son vectores de expresión de eGFP con sitios complementarios para miR-124 y

miR-122, respectivamente, en el 3'UTR. 122-2'OMe es un oligómero de 31 mer 2'-O-metilado complementario a miR-122, Rand- 2'OMe es una versión aleatoria de de esta secuencia, y let7-2'OMe es un oligómero similar complementario a let-7a. (B) Transferencia de Western que muestra los niveles de proteína del núcleo de VHC, eGFP y actina 48 horas después de la transfección con los plásmidos sensores de eGFP indicados y oligómeros 2'-O-metilados. (C) Análisis de Northern de replicón, ARN de eGFP y actina en células Huh7 que contienen el replicón H77c de genotipo 1a de longitud de genoma transfectado con eGFP-122 y 122-2'OMe.

Figuras 3A-3C. El sitio de unión a miR-122 predicho en la región antisentido de 5' de VHC se requiere para el mantenimiento de ARN viral debido a una interacción directa con miR-122 (A) Posición de las mutaciones introducidas en el ARN de longitud completa de H77c. Se introdujo una mutación por sustitución de 4nt dentro del emparejamiento de siembra en la región antisentido de 3' (m3') y mutaciones por sustitución de 4nt, 2nt o 1 nt en el emparejamiento de siembra de la región antisentido de 5' (m5'A, B y C respectivamente). Los nucleótidos mutados están encerrados en cajas. (B) ARN se sintetizó por transcripción in vitro y se introdujo en células Huh7 por electroporación, y se determinaron los niveles de ARN de replicón mediante transferencia de Northern 5 días después. Se muestra la tinción con azul de metileno de ARN ribosómico como un control de carga. (C) Se transfectaron células Huh7 con sintéticos dobles transfectados con dobles sintéticos correspondientes a miR-122 de tipo salvaje (122wt) o miR-122 con una mutación de 1 nt en la siembra complementaria a la mutación de emparejamiento de siembra m5'C (122mC), la hebra opuesta del doble basada en la horquilla precursora de miR-122. Los dobles se introdujeron en células Huh7 un día antes de la electroporación con ARN de H77c de tipo salvaje o ARN de m5'C mutantes, y de nuevo 1 y 3 días después de la electroporación. Se recogió el ARN total 5 días después de la electroporación y se determinaron los niveles de ARN de replicón y actina por transferencia de Northern.

Figura 4 Mutación del sitio de unión a miR-o afecta a la traducción de ARNm de VHC. La mutación m5'C se introdujo en un mutante deficiente en replicación de H77c, AAG-H77, que contiene los cambios de aminoácidos GDD a AAG en las posiciones 2737 a 2739 en la polimerasa viral NS5B (23). Se recogieron los lisados 20 horas después transfección del ARN de replicón, y proteína del núcleo de VHC y expresión de actina determinada por transferencia de Western.

Figura S3A y B adición de doble de miR-122 sintético a células de replicón de NNeo/C-5B da como resultado un incremento en la abundancia de ARN de replicón. Los plásmidos sensores de eGFP indicados y dobles de miR-122 de tipo salvaje (122wt) o mutante (122mC) se introdujeron en las células por transfección usando lipofectamina 2000. Total

### **Descripción de las realizaciones específicas**

Se describen procedimientos y composiciones para reducir cantidades de genoma viral en una célula diana. En los procedimientos presentes, la actividad de un ARNm se inhibe de una manera suficiente para reducir la cantidad de genoma viral en la célula diana, por ejemplo, mediante la introducción de un agente inhibidor de ARNm en la célula diana. También se proporcionan composiciones farmacéuticas, kits y sistemas para uso en la práctica de procedimientos presentes. La invención sujeto encuentra uso en una diversidad de aplicaciones, incluyendo el tratamiento de sujetos que padecen una afección patológica mediada por virus, por ejemplo, una afección patológica mediada por VHC.

Antes que se describa la presente invención posteriormente, se ha de entender que esta invención se define en las reivindicaciones y no se limita a las realizaciones particulares descritas. También se entiende que la terminología usada en el presente documento es con el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado por las reivindicaciones anexas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior salvo que claramente el contexto disponga otra cosa, entre el límite superior e inferior del intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en el intervalo establecido, está abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden estar independientemente incluidos en los intervalos más pequeños y también están comprendidos dentro de la invención, sujeto a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la invención.

Procedimientos narrados en el presente documento se pueden llevar a cabo en cualquier orden de los casos lógicamente posibles, así como el orden indicado de los casos.

Salvo que se defina de otra manera, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido de manera común por los expertos en la técnica a la que esta invención pertenece. Aunque también se pueden usar cualesquiera procedimientos y materiales similares o

equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, los procedimientos y materiales preferidos se describen ahora.

Se debe indicar que como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "a", "uno", y "el" incluyen referentes plurales salvo que el contexto claramente disponga otra cosa. Además se indica que las reivindicaciones se pueden redactar para que excluyan cualquier elemento opcional. Como tal, este establecimiento pretende servir como una base antecedente para uso de tal terminología exclusiva como "únicamente," "solamente" y similares junto con la relación de los elementos de las reivindicaciones, o uso de una limitación "negativa".

Las publicaciones descritas en el presente documento se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento se ha de considerar como una admisión ya que la presente invención no se habilita para preceder a tal publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de la solicitud real que se pueden confirmar independientemente.

Como se ha resumido anteriormente, se describen los procedimientos y composiciones que reducen la cantidad de un genoma viral diana en una célula diana. Los procedimientos presentes se describen primero en mayor detalle, seguido de una revisión de de diversas aplicaciones representativa en las que la invención sujeto encuentra uso así como kits que encuentran uso en la práctica de la invención sujeto.

### **Procedimientos**

Como se ha indicado anteriormente, se describen en el presente documento procedimientos de reducción de la cantidad de un genoma viral diana en una a célula diana, donde la célula diana puede estar presente in vitro o in vivo. Por "reducción de la cantidad" significa que el nivel o cantidad del genoma viral Diana en la célula diana se reduce en al menos aproximadamente 2 veces, usualmente en al menos aproximadamente 5 veces, por ejemplo, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces o más, cuando se compara con un control, es decir, una célula diana idéntica no tratada de acuerdo con el procedimientos presentes.

Cuando se ponen en práctica los procedimientos presentes, una cantidad eficaz de un agente inhibidor de ARNmi (microARN) se introduce en la célula diana, donde cualquier protocolo conveniente para introducir el agente en la célula diana se puede usar. El agente inhibidor de ARNmi es un agente que inhibe la actividad de un ARNmi diana en la célula diana. El ARNmi diana es un ARNmi cuya presencia está asociada a la replicación de genoma viral y abundancia en la célula diana. Como se muestra en la técnica, los ARNmi son moléculas de ARN de cadena sencilla que varían de longitud entre 20 y aproximadamente 25 nt, tal como entre aproximadamente 21 y aproximadamente 24 nt, por ejemplo, 22 ó 23 nt. Los ARNmis diana puede o no puede ser complementario a una región de la misma longitud viral que el ARNmi en el genoma viral. Si no completamente complementario, el ARNmi y su genoma viral diana correspondiente son al menos sustancialmente complementarios, de manera que la cantidad de faltas de concordancia presentes en la longitud del ARNmi, (que varían entre aproximadamente 20 y aproximadamente 25 nt) no exceda en aproximadamente 8 nt, y en ciertas realizaciones no excederá en aproximadamente 6 ó 5 nt, por ejemplo, 4 nt.

Por agente inhibidor de ARNmi se entiende un agente que inhibe la actividad del ARNmi diana. El agente inhibidor puede inhibir la actividad del ARNmi diana por una diversidad de mecanismos diferentes. En ciertas realizaciones, el agente inhibidor es uno que se une a ARNmi diana y, haciéndolo de esta manera, inhibe su actividad. Representative ARNmi agentes inhibidores incluyen, pero no se limitan a: oligonucleótidos antisentido, tales como los oligonucleótidos antisentido específicos reseñados en la sección experimental más adelante, y similares. Otros agentes de interés incluyen, pero no se limitan a: compuestos de molécula pequeña sintética o de origen natural de interés incluyen numerosas clases químicas, aunque típicamente son moléculas orgánicas, preferiblemente pequeños compuestos orgánicos que tienen un peso molecular de más de 50 y menos de aproximadamente 2.500 daltons. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente enlace de hidrógeno, y típicamente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos a menudo comprenden estructuras de carbono cíclico o heterocíclicas y / o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos anteriores funcionales. Los agentes candidatos también se encuentran entre biomoléculas incluyendo péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o sus combinaciones. Tales moléculas se pueden identificar, entre otras formas, usando protocolos de selección apropiados.

También de interés en ciertas realizaciones son agentes de ARNi. En realizaciones representativas, el agente de ARNi dirige la molécula precursora del microARN, conocida como la molécula pre-microARN. Por agente de ARNi se entiende un agente que modula la expresión de microARN por un mecanismo de interferencia de ARN. Los agentes de ARNi usados en una realización de la invención sujeto son pequeñas moléculas de ácido ribonucleico

(también denominadas en el presente documento como ácidos ribonucleicos de interferencia), es decir, oligorribonucleótidos, que están presentes en las estructuras dobles, por ejemplo, dos oligorribonucleótidos distintos hibridados entre sí o un ribooligonucleótido individual que asume una formación de horquilla pequeña para producir una estructura doble. Por oligorribonucleótido se entiende un ácido ribonucleico que no excede de aproximadamente 100 nt de longitud, y típicamente no excede de aproximadamente 75 nt de longitud, cuando la longitud en ciertas realizaciones es menos de aproximadamente 70 nt. Cuando el agente de ARN es una estructura doble de dos ácidos ribonucleicos distintos hibridados entre sí, por ejemplo, un ARNsi (tal como d-siARN como se describe en la solicitud en tramitación con la presente solicitud nº de serie 60/377.704; cuya descripción se incorpora en el presente documento por referencia), la longitud de la estructura doble típicamente varía entre aproximadamente 15 y 30 pares de bases, usualmente entre aproximadamente 15 y 29 pares de bases, donde las longitudes entre aproximadamente 20 y 29 pares de bases, por ejemplo, 21 pares de bases, 22 pares de bases, son de particular interés en ciertas realizaciones. Cuando el agente de ARN es una estructura de un único ácido ribonucleico que está presente en una formación de horquilla, es decir, un ARNsh, la longitud de la parte hibridada de la horquilla es típicamente la misma que la proporcionada anteriormente para el tipo de ARNsi de agente o más larga que 4 - 8 nucleótidos. El peso de los agentes de ARNi de esta realización típicamente varía entre aproximadamente 5.000 daltons y aproximadamente 35.000 daltons, y en muchas realizaciones está al menos entre aproximadamente 10.000 daltons y menos de aproximadamente 27.500 daltons, a menudo menos de aproximadamente 25.000 daltons.

En ciertas realizaciones, en lugar del agente de ARNi siendo un ácido ribonucleico de interferencia, por ejemplo, un ARNsi o ARNsh como se ha descrito anteriormente, el agente de ARNi puede codificar un ácido ribonucleico de interferencia, por ejemplo, un ARNsh, como se ha descrito anteriormente. En otras palabras, el agente de ARNi puede ser un molde de transcripción del ácido ribonucleico de interferencia. En estas realizaciones, el molde de transcripción es típicamente un ADN que codifica el ácido ribonucleico de interferencia. El ADN puede estar presente en un vector, donde una diversidad de vectores diferentes se conocen en la técnica, por ejemplo, un vector plásmido, un vector viral, etc.

Como se ha indicado anteriormente, el agente inhibidor de ARNmi se puede introducir en la (s) célula (s) diana (s) usando cualquier protocolo conveniente, donde el protocolo variará dependiendo de si las células diana están in vitro o in vivo.

Cuando las células diana están in vivo, el agente de ARNmi se puede administrar al huésped usando cualquier protocolo conveniente. En realizaciones donde el agente inhibidor es un ácido nucleico, el protocolo usado es típicamente un protocolo de administración de ácido nucleico, donde un número de tales diferentes protocolos se conocen en la técnica. La siguiente descripción proporciona una revisión de protocolos representativos de administración de ácido nucleico que se pueden usar. Los ácidos nucleicos se pueden introducir en tejidos o células huésped mediante cualquier número de vías, incluyendo infección viral, microinyección, o fusión de vesículas. También se puede usar la inyección a chorro para la administración intramuscular, como se describe por Furth et al. (1992), *Anal Biochem* 205: 365 - 368. Los ácidos nucleicos se pueden revestir sobre partículas de oro, y administrarse por vía intradérmica por un dispositivo de bombardeo de partículas, o "pistola de genes" como se describe en la bibliografía (véase, por ejemplo, Tang et al. (1992), *Nature* 356:152 - 154), cuando los microproyectiles de oro están recubiertos con el ADN, entonces se bombardean en las células de la piel. Los vectores de expresión se pueden usar para introducir los ácidos nucleicos en una célula. Tales vectores en general tienen sitios de restricción convenientes localizados cerca de la secuencia promotora para proporcionar las secuencias de ácido nucleico. Los módulos de transcripción se pueden preparar para que comprendan una región de inicio de la transcripción, el gen diana o su fragmento, y una región de terminación de la transcripción. Los módulos de transcripción se pueden introducir en una diversidad de vectores, por ejemplo plásmido; retrovirus, por ejemplo lentivirus; adenovirus; y similares, donde los vectores son capaces de mantenerse de manera transitoria o estable en las células, usualmente durante un período de al menos aproximadamente un día, más usualmente durante un período de al menos aproximadamente varios días a varias semanas.

Por ejemplo, el agente inhibidor se puede alimentar directamente a, inyectarse en, el organismo huésped que contiene el gen diana. El agente se puede introducir directamente en la célula (es decir, por vía intracelular); o introducirse por vía extracelular en una cavidad, espacio intersticial, en la circulación de un organismo, introducido por vía oral, etc. Los procedimientos para la introducción oral incluyen mezcla directa de ARN con alimento del organismo. Los procedimientos físicos de introducción de ácidos nucleicos incluyen inyección directamente en la célula o inyección extracelular en el organismo de una solución de ARN. El agente se puede introducir en una cantidad que permita la administración de al menos una copia por célula. Dosis más altas (por ejemplo, al menos 5, 10, 100, 500 ó 1000 copias por célula) del agente puede producir una inhibición más eficaz; dosis inferiores también pueden ser útiles para aplicaciones específicas.

En ciertas realizaciones, se usa un protocolo de administración hidrodinámica de ácido nucleico. Cuando el agente es un ácido ribonucleico, el protocolo de administración hidrodinámica de ácido ribonucleico descrito en detalle más

adelante es de interés particular. Cuando el agente es un ácido desoxirribonucleico, los protocolos de administración hidrodinámica de ácido desoxirribonucleico descritos en Chang et al., J. Virol. (2001) 75:3469-3473; Liu et al., Gene Ther. (1999) 6:1258-1266; Wolff et al., Science (1990) 247: 1465 - 1468; Zhang et al., Hum. Gene Ther. (1999) 10:1735-1737; y Zhang et al., Gene Ther. (1999) 7: 1344-1349; son de interés.

5 Los protocolos adicionales de administración de ácido nucleico de interés incluyen, pero no se limitan a los descritos en las patentes de Estados Unidos de interés incluyen 5.985.847 y 5.922.687; documento WO/11092;. Acsadi et al., New Biol. (1991) 3:71-81; Hickman et al., Hum. Gen. Ther. (1994) 5: 1477 - 1483; y Wolff et al., Science (1990) 247: 1465 - 1468; etc.

10 Dependiendo de la naturaleza del agente inhibidor, el (los) agente (s) activo (s) se puede administrar al huésped usando cualquier medio convencional capaz de dar como resultado la reducción deseada de la cantidad de genoma viral deseada o carga en la célula diana. De este modo, el agente se puede incorporar en una diversidad de formulaciones para administración terapéutica. Más particularmente, los agentes de la presente invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas mediante combinación con vehículos o diluyentes, farmacéuticamente aceptables, y se pueden formular en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o  
15 gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, supositorios, inyecciones, inhaladores y aerosoles. Tal como, administración de los agentes se puede lograr de diversas formas, incluyendo administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intratecal, etc.,.

20 En formas de dosificación farmacéutica, los agentes se pueden administrar solos o en asociación apropiada, así como en combinación, con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los siguientes procedimientos y excipientes son meramente ejemplares y no son de ninguna manera limitantes.

25 Para las preparaciones orales, los agentes se pueden usar solos o en combinación con aditivos apropiados para preparar comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con ligandos, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábiga, almidón de maíz o gelatinas; con disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa de sodio; con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y si se desea, con diluyentes, agentes de tamponación, agentes humectantes, conservantes y agentes aromatizantes.

30 Los agentes se pueden formular en preparaciones para inyección mediante disolución, suspensión o emulsión de ellos en un disolvente acuoso o no acuoso, tales como aceites vegetales u otros similares, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilen glicol; y si se desea con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizantes y conservantes.

Los agentes se pueden usar en formulación de aerosol a administrar mediante inhalación. Los compuestos de la presente invención se pueden formular en propulsores presurizados adecuados tal como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

35 Además, los agentes se pueden preparar en supositorios mediante mezcla con una diversidad de bases tales como bases de emulsión o bases hidrosolubles. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar por vía rectal mediante un supositorio. Los supositorios pueden incluir vehículos tales como manteca de cacao, carboceras y polietilén glicoles, que funden a temperatura corporal, sin embargo solidificándose a temperatura ambiente.

40 Las formas de dosificación unitaria para administración oral o rectal tales como jarabes, elixires, y suspensiones se pueden proporcionar en las que cada unidad de dosificación, por ejemplo, cucharadita, cucharada grande, comprimido o supositorio, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más inhibidores. De manera similar, formas de dosificación unitarias para inyección o administración intravenosa pueden comprender el (los) inhibidor (es) en una composición tal como una solución en agua estéril, solución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 El término "forma de dosificación unitaria," como se usa en el presente documento, se refiere a formas físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos animales y humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuestos de la presente invención calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado junto con un diluyente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones de las formas de dosificación unitaria novedosas de la presente invención dependen del  
50 compuesto particular usado y el efecto a lograr, y la farmacodinámica asociada a cada compuesto en el huésped.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes, están fácilmente disponibles para el público. Además, sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste de pH y de tamponación, agentes de ajuste de tonicidad, estabilizantes, agentes humectantes y similares, están fácilmente disponibles para el público.

Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función del compuesto específico, la naturaleza del vehículo de administración, y similares. Las dosificaciones preferidas para un compuesto dado se determinan fácilmente por los expertos en la técnica por una diversidad de medios.

5 La introducción de una cantidad eficaz de un agente de ARNi en una célula de mamífero como se ha descrito anteriormente da como resultado una modulación de la expresión de gen (es) diana, por ejemplo, una reducción de la expresión de gen (es) diana, como se ha descrito anteriormente.

10 Los procedimientos anteriormente descritos funcionan en cualquier célula de mamífero, donde las células de mamífero de interés representativas incluyen, pero no se limitan a células de: animales ungulados o con pezuñas, por ejemplo, ganado vacuno, cabras, cerdos, ovejas, etc.; roedores, por ejemplo, hámsteres, ratones, ratas, etc.; lagomorfos, por ejemplo, conejos; primates, por ejemplo, monos, mandriles, seres humanos, etc.; y similares.

15 Las composiciones se pueden combinar ventajosamente y / o usarse en combinación y / o alteración con otros agentes antivirales que son o bien agentes terapéuticos o profilácticos, y diferentes de los compuestos sujeto. Las composiciones también se pueden combinar ventajosamente y / o usarse en combinación con agentes que tratan afecciones asociadas a menudo con infecciones virales que son sensibles a los compuestos presentes, tales como agentes anti-VHC o agentes inmunosupresores. En ciertas realizaciones, la administración junto con las composiciones sujeto potencia la eficacia de tales agentes. De acuerdo con lo anterior, los compuestos, cuando se combinan o se administran en combinación con otros agentes antivirales, se pueden realizar en ciertas realizaciones en dosificaciones que son menores que las cantidades esperadas cuando se usan solos, o menores que las cantidades calculadas para terapia de combinación.

20 Las opciones de tratamiento ejemplares para hepatitis C (VHC) incluyen interferones, por ejemplo, interferón alfa-2b, interferón alfa-2a, e interferón aifacon-1. Se puede lograr dosificación de interferón menos frecuente usando interferón pegilado (interferón unido a un resto de polietilén glicol que mejora significativamente el perfil farmacocinético). La terapia de combinación con interferón alfa-2b (pegilado y no pegilado) y ribavarina también se ha mostrado que es eficaz para algunas poblaciones de pacientes. Otros agentes que actualmente se están desarrollando incluyen inhibidores de replicación de ARN (por ejemplo, las series VP50406 de ViroPharma), agentes antisentido, vacunas terapéuticas, inhibidores de proteasa, inhibidores de helicasa y terapia de anticuerpos (monoclonal y policlonal).

30 Los compuestos y composiciones de la presente invención también se pueden usar con agentes que potencien el sistema inmune del cuerpo, incluyendo ciclofosfamida de baja dosis, timoestimulina, vitaminas y suplementos nutricionales (por ejemplo, antioxidantes, incluyendo vitaminas A, C, E, beta-caroteno, zinc, selenio, glutatión, coenzima Q-10 y equinacea), y vacunas, por ejemplo, el complejo unmuñoestimulante (ISCOM), que comprende una formulación de vacuna que combina una presentación multimérica de antígeno y un adyuvante.

Los procedimientos anteriormente descritos encuentran uso en una diversidad de aplicaciones diferentes, tipos representativos de los cuales se describen en mayor detalle a continuación.

### 35 **Utilidad**

Los procedimientos presentes encuentran uso en el tratamiento de una diversidad de afecciones diferentes en las que se desea la reducción de una cantidad de genoma viral diana en una célula diana o huésped que comprende la misma. En muchas realizaciones, los procedimientos presentes encuentran uso en el tratamiento de un huésped que padece una afección patológica mediada por virus. Por tratamiento se entiende que al menos una mejora de los síntomas asociados a la afección que padece el huésped se logra cuando la mejora se usa en un amplio sentido para referirse al menos a una reducción en la magnitud de un parámetro, por ejemplo síntoma, asociado a la afección que se está tratando. Como tal, tratamiento también incluye situaciones en las que la afección patológica, o al menos síntomas asociados a ella, están completamente inhibidos, por ejemplo evitando que sucedan, o se detengan, por ejemplo terminen, de manera que el huésped no padezca más la afección, o al menos los síntomas que caracterizan la afección.

40 Se pueden tratar una diversidad de huéspedes de acuerdo con los procedimientos presentes. En general tales huéspedes son "mamíferos" o "mamífero" cuando se usan estos términos ampliamente para describir los organismos que están dentro de la clase de mamífero, incluyendo los órdenes carnívoros (por ejemplo, perros y gatos), roedores (por ejemplo, ratones, cobayas, y ratas), y primates (por ejemplo, seres humanos, chimpancés, y monos). En muchas realizaciones, los huéspedes serán seres humanos.

Como se ha indicado anteriormente, los procedimientos se pueden usar para cualquier genoma viral cuya abundancia en una célula diana se correlaciona con un ARNm en esa célula. En ciertas realizaciones, el genoma viral es un genoma de virus que tiene un genoma de ARN, donde el virus puede ser de la familia Flaviviridae, por ejemplo, un hepacivirus, tal como un virus de hepatitis C, por ejemplo, virus de Hepatitis C (aislamiento 1), virus de

5 Hepatitis C (aislamiento BK), virus de Hepatitis C (aislamiento EC1), virus de Hepatitis C (aislamiento EC10), virus de Hepatitis C (aislamiento HC-J2), virus de Hepatitis C (aislamiento HC-J5), virus de Hepatitis C (aislamiento HC-J6), virus de Hepatitis C (aislamiento HC-J7), virus de Hepatitis C (aislamiento HC- J8), virus de Hepatitis C (aislamiento HC-JT), virus de Hepatitis C (aislamiento HCT18), virus de Hepatitis C (aislamiento HCT27), virus de Hepatitis C (aislamiento VHC-476), virus de Hepatitis C (aislamiento VHC-KF), virus de Hepatitis C (aislamiento Hunan), virus de Hepatitis C (aislamiento japonés), virus de Hepatitis C (aislamiento de Taiwán), virus de Hepatitis C (aislamiento TH), virus de Hepatitis C aislamiento H, virus de Hepatitis C tipo 1, virus de Hepatitis C tipo 10, virus de Hepatitis C tipo 2, virus de Hepatitis C tipo 3, virus de Hepatitis C tipo 4, virus de Hepatitis C tipo 5, virus de Hepatitis C tipo 6, virus de Hepatitis C tipo 7, virus de Hepatitis C tipo 8, etc.

10 En ciertas realizaciones representativas, la invención sujeto se usa en procedimientos de tratamiento de un huésped que padece una afección patológica mediada por VHC, por ejemplo, hepatitis no A, no B (NANBH). En estas realizaciones representativas, una cantidad eficaz de un agente inhibidor de miR122, tal como un oligo antisentido como se ejemplifica más adelante, se administra al huésped de manera que se reduce el genoma de VHC presente en las células huésped, particularmente células hepáticas, como se ha descrito anteriormente.

### 15 **Composiciones farmacéuticas**

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos inhibidores de ARNmi usados en los procedimientos presentes. De acuerdo con lo anterior, los compuestos, por ejemplo, en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, se pueden formular para administración oral o parenteral para uso en los procedimientos presentes, como se ha descrito anteriormente.

20 A modo de ilustración, los compuestos se pueden mezclar con portadores y excipientes farmacéuticos convencionales (es decir, vehículos) y usarse en la forma de soluciones acuosas, comprimidos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Tales composiciones farmacéuticas contienen, en ciertas realizaciones, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 90 % en peso del compuesto activo, y más en general entre aproximadamente 1 y aproximadamente 30 % en peso del compuesto activo. Las composiciones farmacéuticas  
25 pueden contener portadores y excipientes comunes, tales como almidón de maíz o gelatina, lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, fosfato dicálcico, cloruro sódico, y ácido algínico. Los disgregantes usados comúnmente en las formulaciones de esta invención incluyen croscaramelosa, celulosa microcristalina, almidón de maíz, almidón glicolato de sodio y ácido algínico.

30 Una composición líquida en general constará de una suspensión o solución del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable en un portador (es) líquido (s) adecuado (s), por ejemplo, etanol, glicerina, sorbitol, disolvente no acuoso, tales como polietilen glicol, aceites o agua, con un agente de suspensión, conservante, tensioactivo, agente humectante, agente aromatizante o colorante. De manera alternativa, a se puede preparar una formulación líquida a partir de un polvo que se puede reconstituir.

35 Por ejemplo, un polvo que contiene compuesto activo, agente de suspensión, sacarosa y un edulcorante se puede reconstituir con agua para formar una suspensión; y un jarabe se puede preparar a partir de un polvo que contiene ingrediente activo, sacarosa y un edulcorante.

40 Una composición en la forma de un comprimido se puede preparar usando cualesquiera portadores farmacéuticos adecuados usados de manera rutinaria para preparar composiciones sólidas. Ejemplos de tales portadores incluyen estearato de magnesio, almidón, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina y ligandos, por ejemplo, polivinilpirrolidona. El comprimido también se puede proporcionar con un revestimiento de película de color, o color incluido como una parte de portador (es). Además, el compuesto activo se puede formular en una forma de dosificación de liberación controlada como un comprimido que comprende una matriz hidrófila o hidrófoba.

45 Una composición en la forma de una cápsula se puede preparar usando procedimientos de encapsulación de rutina, por ejemplo, por incorporación de compuesto activo y excipientes en una cápsula dura de gelatina. De manera alternativa, una matriz semisólida de compuesto activo y polietilen glicol de alto peso molecular se puede preparar y llenar en una cápsula dura de gelatina; o una solución de compuesto activo en polietilen glicol o una suspensión en aceite comestible, por ejemplo, parafina líquida o aceite de cono fraccionado se puede preparar y llenar en una cápsula blanda de gelatina.

50 Los ligandos de comprimidos que se pueden incluir son goma arábiga, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, polivinilpirrolidona (Rovidone), hidroxipropil metilcelulosa, sacarosa, almidón y etilcelulosa. Los lubricantes que se pueden usar incluyen estearato de magnesio u otros estearatos metálicos, ácido esteárico, fluido de silicona, talco, ceras, aceites y sílice coloidal.

Los agentes aromatizantes tales como pipermín, aceite de gaulteria, aroma de cereza o similares también se pueden usar. De manera adicional, puede ser deseable añadir agente colorante para preparar la forma de



dosificación más atractiva en apariencia o para ayudar a identificar el producto

Los compuestos de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables que son activos cuando se proporcionan por vía parenteral se pueden formular para administración intramuscular, intratecal, o intravenosa.

5 Una composición típica para la administración intramuscular o intratecal será de una suspensión o solución de ingrediente activo en un aceite, por ejemplo, aceite de cacahuete o aceite de sésamo. Una composición típica para la administración intravenosa o intratecal será una solución acuosa isotónica estéril que contiene, por ejemplo, ingrediente activo y dextrosa o cloruro sódico, o una mezcla de dextrosa y cloruro sódico. Otros ejemplos son inyección de Ringer lactada, más inyección de dextrosa, Normosol-M y dextrosa, Isolito E, inyección de Ringer acilada, y similares. Opcionalmente, un codisolvente, por ejemplo, polietilén glicol, un agente quelante, por ejemplo, ácido etilendiamina tetraacético, y un antioxidante, por ejemplo, metabisulfito de sodio se puede incluir en la formulación. De manera alternativa, la solución se puede secar por congelación y después reconstituirse con un disolvente adecuado a justo antes de la administración.

15 Los compuestos de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables que son activos en la administración rectal se pueden formular en forma de supositorios. Una formulación de supositorio típica en general constará de ingrediente activo con un agente de unión y / o lubricación tal como una gelatina o manteca de cacao u otra cera o grasa vegetal o sintética de bajo punto de fusión.

20 Los compuestos de esta invención y sus sales farmacéuticamente aceptables que son activas en la administración tópica se pueden formular como composiciones transdérmicas o dispositivos de administración transdérmica ("parches"). Tales composiciones incluyen, por ejemplo, un reservorio de compuesto activo de reserva, una membrana control, adhesivo lineal y de contacto. Tales parches transdérmicos se pueden administrar para proporcionar infusión continua o discontinua de los compuestos de la presente invención en cantidades controladas. La construcción y uso de parches transdérmicos para la administración de agentes transdérmicos se conoce bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.023.252, emitida el 11 de junio de 1991, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad. Tales parches se pueden construir para la administración continua, por pulsos, o bajo demanda de agentes farmacéuticos.

25 De manera opcional, la composición farmacéutica puede contener otros componentes farmacéuticamente aceptables tales como tampones, tensioactivos, antioxidantes, agentes modificadores de viscosidad, conservantes y similares. Cada uno de estos componentes se conoce bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.985.310, cuya descripción se incorpora en el presente documento por referencia.

30 Otros componentes para uso en las formulaciones de la presente invención se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17ª ed. (1985). En una realización la solución acuosa de ciclodextrina además comprende dextrosa, por ejemplo, aproximadamente el 5 % de dextrosa.

### **Kits**

35 También se proporcionan reactivos y sus kits para poner en práctica los procedimientos descritos anteriormente. Los presentes reactivos y sus kits pueden variar en gran medida. Por lo general, los kits al menos incluyen un agente inhibidor de ARNm como se ha descrito anteriormente. Los kits también pueden incluir un vehículo de administración farmacéuticamente aceptable, que puede estar combinado con o separado del agente inhibidor de ARNm en el kit, por ejemplo, cuando los dos componentes pueden estar en los mismos recipientes o separados en el kit.

40 Además de los componentes anteriores, los presentes kits además incluirán instrucciones para poner en práctica los procedimientos presentes. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits presentes en una diversidad de formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes en una información impresa sobre un medio o sustrato adecuado, por ejemplo, una pieza o piezas de papel sobre la que está impresa la información, en el envase del kit, in en una inserción en el envase, etc. 45 Todavía otro medio sería un medio que se pueda leer por ordenador, por ejemplo, disquete CD, etc., sobre el que la información se ha grabado. Todavía otro medio que puede estar presente es una dirección de página web que se puede usar mediante Internet para acceder a la información de un sitio retirado. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

### **Sistemas**

50 También se proporcionan sistemas que encuentran uso en la práctica de los procedimientos presentes, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, sistemas para poner en práctica los procedimientos presentes pueden incluir una o más formulaciones farmacéuticas, que incluyen el agente inhibidor del ARNm. El término "sistema" como se usa en el presente documento se refiere a una colección de componentes, por ejemplo, agente activo, vehículo de administración, etc, presente en una única composición o como composiciones distintas, que se ponen juntos para

el propósito de poner en práctica los procedimientos presentes. Por ejemplo, agente activo obtenido separadamente y vehículo de administración puestos juntos y administrados conjuntamente a un sujeto de acuerdo con la presente invención, son un sistema de acuerdo con la presente invención.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no en forma de limitación.

5 **Experimental**

**I. Resultados y Discusión**

10 Para comenzar a entender los papeles de miR-122 en la función de regulación de ARNm los inventores controlaron la expresión de miR-122 en muestras de ARN extraídas de tejidos hepáticos y líneas celulares hepáticas. Figura 1A muestra que el miR-122 se puede detectar en ratón e hígado humano, y en células Huh7 hepáticas humanas cultivadas, pero no en células HeLa derivadas de carcinoma cervical humano, o incluso en células HepG2 derivadas de hígado humano (Fig. 1A).

15 Se sabe que el virus de Hepatitis C (VHC) ARN que lleva mutaciones adaptativas se pueden replicar en Huh7 pero no en células HepG2, y los inventores deseaban explorar si la presencia de miR-122 en células Huh7 que replican ARN de VHC era más que pura coincidencia. Con este fin, los inventores inspeccionaron el genoma de ARN viral de hebra positiva de 9.600 nucleótidos para los sitios de unión potencial de miR-122 que cumpliría las reglas de una interacción exitosa de ARNmi-ARNm diana. Los inventores investigaron secuencias en el ARNm viral que puede encajar en el apareamiento de bases de Watson y Crick perfecta con los nucleótidos 2 a 8, la "secuencia de siembra" de miR-122. Usando esta regla, los inventores observaron dos sitios de unión predichos para miR-122 (Fig. 1 B) en la regiones antisentido virales. Una se localizó en la región variable de la región antisentido 3' viral del genotipo de tipo 1 a (Fig. 1 C). Aunque esta secuencia estaba en la "región variable" nominalmente, inspección de los seis genotipos de VHC reveló que la propia secuencia coincidente de siembra se conservó en gran medida (Tabla 1). El segundo sitio de unión de miR-122 se predijo que residía en la región antisentido de 5', solamente 21 nucleótidos del extremo 5' del genoma viral (Fig. 1 C). Aquí, la secuencia coincidente de siembra supuesta estaba flanqueada por un resto de adenosina. Esto conduce a un apareamiento de bases adicional con el nucleótido 1 en el ARNmi, que es en la mayoría de los casos resto de uridina, que da como resultado un aumento de especificidad de interacciones microARN-diana. La secuencia coincidente de siembra supuesta para miR-122, que incluye el resto de adenosina flanqueante, está altamente conservada entre todos los genotipos virales con la excepción de la secuencia coincidente de siembra en el genotipo 2 que carece de la adenosina de anclaje (Tabla 1).

**Tabla 1**

Genotipo	5'UTR	3'UTR
SEQ ID NO:		
1a(01&02)	UGAUGGGGGCG <b>ACACUCCAC</b>	UGAAGGUUGGGGUA <b>ACACUCCGGCC</b>
1b (03 & 04)	AUUGGGGGCG <b>ACACUCCACC</b>	UGAACGGGGAGCUAA <b>ACACUCCAGG</b>
2 (05 & 06)	AAUAGGGGCG <b>ACACUCCGCC</b>	UAGAGCGGCACACACUAGGU <b>ACACUCCA</b>
3 (07 & 08)	UACGAGGCG <b>ACUCCACCA</b>	UGAGCUGGUAAGAU <b>ACACUCCA</b> UU
4 (09&10)	UAUGAGAGCA <b>ACACUCCACC</b>	UAGGCAGCUUA <b>ACACUCCGACCUUA</b>
5 (11&12)	UAUUGGGGCG <b>ACACUCCACC</b>	UAGGCUGGGAGCUAA <b>ACACUCCA</b> UA
6 (13 & 14)	AAUGGGGCG <b>ACACUCCACCA</b>	UAGACAGGGAGCAUAAA <b>ACACUCCA</b>

30 Los sitios de unión de miR-122 predichos en VHC están conservados en todos los genotipos. La secuencia de 5'UTR de los nucleótidos 10 - 30 en el genoma, y del 3'UTR del codón de parada hasta el extremo del sitio de unión predicho, se muestra para cada genotipo. Las coincidencias de siembra en indican en letra negra.

35 Para determinar si miR-122 jugaba un papel funcional en la regulación de la expresión del gen VHC los inventores ensayaron si la acumulación de los ARN de replicón estarían afectadas cuando miR-122 estaba inactivado en células NNeo/C-5B Huh7 (Ikeda, M. Yi, K. Li, S. M. Lemon, J. Virol. 76, 2997 (2002)). Estas células expresan de manera constitutiva replicones virales dicistrónicos, en los que el sitio de entrada de ribosoma interno de VHC (IRES) dirige la síntesis del producto génico de resistencia a neomicina y el IRES viral de encefalomiocarditis dirige la síntesis de las proteínas estructurales y no estructurales de la cepa VHC-N 1 b (Fig. 2A, parte superior del

diagrama). Para inactivar miR-122 en esta línea celular, células NNeo/C-5B se transfectaron con un oligonucleótido de ARN 2'-O-metilado (122-2'OMe), de 31 nucleótidos de longitud, que es exactamente complementario a miR-122; los nucleótidos de ARN complementarios 2'-O-metilados se ha mostrado que secuestran ARNm (Hutvagner, et al., PLoS Biol. 2, E98 (2004); Meister, et al., ARN 10, 544 (2004)). Como un control para la inactivación funcional de miR-122 los inventores controlaron la expresión de los ARNm sensores de eGFP (eGFP-122) que contenía las secuencias complementarias a miR-122 en sus regiones antisentido de 3'. Debido a su completa complementariedad, miR-122 debe funcionar como un ARNsi sobre estas moléculas diana y conducen a su degradación nucleotídica. De hecho, little full-length ARN de eGFP-122 de longitud completa pequeño era visible en células transfectadas con plásmidos que codifican eGFP-122 (Fig. 2A, calle 3), aunque un ARN similar que contenía sitios complementarios al miR-124 específicos de cerebro se expresó a altos niveles (Fig. 2A, calle 2). Tras la infección con 122-2'OMe, la cantidad de ARN de eGFP-122 aumentó de manera notable (Fig. 2A, calle 4), mientras que una versión aleatoria de este oligómero (Rand-2'OMe, calle 5) o un oligómero complementario al ARNm let-7a (let7-2'OMe) no tenía efecto (Fig. 2A, calle 6). Un oligómero de 23 meros complementario a miR-122 tenía el mismo efecto que el de 31 meros.

Sorprendentemente, el nivel de ARN de replicación viral de VHC se redujo específicamente y de manera notable cuando miR-122 estaba inactivado (Fig. 2A, calles 4 y 7). La reducción de la abundancia de ARNm viral dio como resultado una reducción en la expresión de proteínas de VHC en células transfectadas con el oligómero 122-2'OMe, mientras el nivel de proteína sensora de eGFP aumentó en esta condición experimental (Fig. 2B, calle 3). Era posible que los oligómeros 122-2'OMe afectaran a los niveles de ARN y proteína de replicación ARN mediante la integración con la hebra negativa de VHC, que tiene complementariedad considerable con la secuencia de oligómeros en la región que rodea los sitios de unión predichos de miR-122. Sin embargo, un oligómero con complementariedad exacta a la hebra negativa en la región antisentido en 3' que abarca en sitio de unión predicho de miR-122 no tenía efecto sobre el nivel de replicación, que sugiere que la hebra negativa no es accesible al oligómero. Además, el oligómero 122-2'OMe no afectaba a la síntesis de proteína total en células transfectadas, que excluyen la posibilidad de que el 1 oligómero 22-2'OMe indujera efectos antivirales. En conjunto, estos hallazgos indican que miR-122 es esencial para mantener la abundancia intracelular de los ARN de replicación de VHC.

Para determinar si miR-122 afectaría a la acumulación de ARN en las células recientemente transfectadas con los ARN de VHC de replicación, las transcripciones de ARN se sintetizaron a partir de un ADNc que codifica un genoma de la cepa H77c de la cepa de genotipo 1a de longitud completa con cinco mutaciones adaptativas (Fig. 2C, parte superior del diagrama) que permite altos niveles de replicación de ARN en células Huh7 (Yi y Lemon, J. Virol. 78, 7904 (2004)). La introducción de estas moléculas de ARN en células Huh7 condujo a la acumulación de ARN viral en la presencia de miR-122 endógeno (Fig. 2C, calles 1 y 2); por el contrario, ARN viral no se acumulaba cuando miR-122 estaba secuestrado por oligómeros 122-2'OMe (Fig. 2C, calle 3). De este modo, miR-122 se requiere para mantener ARN de VHC abundante de ambos genotipos 1a y 1b, en las líneas celulares que se expresan de manera estable y tras la transfección directa.

Para determinar si los supuestos sitios de unión de miR-122 se necesitarían para los efectos de miR-122 en la acumulación de ARN, se introdujeron mutaciones en el ADNc de H77c de longitud completa. Transfección de los ARN de H77c que contienen una mutación de sustitución de cuatro nucleótidos en la coincidencia de siembra predicha en la región antisentido 3' (Fig. 3A), que debería abolir la unión de miR-122, no disminuyó la acumulación de ARN (Fig. 3B, calle 2). Por el contrario, una mutación de sustitución de cuatro nucleótidos en la coincidencia de siembra predicha en la región antisentido en 5' (Fig. 3A) no induce la acumulación de ARN (Fig. 3B, calle 3). De manera notable, los genomas que contenían una mutación de sustitución de dos nucleótidos (Fig. 3B, calle 4) o incluso un único nucleótido (Fig. 3B, calle 5) en la posición 27 en el genoma viral (m5'C) tampoco se acumulaba de cinco días después de transfección. Estos hallazgos indican que o bien el fallo para reclutar miR-122 dio como resultado una pérdida de ARN viral, o que las mutaciones tenían algún efecto sobre la replicación o estabilidad de ARN.

Si las mutaciones en la secuencia de siembra de miR-122 reducían la acumulación de ARN debido a una escasa unión de miR-122, la expresión ectópica de los ARN de miR-122 que contenían una mutación en el tercer nucleótido del extremo 5' (mC) debe restablecer la formación de los complejos de ARN miR-122(mC)-m5'C (Lewis, et al., Cell 120, 15 (2005)). La expresión ectópica de los ARN de miR-122 de tipo salvaje no rescataba los ARN virales que contenían m5'C (Fig. 3C, calle 3), pero potenciaba la abundancia de los ARN virales de tipo salvaje (Fig. 3C, calle 1) y los ARN de replicación (Fig. S3A y B), que demuestra que los ARN de miR-122 introducidos se procesaban a las moléculas de ARN de miR-122 de una sola hebra funcionales y que el conjunto endógeno de miR-122 que media la acumulación de ARN viral es limitante. Por el contrario, expresión de los dobles m5'C miR-122 permitieron la acumulación de los ARN virales que contienen m5'C (Fig. 3C, calle 4), que argumenta de manera fuerte una interacción genética entre miR-122 y las secuencias terminales de 5' del genoma de VHC. Además, el rescate de los ARN virales que contienen m5'C por mC-miR-122 mutados se debe a interacción ARN de VHC-miR-122, mejor que un efecto indirecto mediante otra diana de miR-122, probablemente celular.

Los inventores a continuación examinaron si miR-122 modula la traducción de ARN DE VHC, que se conoce que se produce mediante un mecanismo de entrada de ribosomas interno no usual (Ji, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 101, 16990 (2004); Otto, Cell 119, 369 (2004); Pestova, et al., Genes Dev. 12, 67 (1998)). Específicamente, los inventores controlaron la producción de proteína del núcleo de VHC de los ARN virales de replicación y de no replicación en la presencia o ausencia de un sitio de unión de miR-122 funcional. Figura 4 muestra que cantidades similares proteína del núcleo acumulada en las células transfectadas con los ARN de tipo salvaje o mutante de m5'C (calle 1) o mutante (calle 2) a las veinte horas después de la transfección, en un momento en el que debe tener lugar poca replicación de ARN. Para ensayar directamente si el núcleo se sintetizó a partir de los ARN de entrada, se examinó la traducción de los ARN virales defectuosos en la replicación. Los resultados mostraron que los ARN de entrada de tipo salvaje (Fig. 4, calle 3) y mutantes en m5'C (calle 4) se tradujeron con eficacias similares, indicando que miR-122 regula la abundancia de ARN de VHC en una etapa posterior a la traducción, lo más probable en el sitio de replicación de ARN.

Los hallazgos de los inventores de que el genoma de VHC recluta miR-122 hasta su extremo 5' es novedoso. Los hallazgos de los inventores demuestran que miR122 es una diana para controlar los niveles de VHC, y por lo tanto una diana para tratar la afección patológica mediada por VHCs.

## **II. Materiales y Procedimientos**

### **A. Oligonucleótidos y construcciones de ADN**

Los oligonucleótidos de ARN y oligonucleótidos 2'-O-metilados se sintetizaron por Dharmacon Inc. (Lafayette, CO). Las secuencias eran: 122-2'OMe, 5'AGACACAAACACCAUUGUCACACUCCACAGC (SEQ ID NO:15); Rand-2'OMe, 5'CAGGUUAAAACCAUACGCACUACGAAACCCC (SEQ ID NO:16); let7-2'OMe, 5'CUAAAACUAUACAACCUACUACCUCAUCCCA (SEQ ID NO:17); 122-2'OMe23, 5'ACAAACACCAUUGUCACACUCCA (SEQ ID NO:18); VHCbs-2'OMe, 5'UGAACGGGGAGCUAAACACUCCA ((SEQ ID NO:19); miR-122wt, 5'UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGU ((SEQ ID NO:20); miR-122mC, 5'UGCAGUGUGACAAUGGUGUUUGU (SEQ ID NO:21); miR-122\*, 5'AAACGCAUUAUCACACUAAAUA ((SEQ ID NO:22). Se formaron los dobles entre las formas wt o mC de miR-122 y miR-122\*. El plásmido eGFP-122 sensor de miR-122 se construyó por inserción mediada por PCR de la secuencia 5'ACAAACACCAUUGUCACACUCCA (SEQ ID NO:23), que tenía una exacta complementariedad con miR-122, en el sitio de restricción Not I en la región antisentido en 3' del plásmido pd2eGFP-N1 (Clontech). Para construir el vector control eGFP-124, se insertó la secuencia 5'TTAAGGCACGCGGTGAATGCCA (SEQ ID NO:24), que es complementaria a miR 124 específico de cerebro. Las mutaciones de sustitución se introdujeron en los regiones 3' y 5' antisentido del vector de replicón de H77c (Yi y Lemon, J Virol 78, 7904 (agosto de 2004)) mediante v de superposición usando cebadores mutagénicos, y posterior ligación de productos de PCR en el vector precursor.

### **B. Cultivo y transfección celular**

Las líneas celulares Huh7, HeLa y HepG2 se cultivaron en DMEM suplementado con 10 % de FBS y 1 % de aminoácidos no esenciales (Gibco). La línea celular Huh7 que contenía el replicón dicistrónico NNeo/C-5B se ha descrito previamente (Ikeda, et al., J Virol 76, 2997 (Mar, 2002)) y se mantuvo en la presencia de 1 mg/ml de G418. El ARN genómicos de H77c de transcripción in vitro se introdujo en células Huh7 mediante electroporación como se describe en Yi y Lemon, supra, y se preparó y procesó el ARN 5 días más tarde. Para observar la síntesis de proteínas a partir de ARN de H77c deficiente en replicación, Dmrie-C (Invitrogen) se usó para administrar ARN en células Huh7, y se prepararon y se procesaron los lisados de proteínas 20 horas más tarde. Este procedimiento se usó debido a que células electroporadas no eran totalmente adherentes en tales momentos tempranos. Las construcciones y oligonucleótidos de ADN se introdujeron en las células usando lipofectamina 2000 (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos 2'-O-metilados y los dobles de ARN de miR-122 ARN se administraron a una concentración de 50nM en las células en las placas de 6 pocillos. Las células transfectadas se cultivaron durante 48 horas antes de la recogida.

### **C. Aislamiento de ARN y transferencia de Northern**

ARN total se extrajo a partir de células usando reactivo Trizol (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para detectar la expresión de ARNm, 30 µg de ARN total se separó sobre geles de poliacrilamida al 15 % que contenían 7M urea en 0,5 x TBE, se transfirió a membrana Hybond N+ (Amersham), y se hibridaron a un oligonucleótido marcado con <sup>32</sup>P en 5' complementario a miR-122 con la secuencia 5'ACAAACACCAUUGUCACACUCCA (SEQ ID NO:25). Para analizar los niveles de ARNm, 2,5 µg de ARN de las células de replicón NNeo/C-5B, o 15 µg de ARN de las células transfectadas con ARN de H77c, se separó en geles de agarosa al 1 % que contienen tampón 1 x MOPS y 2,2 M de formaldehído, y se transfirieron a membrana Zeta-probe (Bio-Rad). Las membranas se hibridaron en ExpressHyb (Clontech) a sondas de ADN marcadas con <sup>32</sup>P cebadas de manera aleatoria correspondiente a los nucleótidos 84 - 374 de VHC, 40 - 814 de eGFP, y 685 - 1171 de α-actina como se indica.

**D. Transferencia de Western y marcado metabólico**

Se obtuvieron muestras de proteína mediante desprendimiento de células en RIPA que contiene un cóctel de inhibidor de proteasa completo (Roche). 10 µg de proteína se separó mediante el 12 % de SDS-PAGE y se transfirió a membrana Immobilon-P (Millipore). Las membranas se sondaron con anticuerpo 6G7 dirigido contra la proteína del núcleo de VHC (un tipo de regalo de Harry Greenberg, Universidad de Stanford), o anticuerpos dirigidos contra eGFP (Roche) o actina (Sigma). Para el marcado metabólico, las células se incubaron en medio sin metionina durante 1 hora antes de la incubación con <sup>35</sup>S-metionina durante 1 hora y extracción de proteína. 25 µg de proteína se precipitó usando ácido tricloroacético e incorporación de <sup>35</sup>S-metionina se cuantificó mediante la unión al filtro.

**E. Datos de secuencia**

Las secuencias de las regiones antisentido de 5' y 3' de diferentes genotipos de VHC se obtuvieron de la base de datos de VHC, localizada en la página web producida colocando "http://" antes y ".gov" después "VHC.lanl" y los ejemplos representativos de cada genotipo se muestran en la Tabla 1. Las cepas eran: H77c (genotipo 1 a), nº de acceso del GenBank AF011751; VHCN (1 b), AF139594; JFH-1 (2a), AB047639; NZL11 (3a), D17763; HEMA51 (4a), D45193 y D45194; FR741 (5a), D50466 and D50467; TH271 (6f), D37848 y D37858.

Es evidente a partir de los resultados y descripción anteriores que la presente invención proporciona nuevas formas de tratamiento de afección patológica mediada por los VHC. Como tal, la presente invención representa una contribución significativa a la técnica.

La cita de cualquier publicación es para su descripción antes de la fecha de presentación y no se debe considerar como una admisión de que la presente invención no da derecho a retrotraer tal publicación en virtud de la invención anterior.

Aunque la invención precedente se ha descrito en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para los propósitos de claridad de entendimiento, es fácilmente evidente para los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que ciertos cambios y modificaciones a ella se pueden realizar de acuerdo con las reivindicaciones anexas.

**Listado de secuencias**

<110> La Junta de Administración de la Universidad Leland Stanford Junior

<120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA REDUCIR LAS CANTIDADES DE GENOMA VIRAL EN UNA CÉLULA DIANA

<130> STAN-364WO

<150> 60/568,358

<151> 2004-05-04

<160> 25

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 20

<212> ARN

<213> humano

<400> 1

40 ugaugggggc gacacuccac 20

<210> 2

<211> 25

<212> ARN

<213> humano

<400> 2  
 ugaagguugg gguaacacuc cggcc 25  
 <210> 3  
 <211> 20  
 5 <212> ARN  
 <213> humano  
 <400> 3  
 auuggggcg acacuccacc 20  
 <210> 4  
 10 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> humano  
 <400> 4  
 ugaacgggga gcuaaacacu ccagg 25  
 15 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 <213> humano  
 <400> 5  
 20 aauggggcg acacuccgcc 20  
 <210> 6  
 <211> 28  
 <212> RNA  
 <213> human  
 25 <400> 6  
 uagagcggca cacacuaggu acacucca 28  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 30 <213> humano  
 <400> 7  
 uacgaggcga cacuccacca 20  
 <210> 8  
 <211> 25  
 35 <212> ARN

<213> humano  
 <400> 8  
 ugagcuggua agauaacacu ccauu 25  
 <210> 9  
 5 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> humano  
 <400> 9  
 uaugagagca acacuccacc 20  
 10 <210> 10  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> humano  
 <400> 10  
 15 uaggcagcuu aacacuccga ccuaa 25  
 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 <213> humano  
 20 <400> 11  
 uauuggggcg acacuccacc 20  
 <210> 12  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 25 <213> humano  
 <400> 12  
 uaggcuggga gcuaaacacu ccaua 25  
 <210> 13  
 <211> 20  
 30 <212> ARN  
 <213> humano  
 <400> 13  
 aauggggcga cacuccacca 20  
 <210> 14  
 35 <400> 14

000  
 <210> 15  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 5 <213> humano  
 <400> 15  
 agacacaaac accauuguca cacuccacag c 31  
 <210> 16  
 <211> 30  
 10 <212> ARN  
 <213> humano  
 <400> 16  
 cacguuaaaa ccuacgcac uacgaaaccc 30  
 <210> 17  
 15 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> humano  
 <400> 17  
 cuaaaacuau acaaccuacu accucauccc a 31  
 20 <210> 18  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> humano  
 <400> 18  
 25 acaaacacca uugucacacu cca 23  
 <210> 19  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> humano  
 30 <400> 19  
 ugaacgggga gcuaaacacu cca 23  
 <210> 20  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 35 <213> humano



<400> 20  
 uggaguguga caaugguguu ugu 23  
 <210> 21  
 <211> 23  
 5 <212> ARN  
 <213> humano  
 <400> 21  
 ugcaguguga caaugguguu ugu 23  
 <210> 22  
 10 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> humano  
 <400> 22  
 aaacgccauu aucacacuaa aua 23  
 15 <210> 23  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> humano  
 <400> 23  
 20 acaaacacca uugucacacu cca 23  
 <210> 24  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> humano  
 25 <400> 24  
 ttaaggcacg cggatgatgc ca 22  
 <210> 25  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 30 <213> humano  
 <400> 25  
 acaaacacca uugucacacu cca 23  
 35

## REIVINDICACIONES

1. Un agente inhibidor de miR122, para uso en el tratamiento de un huésped que padece una afección patológica mediada por VHC, en el que dicho agente es un oligonucleótido antisentido o un agente de ARNi.
- 5 2. El agente de la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de un huésped que padece una afección patológica mediada por VHC, en el que dicho oligonucleótido antisentido comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID Neo: 15 o SEQ ID NO: 18.
3. El agente de la reivindicación 2, para uso en el tratamiento de un huésped que padece una afección patológica mediada por VHC, en el que dicho oligonucleótido antisentido consta de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 18.
- 10 4. El agente de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, para uso en el tratamiento de un huésped que padece una afección patológica mediada por VHC, en el que dicho oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido de ARN 2'-O- metilado.
5. El agente de cualquier reivindicación precedente, para uso en el tratamiento de un huésped que padece una afección patológica mediada por VHC, en el que dicho huésped es un ser humano.
- 15 6. El agente de cualquier reivindicación precedente, para uso en el tratamiento de un huésped que padece una afección patológica mediada por VHC, en asociación o en combinación con otro compuesto farmacéuticamente activo.
7. El agente de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5 para uso en el tratamiento de un huésped que padece una afección patológica mediada por VHC, en combinación y / o alternancia con otros agentes terapéuticos o agentes antivirales profilácticos.
- 20 8. El agente de la reivindicación 7, para uso en el tratamiento de un huésped que padece una afección patológica mediada por VHC, en combinación con un agente anti-VHC.
9. El agente de la reivindicación 8, para uso en el tratamiento de un huésped que padece una afección patológica mediada por VHC, en el que dicho agente anti-VHC se selecciona entre interferones, inhibidores de la replicación de ARN, agentes antisentido, vacunas terapéuticas, inhibidores de proteasa, inhibidores de helicasa y terapia de anticuerpos.
- 25 10. El agente de la reivindicación 9, para uso en el tratamiento de un huésped que padece una afección patológica mediada por VHC, en el que dicho agente anti-VHC es un interferón.
11. El agente de la reivindicación 9, para uso en el tratamiento de un huésped que padece una afección patológica mediada por VHC, en el que dicho agente anti-VHC es un inhibidor de la replicación de ARN.
- 30 12. El agente de la reivindicación 9, para uso en el tratamiento de un huésped que padece una afección patológica mediada por VHC, en el que dicho agente anti-VHC es un inhibidor de proteasa.
13. El agente de la reivindicación 9, para uso en el tratamiento de un huésped que padece una afección patológica mediada por VHC, en el que dicho agente anti-VHC es un inhibidor de helicasa.
- 35 14. Uso de un agente inhibidor de miR122 tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13 en la preparación de un medicamento para tratar a un huésped que padece una afección patológica mediada por VHC.
15. Un procedimiento *in vitro* de modulación de una cantidad de genoma de un virus de Hepatitis C en una célula diana, comprendiendo dicho procedimiento la inhibición de la actividad de miR122 en dicha célula diana mediante la introducción en dicha célula diana de un agente inhibidor de miR122 tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 40

Fig 1

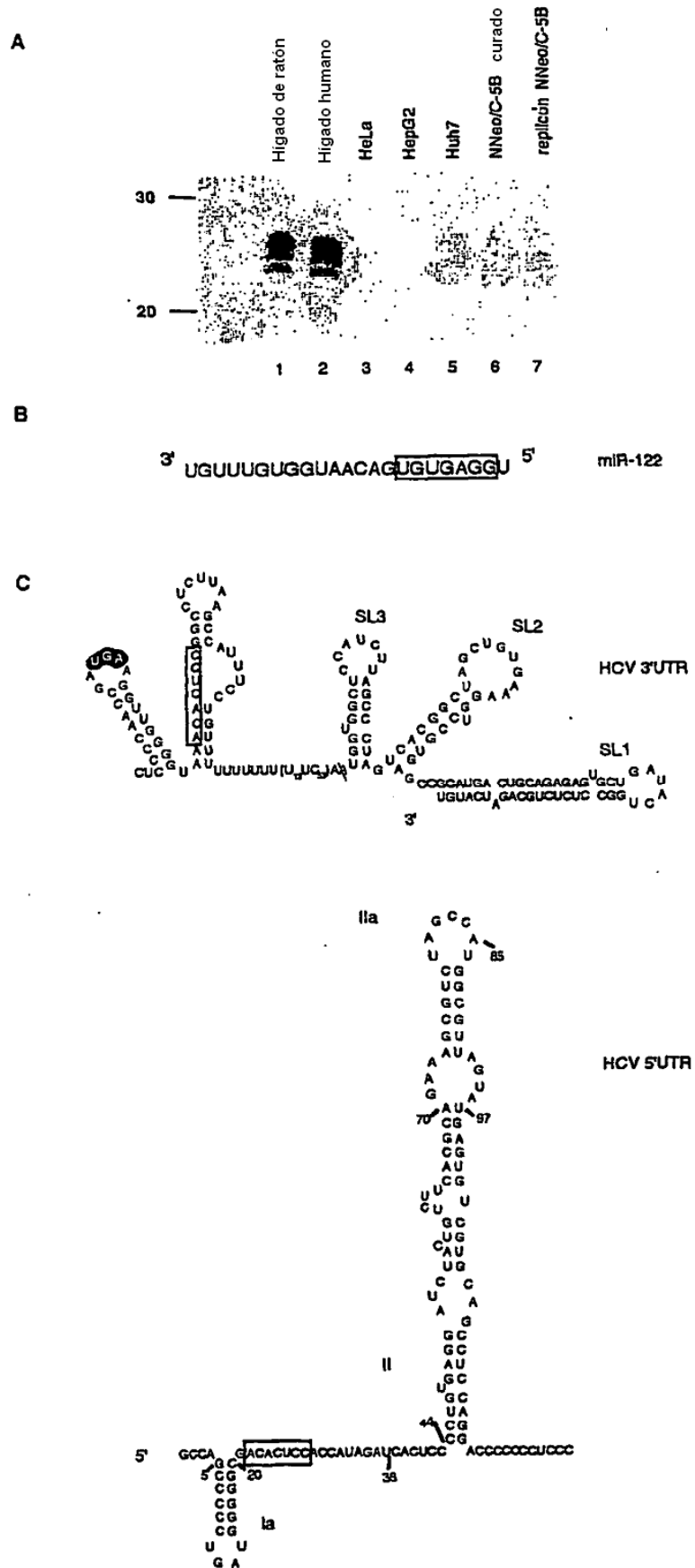


Fig 2

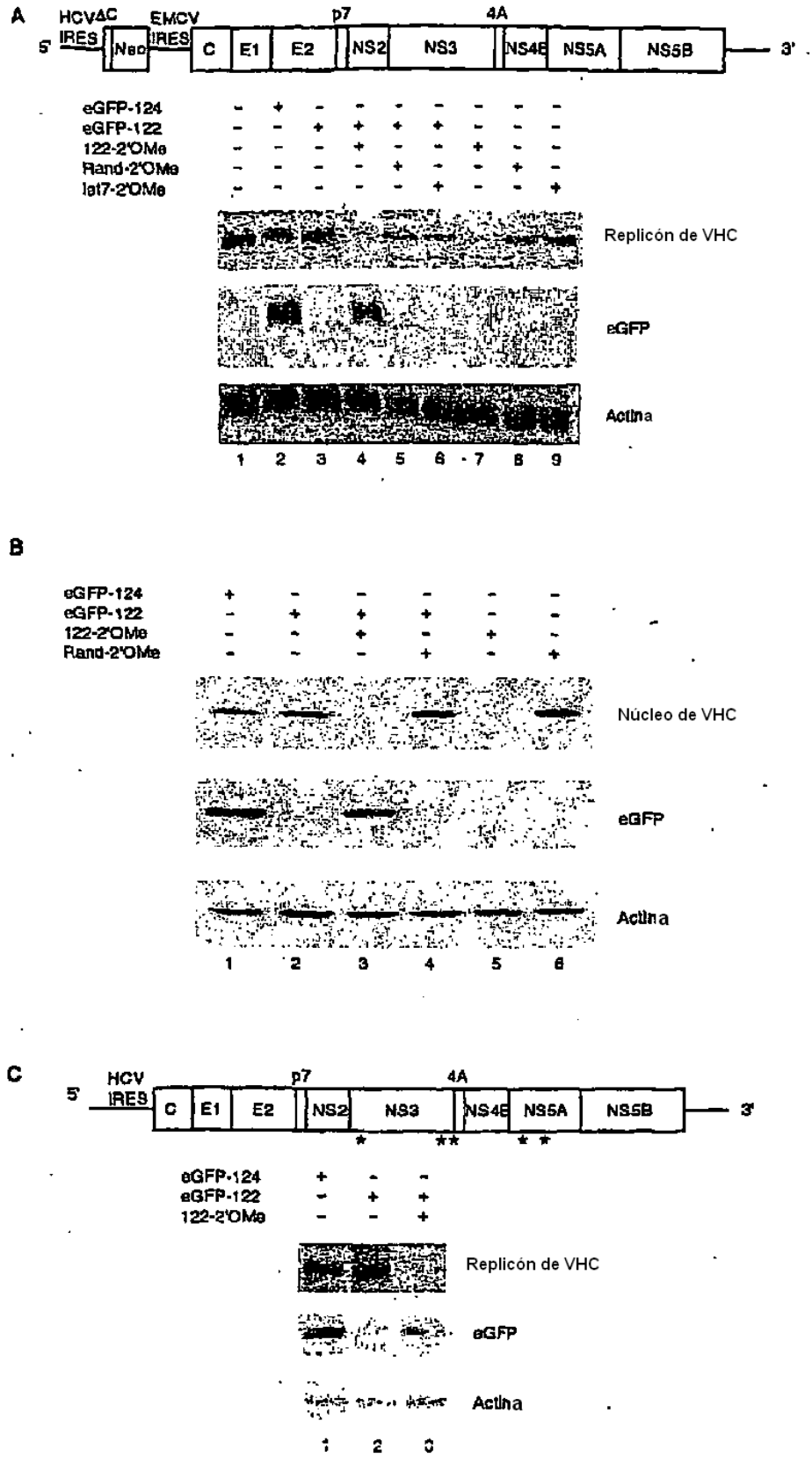
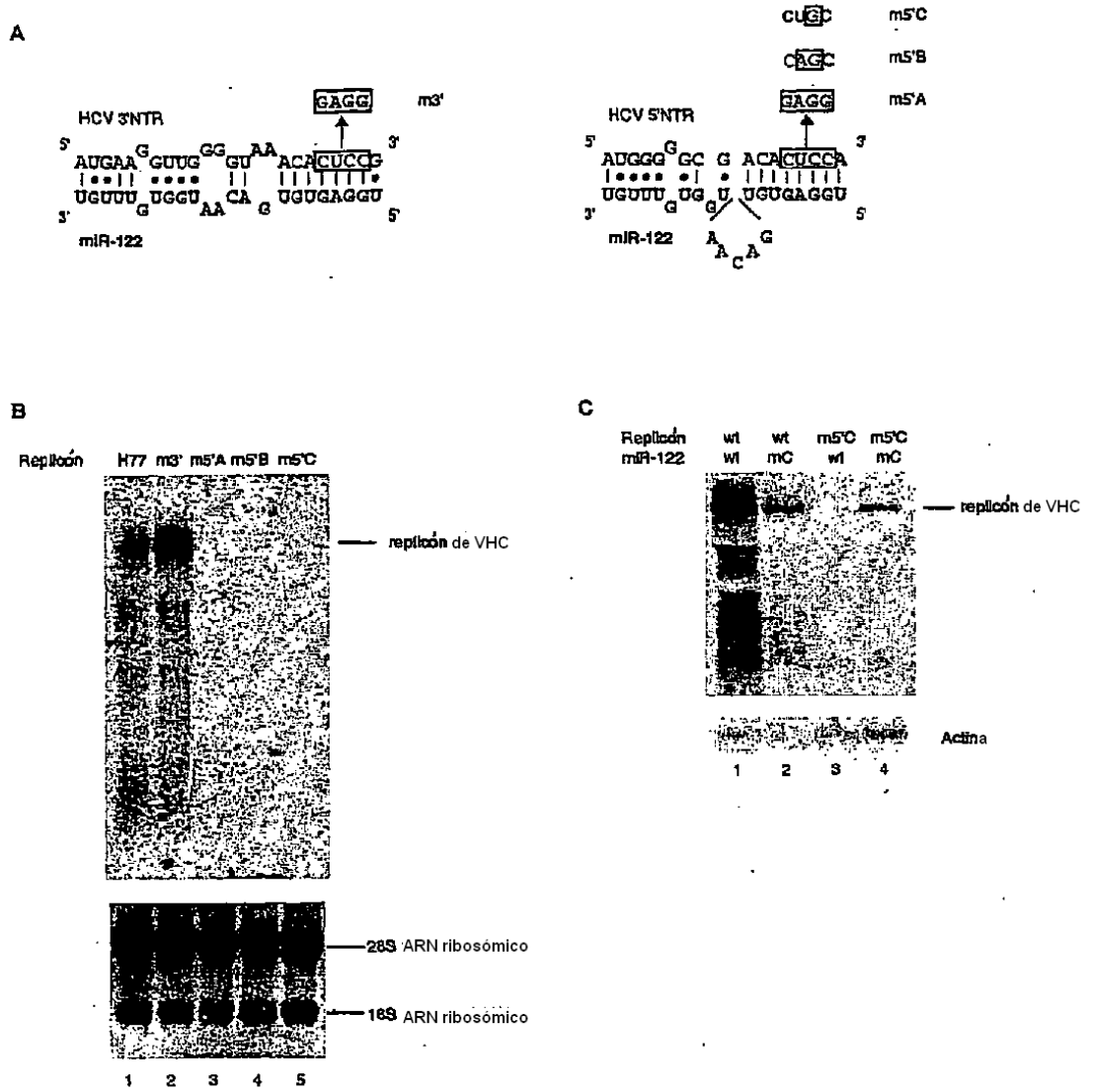


Fig 3



**Fig 4**

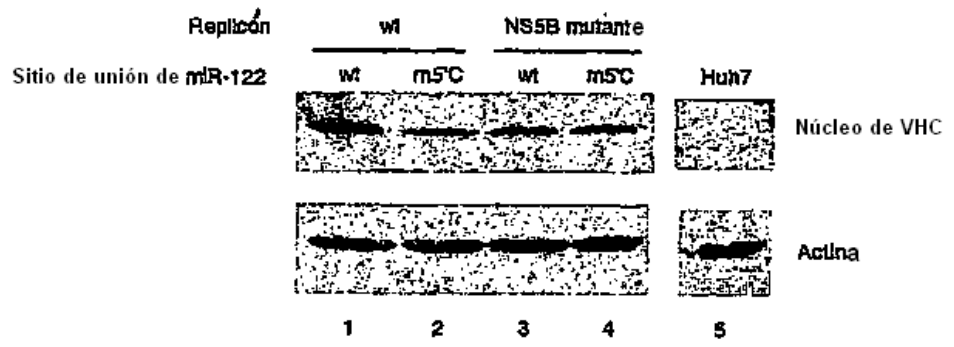
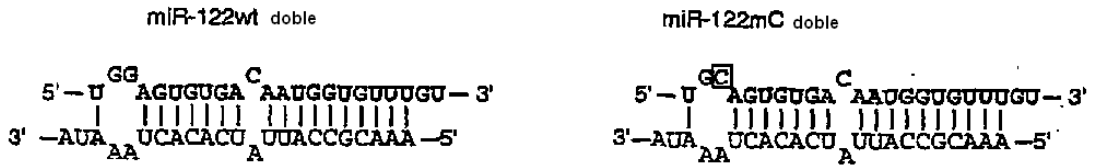


Fig S3

A



B

