

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 500**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2009 E 09769355 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 2297357**

54 Título: **Predicción de respuesta a terapia antiviral**

30 Prioridad:

27.06.2008 EP 08159274

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

19.03.2013

73 Titular/es:

**NOVARTIS FORSCHUNGSSTIFTUNG,
ZWEIGNIEDERLASSUNG FRIEDRICH MIESCHER
INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH
(50.0%)
Maulbeerstrasse 66
4058 Basel, CH y
UNIVERSITY HOSPITAL BASEL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FILIPOWICZ, WITOLD;
HEIM, MARKUS;
KROL, JACEK;
MARKIEWICZ, ILONA y
FILIPOWICZ, MAGDALENA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 398 500 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

Predicción de respuesta a terapia antiviral

La presente invención se refiere a un método para determinar si las terapias antivirales serán efectivas.

5 Las infecciones virales representan una seria amenaza para la salud y son conocidas por ser la mayor causa de morbilidad en animales y el hombre. Por ejemplo, la infección con virus de hepatitis C (HCV) es una causa principal de enfermedad crónica del hígado a nivel mundial. Un aspecto importante y sorprendente de la hepatitis C es su tendencia a la cronicidad. En más del 70% de individuos infectados, la HCV establece una infección persistente en décadas que puede conducir a cirrosis y carcinoma hepatocelular.

10 Una hipótesis interesante en la biología de la HCV propone que la proteasa viral NS3-4A no procesa solamente proteínas sino también escinde e inactiva componentes de las trayectorias sensoriales intracelulares que detectan la infección viral e inducen la activación transcripcional de interferones tipo I (IFN). Una de las metas de NS3-4A es TRIF (adaptadora que contiene el dominio TIR que induce IFN β), un vínculo esencial entre detección de dsADN en endosomas por TLR3 (receptor tipo toll 3) y la inducción de IFN β . Más recientemente, el gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I) y MDA5 (helicard) fueron identificados como sensores intracelulares de dsARN. Ambos sensores señalizan a través de Cardif (conocida también como IPS-1, MAVS, VISA) para inducir la producción de IFN β . Cardif puede ser inducida e inactivada mediante HCV NS3-4A. Dos helicasas de ARN, RIG-I y MDA5, identificadas como sensores intracelulares de dsARN actúan a través de Cardif para inducir la producción de IFN β .

20 Los IFNs tipo I no son solamente componentes cruciales del sistema inmuno innato, sino son también los componentes más importantes de las terapias actuales contra CHC. La terapia normal actual consiste de IFN α pegilado (pegIFN α) inyectado una vez por semana de manera subcutánea y toma diaria de agente antiviral ribavirin oral. Este régimen alcanza una respuesta virológica sostenida (SVR) global en 55% de los pacientes, con diferencias significativas entre genotipos. Una VSR se define como la pérdida de ARN de HCV detectable durante el tratamiento y su ausencia continua durante por lo menos 6 meses después de detener la terapia. Varios estudios de seguimiento a largo plazo en pacientes quienes lograron una SVR demuestran que esta respuesta es durable en más de 95% de pacientes. La probabilidad de una SVR depende fuertemente de la respuesta temprana al tratamiento. Pacientes quienes no muestran una respuesta virológica temprana (EVR), definida como una disminución de la carga viral en por lo menos 2 log₁₀ después de 12 semanas de terapia, son altamente improbables que desarrollen una SVR y se puede detener el tratamiento en estos pacientes. Por otra parte, pacientes con una EVR tienen una buena oportunidad de ser curados, con 65% de ellos que alcanzan una SVR. La prognosis es aún mejor para pacientes quienes tienen una rápida respuesta virológica (RVR), definida como ARN de HCV en suero indetectable después de 4 semanas de tratamiento. Más de 85% de ellos alcanzarán una SVR. Desafortunadamente, menos de 20% de pacientes con genotipo 1 y aproximadamente 60% de pacientes con genotipos 2 o 3 muestran una RVR. No se conocen actualmente los factores del huésped que son importantes para una respuesta temprana a la terapia.

40 Los IFNs tipo I alcanzan sus efectos antivirales potentes a través de la regulación de cientos de genes (ISG, genes estimulados por interferón). La activación transcripcional de ISGs induce proteínas que usualmente no son sintetizadas en células en reposo y que establecen un estado antiviral no específico de virus en la célula. Los interferones inducen su síntesis mediante la activación de la trayectoria Jak-STAT, un paradigma de señalización celular usado por muchas citoquinas y factores de crecimiento. Todos los IFNs tipo I se enlazan en el mismo receptor de superficie celular (IFNAR) y activan los miembros Jack1 y Tyk2 de la familia de quinasas Janus asociadas al receptor. Las quinasas fosforilan y activan entonces la señal de transductor y de activador de transcripción 1 (STAT1) y STAT2. Los STATs activados translocan en el núcleo donde enlazan elementos específicos de ADN en los promotores de ISGs. Muchos de los ISGs tienen actividad antiviral, pero otros están involucrados en el metabolismo de lípidos, la apoptosis, la degradación de proteínas y respuestas antiinflamatorias celulares. Como es el caso con muchos virus, el HCV interfiere con el sistema de IFN, probablemente en niveles múltiples. La señalización de Jak-STAT inducida por IFN es inhibida en células y ratones transgénicos que expresan proteínas de HCV y en biopsias del hígado de pacientes con CHC. In vitro, las proteínas NS5A y E2 de HCV enlazan e inactivan proteína quinasa R (PKR), una proteína antiviral no específica importante. Sin embargo, los mecanismos moleculares que son importantes para la respuesta a IFN aplicado terapéuticamente en pacientes con CHC son actualmente conocidos. (Sarasin-Filipowicz et al., 2008, PNAS, 105(19):7034-7039).

55 La capacidad de HCV para interferir con la trayectoria de IFN en muchos niveles diferentes es un mecanismo que subyace probablemente al éxito de HCV para establecer una infección crónica (Gale, M., Jr. & Foy, E. M., Nature 436, 939-945 (2005). Sin embargo, de manera muy paradójica, en chimpancés infectados aguda o crónicamente

- 5 con HCV se inducen cientos de ISGs en el hígado (7 Bigger, C.B., et al. *J Virol* 78, 13779-13792 (2004)). Sin embargo, a pesar de la activación del sistema de IFN endógeno, no es despejado el virus de animales infectados crónicamente. El resultado obtenido con chimpancés son difíciles de extrapolar para humanos puesto que hay algunas diferencias importantes en la patobiología de la infección con HCV entre estas especies. Mientras que la mayoría de los chimpancés infectados de manera aguda con HCV despejan los virus espontáneamente, las infecciones en hombres se vuelven crónicas en la mayoría de los casos. Por otra parte, los chimpancés infectados de manera crónica raramente pueden ser curados con IFN, mientras que más de la mitad de los pacientes con CHC son tratados exitosamente.
- 10 Se encontró también que la inducción de ISGs en biopsias de hígado pre-tratado de muchos pacientes con CHC, demuestra otra vez que la infección con HCV puede conducir a la activación del sistema de IFN endógeno (Chen, L., et al. *Gastroenterology* 128, 1437-1444 (2005)). De manera notable, pacientes con expresión pre-elevada de ISGs tendieron a responder pobremente a la terapia cuando se compararon con pacientes que tienen baja expresión inicial (Chen, L., et al. *Gastroenterology* 128, 1437-1444 (2005)). La causa de esta respuesta diferencial a la terapia no está entendida.
- 15 La presente invención se basa en estudios en los cuales los inventores investigaron la señalización inducida de IFN y la inducción de ISG en muestras pares de biopsias de hígado y células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs) de pacientes con hepatitis crónica antes y durante la terapia con pegIFN α . Además correlacionan datos bioquímicos y moleculares con la respuesta al tratamiento. Su trabajo se expone en mayor detalle en el ejemplo adjunto.
- 20 En un estudio previo, los inventores establecieron que algunos sujetos con una infección viral del hígado están en un estado de "pre-activación", de manera que la trayectoria de señalización de IFN está en un estado de estimulación con ISGs activados (Sarasin-Filipowicz et al., 2008, *PNAS*, 105(19)7034-7039). Los inventores han encontrado que tales individuos, cuando se trataron subsiguientemente con IFN y un agente antiviral, tuvieron una respuesta deficiente o nula al tratamiento antiviral. En contraste, otro grupo de sujetos infectados no parecieron tener estimulación previa de receptores de IFN (y estimulación de ISGs) y este grupo respondió bien a la terapia antiviral (es decir, tuvieron una respuesta virológica rápida (RVR)). Además, es posible determinar si un sujeto sería un respondedor deficiente al tratamiento o tendría una RVR de acuerdo con el nivel de expresión de un número de genes específicos, algunos de los cuales son genes ISG. En otras palabras, los inventores identificaron un grupo de genes que son marcadores genéticos pronósticos, cuyos niveles de expresión
- 25 predicen si un sujeto responderá al tratamiento antiviral.
- 30 En un estudio más usando muestras en pares de biopsias de hígado y células mononucleares de sangre periféricas (PBMCs) de pacientes con hepatitis crónica antes y durante la terapia con pegIFN α , los inventores presentes investigaron los microARNs (miR) de los pacientes.
- 35 Los microARNs (miARNs) son una clase de gen de ARN de no codificación cuyo producto final es una molécula de ARN funcional de ~22 nt. Se procesan a partir de precursores de horquilla (hairpin) imperfectos codificados de manera endógena como ARNs de hebra sencilla. Parecen funcionar de día represión translacional a través de apareamiento de bases a la región 3'-no trasladada (UTR) de ARNs objetivos (Griffith-Jones et al., 2006, *Nucleic Acids Research*, Vol. 34, D140-D144).
- 40 La biogénesis de microARN (miARN) es un proceso complejo, de pasos múltiples. Transcritos de miARN primarios se transcriben mediante ARN polimerasa II y pueden fluctuar de tamaño desde cientos hasta miles de nucleótidos de longitud (pri-miARN). Los miARNs pueden ser rastreados hacia atrás hasta dos fuentes genómicas. Algunos están ubicados dentro de regiones intrónicas de genes que codifican proteínas. Otros están ubicados dentro de los intrones o exones de ARNs no codificadores. De manera interesante, los pri-miARNs pueden codificar para un solo miARN, pero pueden contener también racimos de varios miARNs. El pri-miARN se procesa subsiguientemente en una horquilla (pri-miARN) de ~70 nt mediante la endonucleasa ribonucleasa III nuclear (RNasa III), Drosha. El pre-miARN se exporta entonces desde el núcleo hasta el citoplasma mediante Exportin5/RanGTP. En el citoplasma, una segunda RNasa III, Dicer, conjuntamente con su proteína dsRBD socia, corta el pre-miARN en la región de vástago de la horquilla liberando así un ARN-dúplex de 21 nucleótidos. A partir del miARN dúplex, una hebra entra al complejo de proteína que reprime la expresión del gen objetivo, el complejo silenciador inducido por ARN (RISC), mientras que la otra hebra es degradada. La selección de hebra recae en la estabilidad termodinámica local del miARN dúplex. La hebra cuyo extremo 5' es menos apareado de manera estable se carga en el complejo de RISC. Los miARNs cargados en el complejo de RISC parecen funcionar vía represión translacional a través de apareamiento de bases para la región 3'-sin trasladar (UTR) de miARNs objetivo Du, T. y Zamore, P. D. et al. *Micro-Primer: la biogénesis y función de microARN*. *Development* (2005) 132, 4645-4652. Actualmente están depositadas 462 secuencias de miARN humano en miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk>) y se sugiere que esta lista alcanzará la marca de 800. Los grandes números de identificados hasta ahora sugieren que podrían jugar roles complejos en la regulación y sintonía fina de procesos biológicos. De hecho, varios miARNs han sido implicados en el control de la proliferación celular (mir-125b y let-
- 45 se procesa subsiguientemente en una horquilla (pri-miARN) de ~70 nt mediante la endonucleasa ribonucleasa III nuclear (RNasa III), Drosha. El pre-miARN se exporta entonces desde el núcleo hasta el citoplasma mediante Exportin5/RanGTP. En el citoplasma, una segunda RNasa III, Dicer, conjuntamente con su proteína dsRBD socia, corta el pre-miARN en la región de vástago de la horquilla liberando así un ARN-dúplex de 21 nucleótidos. A partir del miARN dúplex, una hebra entra al complejo de proteína que reprime la expresión del gen objetivo, el complejo silenciador inducido por ARN (RISC), mientras que la otra hebra es degradada. La selección de hebra recae en la estabilidad termodinámica local del miARN dúplex. La hebra cuyo extremo 5' es menos apareado de manera estable se carga en el complejo de RISC. Los miARNs cargados en el complejo de RISC parecen funcionar vía represión translacional a través de apareamiento de bases para la región 3'-sin trasladar (UTR) de miARNs objetivo
- 50 se procesa subsiguientemente en una horquilla (pri-miARN) de ~70 nt mediante la endonucleasa ribonucleasa III nuclear (RNasa III), Drosha. El pre-miARN se exporta entonces desde el núcleo hasta el citoplasma mediante Exportin5/RanGTP. En el citoplasma, una segunda RNasa III, Dicer, conjuntamente con su proteína dsRBD socia, corta el pre-miARN en la región de vástago de la horquilla liberando así un ARN-dúplex de 21 nucleótidos. A partir del miARN dúplex, una hebra entra al complejo de proteína que reprime la expresión del gen objetivo, el complejo silenciador inducido por ARN (RISC), mientras que la otra hebra es degradada. La selección de hebra recae en la estabilidad termodinámica local del miARN dúplex. La hebra cuyo extremo 5' es menos apareado de manera estable se carga en el complejo de RISC. Los miARNs cargados en el complejo de RISC parecen funcionar vía represión translacional a través de apareamiento de bases para la región 3'-sin trasladar (UTR) de miARNs objetivo
- 55 se procesa subsiguientemente en una horquilla (pri-miARN) de ~70 nt mediante la endonucleasa ribonucleasa III nuclear (RNasa III), Drosha. El pre-miARN se exporta entonces desde el núcleo hasta el citoplasma mediante Exportin5/RanGTP. En el citoplasma, una segunda RNasa III, Dicer, conjuntamente con su proteína dsRBD socia, corta el pre-miARN en la región de vástago de la horquilla liberando así un ARN-dúplex de 21 nucleótidos. A partir del miARN dúplex, una hebra entra al complejo de proteína que reprime la expresión del gen objetivo, el complejo silenciador inducido por ARN (RISC), mientras que la otra hebra es degradada. La selección de hebra recae en la estabilidad termodinámica local del miARN dúplex. La hebra cuyo extremo 5' es menos apareado de manera estable se carga en el complejo de RISC. Los miARNs cargados en el complejo de RISC parecen funcionar vía represión translacional a través de apareamiento de bases para la región 3'-sin trasladar (UTR) de miARNs objetivo

7), destino de linaje de células B hematopoyéticas (mir-181), supervivencia de células B (mir-15a y mir-16-1), patrones cerebrales (mir-430), secreción de insulina por células pancreáticas (mir-357), desarrollo de adipocitos (mir-375) y proliferación y diferenciación de músculos (miR-1 y miR-133). Muchos miARNs están ubicados en regiones genómicas involucradas en cáncer. Por ejemplo, el racimo que contiene mir-16-1 y mir-15 está eliminado y desregulado en la mayoría de leucemias linfocíticas crónicas de células B (B-CLL; Calin, G. A., et al. Conexión de cáncer-MicroARN: El comienzo de un nuevo cuento. *Cancer Res.* (2006) 66, 7390-7394).

Los miARNs parecen estar involucrados en la regulación de genes. Algunos miARNs, que incluyen lin-4 y let-7, inhiben la síntesis de proteínas mediante enlazamiento a regiones 3' sin trasladar parcialmente complementarias (3' UTRs) de miARNs objetivos. Otros, incluyendo el miARN Espantapájaros (Scarecrow) encontrado en plantas, funcionan como siARN y enlazan a secuencias de mRNA perfectamente complementarias para destruir el transcrito objetivo (Grishok et al, 2001).

La investigación de microARNs está creciendo a medida que los científicos están empezando a apreciar el amplio papel que estas moléculas juegan en la regulación de la expresión de genes eucarióticos. Los dos miARNs mejor entendidos, lin-4 y let-7, regulan el tiempo de desarrollo en *C. elegans* regulando la translación de una familia de mARNs clave (revisado en Pasquinelli, 2002). Se han identificado varios cientos de miARNs en *C. elegans*, *Drosophila*, ratón, y humanos. Como se esperaría para moléculas que regulan la expresión de genes, los niveles de miARN han mostrado que varían entre tejidos y estados de desarrollo. Además, un estudio muestra una fuerte correlación entre la expresión reducida de dos miARNs y leucemia linfocítica crónica, que proporciona un vínculo posible entre miARNs y cáncer (Calin, 2002). Aunque el campo es aun joven, hay la especulación de que los miARNs podrían ser muy importantes como factores de transcripción en la regulación de la expresión de genes en eucariotas superiores.

Hay unos pocos ejemplos de miARNs que juegan papeles críticos en la diferenciación celular, desarrollo temprano y procesos celulares como apoptosis y metabolismo de grasas, lin-4 y let-7 regulan el paso de un estado larvario a otro durante el desarrollo de *C. elegans* (Ambros, 2003). Mir-14 y bantam son miARNs de *drosophila* que regulan la muerte celular, aparentemente regulando la expresión de genes involucrados en apoptosis (Brennecke et al, 2003, Xu et al, 2003). Mir-14 ha sido implicado también en el metabolismo de grasa (Xu et al., 2003). Lsy-6 y miR-273 son miARNs de *C. elegans* que regulan la asimetría en neuronas cliemosensoriales (Chang et al., 2004). Otro miARN de animal que la diferenciación celular es miR-181, que guía la diferenciación de células hematopoyéticas (Chen et al., 2004). Estas moléculas representan el rango completo de miARNs de animales con funciones conocidas. El entendimiento incrementado de las funciones de miARNs revelará indudablemente las redes regulatorias que contribuyen al desarrollo normal, la diferenciación, la comunicación inter e intracelular, el ciclo celular, la angiogénesis, la apoptosis y muchos otros procesos celulares. Dados sus importantes papeles en muchas funciones biológicas, es probable que los miARNs ofrecerán puntos importantes para la intervención terapéutica o el análisis de diagnóstico.

Un miR-122 abundante de miARN específico de hígado es importante para la replicación eficiente de ARN de HCV en células Huh7 de hepatoma humano que expresan de manera estable un replicon de HCV (Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. *Science* 2005;309:1577-1581). Esta observación generó mucho interés en un rol de miR-122 en infección con HCV y como un objetivo terapéutico potencial. Como se explica en la presente, la terapia actual de CHC consiste de INF α pegilada (pegIFN α) en combinación con ribavirin, pero el tratamiento logra una respuesta virológica sostenida en solamente ~55% de los pacientes (Manns MP et al. *Lancet* 2001;358:958-965; Fried MW et al. *N Engl J Med* 2002;347:975-982). Se reportó recientemente que los niveles de miR-122 y varios otros miARNs son regulados por IFN en células de hepatoma Huh7 y hepatocitos primarios de ratón, y que los miARNs podrían mediar por lo menos algunos efectos de IFN en replicación de ARN de HCV in vitro (Pedersen IM et al. *Nature* 2007;449:919-922). Todos los experimentos realizados a la fecha evaluaron un rol de miR-122 en la replicación de HCV en células cultivadas. Para determinar el estatus de miR-122 en pacientes con hepatitis C crónica (CHC), los inventores presentes compararon niveles de miR-122 y otros miARNs en biopsias de hígado colectados a partir de cuarenta y dos pacientes de CHC que experimentaron tratamiento con pegIFN α y ribavirin. Se realizaron mediciones mediante PCR cuantitativa (qPCR), usando miARNs sintetizados químicamente como normas. Los inventores presentes encontraron que pacientes quienes no respondieron a la terapia con una disminución de la carga viral en más de 2 log¹⁰ en la semana 12, clasificados como no-respondedores primarios (PNR), tuvieron niveles significativamente menores de miR-122 que los pacientes con una fuerte respuesta a IFN α y ARN de HCV indetectable en la semana 12 (respuesta virológica temprana completa; cEVR). Las diferencias entre pacientes de PNR y cEVR fueron independientes de la etapa de fibrosis del hígado, lo que indica que la disminución de miR-122 en pacientes de PNR no se debe a una proporción menor de hepatocitos en el material de la biopsia. Además, la diferencia en expresión de miR-122 entre los grupos fue aun aparente cuando los niveles de miR-122 se normalizaron al mRNA de albúmina específico de hepatocito, que soporta además una correlación directa entre niveles de miR-122 y la respuesta al tratamiento.

Los estudios clínicos han mostrado que los pacientes con alta carga viral de HCV responden menos bien a la terapia (Manns MP et al. *Lancet* 2001;358:958-965; Fried MW et al. *N Engl J Med* 2002;347:975-982). Puesto

que miR-122 es importante para la replicación de HCV en células de hepatoma Huh7, el hallazgo de bajo miR-122 en no respondedores por los inventores presentes fue sorprendente. Los presentes inventores midieron el ARN de HCV en hígado y suero de los pacientes. No se observó correlación entre los niveles de miR-122 y la carga viral de HCV. Estos resultados son opuestos a los resultados obtenidos in vitro y no soportan un papel significativo del miR-122 en la replicación de HCV in vivo (ver, por ejemplo, WO-A-2007/112754, que propone inhibir miR-122 para la terapia de HCV). El nivel disminuido de miR-122 en no respondedores origina una posibilidad de que miR-122 es un gen objetivo de IFN regulado negativamente. De hecho, la expresión de miR-122 en las biopsias de pacientes con CHC muestra una correlación negativa con la expresión de genes estimulados con IFN conocidos (ISGs).

En resumen, los presentes resultados sorprendentes demuestran que (i) pacientes que no responden a la terapia de IFN tienen generalmente niveles varias veces más bajos de miR-122 que los respondedores; (ii) que la administración de pegIFN α no tiene efecto significativo en el nivel de miR-122 en el hígado de los pacientes; y (iii) que no existe correlación entre niveles de miR-122 intra-hepático y ARN de HCV. Esto es inesperado, porque con base en los estudios de replicación de HCV en células Huh7, los bajos niveles de miR-122 deben disminuir los campos virales y beneficiar la terapia. No obstante, el hallazgo de que el nivel de miR-122 es significativamente menor en pacientes de PNR que en cEVR hace al miR-122 un marcador conveniente adecuado, por ejemplo junto con ISGs pre-activados (Sarasin-Filipowicz M et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(19):7034-7039; Chen L et al. Gastroenterology 2005; 128:1437-1444; Asselah T et al. Gut 2008;57:516-524), para predecir el resultado de la terapia de IFN en pacientes con CHC. Además, los resultados actuales demuestran también de manera sorprendente que (i) los pacientes que no responden a la terapia de IFN generalmente tienen niveles varias veces más altos de miR-296-5p que los respondedores. Esto demuestra que miR-296-5p, y más generalmente los miARNs, pueden usarse para predecir el resultado de la terapia de IFN en pacientes con CHC.

Esto condujo a los inventores a la conclusión de que podría desarrollarse un método con base en miARN para ayudar al facultativo a decidir un régimen de tratamiento para sujetos que sufren de una infección viral en el hígado. Los niveles de miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, de un individuo infectado pueden compararse con la expresión de genes de un control (es decir, un sujeto sin infección viral).

Los sujetos infectados con niveles menores de miR-122 y/o niveles superiores de miR-296-5p (según comparación con el control) sería improbable que se beneficiaran del uso de IFN en un régimen de tratamiento (es decir, no se esperaría que estos individuos tuvieran una RVR) mientras que los sujetos infectados para quienes los niveles de miR-122 y/o miR-296-5p eran mayormente inalterados o elevados, en comparación con la expresión del control, es probable que se beneficiaran de la terapia de IFN y tuvieran una RVR. Los inventores se sorprendieron al hacer estas correlaciones porque los resultados in vitro conocidos en la técnica predecían lo contrario.

Aunque ha habido estudios previos de niveles de expresión de genes en sujetos "respondedor" y "no respondedor" con una infección viral del hígado, por ejemplo Chen et al., (2005) Gastroenterology 128, 1437-1444, la investigación conducida como parte de la presente invención estudió un grupo mucho más amplio de genes con el fin de determinar cuáles actuarían como marcadores de pronóstico. Además, los presentes inventores evaluaron también si se podrían usar diferentes miARNs como marcadores de pronóstico. Además, los inventores analizaron también la expresión de genes y los niveles de miARNs en muestras tomadas antes y después del tratamiento antiviral y usaron esta información para identificar marcadores genéticos de pronóstico, mientras que estudios previos solamente intentaron correlacionar el resultado del tratamiento con los niveles de expresión de genes presentes en muestras tomadas antes de tratamiento. Así, el conjunto de datos que conduce a la identificación de los marcadores genéticos de pronóstico expuestos más adelante se consideran que son más completos y robustos que en estudios previos.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para determinar la probabilidad de que un sujeto que tiene una infección viral del hígado responderá a terapia antiviral que incluye la estimulación de actividad de Interferón (IFN), el método que comprende analizar una muestra del sujeto para el nivel de expresión de un miARN y comparar el nivel de expresión de dicho miARN en la muestra del sujeto con los niveles de dicho miARN en una muestra de control.

En algunas realizaciones de la invención, el miARN es miR-122 y el nivel inferior de miR-122 en la muestra del sujeto en comparación con el nivel de miR-122 en la muestra de control indica que el sujeto no tiene probabilidad de responder a dicha terapia antiviral.

En algunas otras realizaciones de la invención, tales realizaciones pueden combinarse con aquellas antes descritas, el miARN es miR-296-5p y un nivel superior de miR-296-5p en la muestra del sujeto en comparación con el nivel de miR-296-5p en la muestra de control indica que el sujeto no tiene probabilidad de responder a dicha terapia antiviral.

En alguna realización de la invención, un nivel inalterado o elevado de miR-122 y/o un nivel inalterado o disminuido de miR-296-5p, respectivamente, en la muestra del sujeto en comparación con el nivel de miR-122 o miR-296-5p, respectivamente, en la muestra de control pueden indicar que el sujeto no tiene probabilidad de responder a dicha terapia antiviral.

5 Se entiende que los métodos de la invención no están restringidos al uso de un miARN solamente, sino también abarca cualquier combinación del nivel de expresión de cualquier miARN con aquellos de miR-122 y/o miR-296-5p, o la combinación de cualquier miARN relevante, en particular cualquier miARN para tener un poder de predicción para la probabilidad de que un sujeto que tiene una infección viral del hígado responderá a la terapia antiviral.

10 En los métodos de la invención, la terapia antiviral puede ser IFN α pegilada (pegIFN α), combinada opcionalmente con ribavirin.

Además, en algunas realizaciones de la invención, la infección viral es infección con virus de hepatitis B o virus de hepatitis C.

Además, se puede usar tejido del hígado como muestra en los métodos de la invención.

15 De manera ventajosa, la expresión de genes, que podría ser predictiva de la respuesta del sujeto a la terapia, puede ser analizada también en los métodos de la invención con el fin de incrementar el poder de predicción, por ejemplo algunos de los genes publicados por algunos de los inventores en un estudio previo (Sarasin-Filipowicz et al., 2008, PNAS, 105(19):7034-7039). Dicha expresión de genes puede ser determinada mediante la cantidad de gen de mRNA transcrito en la muestra, o la cantidad de cADN derivado de dicho mRNA, o midiendo la cantidad de péptido o polipéptido codificado por el gen en la muestra, por ejemplo, usando una molécula de enlazamiento específica.

20

En algunas realizaciones de la invención, el sujeto es un mamífero, por ejemplo un ser humano.

25 La presente invención abarca también un paquete para realizar el método de la invención, dicho paquete que comprende medios para analizar, en una muestra de un sujeto, el nivel de expresión de un miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p; y opcionalmente medios para comparar el nivel de expresión de dicho miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, en la muestra del sujeto con los niveles de dicho miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, en una muestra de control. El paquete puede comprender además medios para analizar la expresión de por lo menos un gen que podría ser predictivo de la respuesta del sujeto a la terapia, que comprende eventualmente una o más moléculas de enlazamiento específica que pueden apuntar a moléculas representativas de dicho por lo menos un gen que podría ser predictivo de la respuesta del sujeto a la terapia, en donde dicha molécula de enlazamiento específica es una sonda de oligonucleótido, anticuerpo o aptámero; y, opcionalmente, medios para comparar la expresión de los genes en la muestra para expresión de los mismos genes en una muestra de control.

30

35 Se apreciará que los métodos de la invención serán de gran beneficio para los facultativos. El IFN es una proteína de factor de crecimiento y preparaciones farmacéuticas que contienen IFN son costosas para elaboración. Por lo tanto, es muy importante para un facultativo tener confianza en que el IFN se va a usar en una manera apropiada y económica. Además, independientemente del costo, es deseable con frecuencia eliminar la infección viral del hígado tan pronto como sea posible. Por lo tanto, es pérdida de tiempo (que sería gastar utilizando terapias alternativas) si un facultativo administra IFN y descubre subsiguientemente que no tiene efectos benéficos. Los métodos de la invención son, por lo tanto, de gran ayuda para un facultativo porque puede identificar dos poblaciones de sujetos. Una población mostrará niveles menores de miR-122 y/o niveles mayores de miR-296-5p en comparación con el control y, por lo tanto, no se beneficiará probablemente del tratamiento con IFN. La otra población, con niveles normales o elevados de miR-122 y/o niveles de expresión normales o menores de miR-296-5p, en comparación con el control, se beneficiará de la terapia con IFN.

40

45 Un método para influenciar la respuesta de un sujeto que tiene una infección viral del hígado a la terapia antiviral que incluye la estimulación de la actividad de Interferón (IFN), el método que comprende modular los niveles de un miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p.

50 Los niveles del miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p podrían regularse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Ejemplos de tales métodos se pueden encontrar en, por ejemplo, WO-A-2006/137941, WO-A-2007/021896 o WO-A-2007/090073.

Por "terapia antiviral" queremos decir cualquier régimen de tratamiento para reducir la infección viral que involucra la estimulación de la actividad de IFN. Tal régimen puede involucrar el uso de compuestos que estimulan la actividad de IFN tipo I y/o inducen genes estimulados por IFN (ISGs). La terapia puede involucrar el

tratamiento con IFN per se u otros agonistas de receptor de IFN. Por ejemplo, la terapia puede utilizar IFNα pegilada (pegIFNα).

5 La terapia puede involucrar sólo la estimulación de la actividad de IFN. Sin embargo, los inventores han encontrado que el método de acuerdo con la invención es particularmente útil para predecir la efectividad de una terapia antiviral que comprende el uso de una terapia en combinación que comprende un estimulador de la actividad de IFN en conjunto con un agente antiviral conocido. En la técnica se conocen muchos agentes antivirales y el método de la invención se puede usar para evaluar la efectividad de un número de diferentes terapias en combinación. Sin embargo, los inventores han encontrado que el método de la invención tiene un valor particular para predecir la efectividad de la terapia con un estimulador de la actividad de IFN usada junto con el agente antiviral ribavirin.

En una realización, el método de la invención se usa para predecir la utilidad de pegIFNα y ribavirin como una terapia antiviral.

15 El método de la invención puede ser utilizado para evaluar la efectividad de tratamientos para un número de infecciones virales diferentes, incluyendo infecciones con virus de hepatitis B y virus de hepatitis C. En una realización, el método se utiliza para evaluar la efectividad de terapias para infección con virus de hepatitis C (HCV). Los inventores han encontrado que el método de la invención es particularmente útil para distinguir entre sujetos que se espera que tengan una respuesta virológica rápida (RVR) y aquellos que no la tendrán (no-RVR).

20 Muestras representativas de los niveles de miR-122 en un sujeto que pueden usarse, de acuerdo con la presente invención, abarcan cualquier muestra que pueda proporcionar información para dichos niveles de miR-122 en el sujeto.

Ejemplos de muestras adecuadas incluyen biopsias, muestras extirpadas durante procedimientos quirúrgicos, muestras de sangre, muestras de orina, muestras de esputo, muestras de fluido cerebroespinal y muestras de hisopo (tales como muestras de hisopo con saliva). Se apreciará que la fuente de la muestra dependerá de qué tipo de infección viral puede tener el sujeto.

25 En una realización, las muestras son de tejido del hígado. Se ha encontrado que las muestras de hígado son particularmente instructivas cuando el método se aplica para evaluar sujetos con infección de HCV. Los inventores se sorprendieron al encontrar que la RVR podría distinguirse de sujetos con no-RVR mediante el análisis de niveles de miR-122.

30 Las muestras adecuadas pueden incluir secciones de tejidos tales como secciones histológicas o congeladas. Los métodos mediante los cuales se pueden preparar tales secciones de manera que sean capaces de proporcionar información representativa de los niveles de expresión de miARN, por ejemplo miR-122 o miR296-5p, en el sujeto de quien se deriva la sección son bien conocidos por aquellos de pericia en la técnica, y deben seleccionarse con referencia a la técnica que se pretende usar cuando se investiga la expresión de genes.

35 Aunque se contempla el uso de muestras que comprenden una porción de tejido del sujeto, generalmente puede ser preferible que la muestra, representativa de los niveles del miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, comprenda un extracto adecuado tomada de tal tejido, dicho extracto que se puede investigar para proporcionar información con respecto a dichos niveles de dicho miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, en el sujeto. Se pueden usar protocolos adecuados para la producción de extractos de tejidos capaces de proporcionar información con respecto a la expresión de genes en un sujeto que son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los protocolos preferidos pueden seleccionarse con referencia a la manera en la cual se va a investigar la expresión de genes.

40 Aunque se contempla el uso de muestras que comprenden una porción de tejido del sujeto, en general se puede preferir que la muestra representativa de los niveles del ARNm, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, comprenda un extracto adecuado de tal tejido, siendo capaz dicho extracto de proveer información concerniente a dichos niveles de dicho ARNm, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, en el sujeto. Los protocolos adecuados que pueden ser usados pueden ser usados para la producción de extractos de tejidos capaces de proveer información concerniente a la expresión genética en un sujeto, serán bien conocidos por los expertos en la técnica. Los protocolos preferidos pueden ser seleccionados con referencia a la forma en la cual se va a investigar la expresión genética.

50 En el caso de muestras derivadas de pasos adecuados de preparación de hígado se describen en el Ejemplo.

Por "muestra de control" queremos decir una muestra equivalente a aquella del sujeto que ha sido derivada de un individuo que no padece de una infección viral del hígado. Aunque se pueden usar muestras equivalentes de tejidos u órganos que constituyen muestras de control, o extractos de tales muestras, directamente como la

fuente de información con respecto a los niveles de miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, en la muestra de control, se apreciará, y generalmente se preferirá, que la información con respecto a la expresión de los niveles de miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, en una muestra de control "ideal" se proporcione en la forma de datos de referencia. Tales datos de referencia se pueden proporcionar en la forma de tablas indicativas de los niveles de miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, en el tejido de control seleccionado. Alternativamente, los datos de referencia pueden suministrarse en la forma de software de computadora que contiene información recuperable indicativa de los niveles de miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, en el tejido de control seleccionado. Los datos de referencia pueden ser proporcionados, por ejemplo, en la forma de un algoritmo que permite la comparación de la expresión de por lo menos los niveles de miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, en el sujeto con la expresión de este miARN en la muestra de tejido de control.

En el caso de que los niveles de miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, en una muestra de control se va a investigar vía el procesamiento de una muestra de tejido u órgano que constituye la muestra de control, es beneficioso que tal procesamiento se conduzca usando el mismo método usado para procesar la muestra del sujeto. Tal procesamiento en paralelo de muestras del sujeto y muestras de control permite un mayor grado de confianza de manera que las comparaciones de la expresión de genes en estos tejidos serán normalizadas una con relación a otra (puesto que cualesquiera artefactos asociados con el método seleccionado mediante el cual se procesa el tejido y la expresión de genes investigada será aplicada a ambas muestras del sujeto y de control).

El método de acuerdo con la invención puede involucrar el análisis de por lo menos los niveles de miR-122. El hallazgo de que los niveles alterados de miR-122 pueden usarse en la determinación de la efectividad de una terapia antiviral es sorprendente. En vista de los resultados publicados en la técnica anterior, fue totalmente inesperado que los niveles menores de miR-122 estarían asociados con la respuesta deficiente al tratamiento subsiguiente con IFN.

En estudios previos, los inventores han identificado diferentes genes, cuyos niveles de expresión pueden ser marcadores de pronóstico para el resultado de la terapia antiviral. La presente invención que se refiere a miR-122 puede ser combinada con dichos genes con el fin de proporcionar una predicción aun más robusta.

La presencia, ausencia y/o niveles de miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, que puede ser investigada será generalmente detectada usando moléculas sonda adecuadas. Tal detección proporcionará información en cuanto a la presencia, ausencia y/o niveles de miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, y así permite la comparación entre los niveles de miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, que ocurren en el sujeto y aquellos que ocurren en la muestra de control. Las sondas serán capaces generalmente de enlazarse específicamente al miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, directa o indirectamente. El enlazamiento de tales sondas puede ser evaluada y correlacionada después con los niveles de miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, para permitir una comparación de pronóstico efectiva entre el sujeto y el control.

Por "expresión alterada" incluimos donde la expresión de genes es tanto elevada como reducida en la muestra cuando se compara con el control, como se discute antes.

Inversamente, por "expresión inalterada" incluimos donde la expresión de genes no es elevada o reducida en la muestra cuando se compara con el control, como se discute antes.

Una evaluación de los niveles de un miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, y de si una expresión de genes está alterada o inalterada puede usarse usando métodos de rutina de análisis estadístico.

La molécula objetivo puede ser un péptido o un polipéptido. La cantidad de péptido o polipéptido se puede determinar usando una molécula de enlazamiento específica, por ejemplo un anticuerpo. En una instancia preferida, la cantidad de ciertas proteínas objetivo presentes en una muestra pueden ser evaluadas con referencia a la actividad biológica de la proteína objetivo en la muestra. La evaluación y la comparación de la expresión de esta manera son particularmente adecuadas en el caso de proteínas objetivos que tienen actividad de enzima. Las técnicas adecuadas para la medición de la cantidad de una proteína objetivo presente en una muestra incluyen, pero no están limitadas a, aptámeros y técnicas basadas en anticuerpos, tales como radioinmunoensayos (RIAs), inmunoensayos vinculados a enzimas (ELISAs), y manchado Western.

Se entenderá que "ácidos nucleicos" o "moléculas de ácidos nucleicos", para el propósito de la presente invención, se refiere a polímeros de deoxiribonucleótido o ribonucleótido en cualquier forma, de hebra sencilla o doble. Además, a menos que el contexto requiera otra cosa, estos términos deben tomarse para abarcar análogos conocidos de nucleótidos naturales que pueden funcionar de una manera similar a los nucleótidos que ocurren naturalmente.

Además se entenderá que los ácidos nucleicos objetivo adecuados para uso de acuerdo con la invención no necesitan comprender ácidos nucleicos de "longitud total" (por ejemplo, transcritos de genes de longitud total),

sino que necesitan simplemente comprender una longitud suficiente para permitir la enlazamiento específica de moléculas de sonda.

5 En una realización de la invención, se pueden tratar muestras para aislar moléculas objetivo de ARN mediante un proceso de lisado de células tomadas de una muestra adecuada (lo cual se puede lograr usando un regulador de lisis comercialmente disponible como ese producido por Qiagen Ltd.) seguido por centrifugación del lisado usando una columna de separación de ácidos nucleicos comercialmente disponible (tal como columna midi spin RNeasy producida por Qiagen Ltd.). Otros métodos para extracción de ARN incluyen variaciones en el método de fenol e isocianato de guanidina de Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987) Analytical Biochemistry 162, 156. "Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction". El ARN 10 obtenido de esta manera puede constituir una molécula objetivo por si misma adecuada, o puede servir como una plantilla para la producción de moléculas objetivo representativas de los niveles de miR-122.

15 En el caso de evaluar la expresión de genes seleccionados con el fin de tener un valor de predicción más robusto, puede ser preferible que el ARN derivado de un sujeto o muestra de control se pueda usar como sustrato para síntesis de cADN, por ejemplo usando el Superscript System (Invitrogen Corp.). El cADN resultante puede ser convertido entonces a cARN bioestañado usando el Paquete de etiquetación BioArray RNA Transcript (Enzo Life Sciences Inc.) y este cARN purificado a partir de la mezcla de reacción usando un mini paquete RNeasy (Qiagen Ltd.). El mARN, representativo de expresión de genes, puede medirse directamente en un tejido derivado de un sujeto o muestra de control, sin la necesidad de extracción o purificación de mARN. Por 20 ejemplo, el mARN presente en, y representativo de expresión de genes en, un sujeto o muestra de control de interés puede ser investigado usando secciones o biopsias fijadas apropiadamente de tal tejido. El uso de muestras de este tipo puede proporcionar beneficios en términos de la rapidez con la cual se pueden hacer las comparaciones de expresión, así como también el procesamiento de tejidos relativamente económico y simple que se puede usar para producir la muestra. Las técnicas de hibridación in situ representan los métodos preferidos mediante los cuales se puede investigar y comparar la expresión de genes en muestras de tejido de 25 este tipo. Las técnicas para el procesamiento de tejidos de interés que mantienen la disponibilidad de ARN representativo de la expresión de genes en el sujeto o muestra de control son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Sin embargo, las técnicas mediante las cuales se puede extraer y recolectar mARNs representativos de expresión de genes en un sujeto o muestra de control también son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica, y los inventores han encontrado que tales técnicas pueden emplearse ventajosamente de acuerdo con la presente invención. Las muestras que comprenden mARN extraído de un 30 sujeto o muestra de control pueden ser preferidas para uso en el método del tercer aspecto de la invención, puesto que tales extractos tienden a ser investigados más rápidamente de lo que es el caso para muestras que comprenden los tejidos originales. Por ejemplo, las moléculas objetivo adecuadas que permiten la comparación de la expresión de genes pueden comprender el ARN total aislado de una muestra de tejido del sujeto, o una muestra de tejido de control. Además, el ARN extraído puede ser amplificado rápidamente para producir una muestra de mARN agrandada capaz de producir información incrementada de expresión de genes en el sujeto o la muestra de control. Los ejemplos adecuados de técnicas para la extracción y amplificación de poblaciones de mARN son bien conocidos y están consideradas en mayor detalle más adelante.

40 A manera de ejemplo, los métodos de aislamiento y purificación de ácidos nucleicos objetivos adecuados para uso de acuerdo con la invención se describen en detalle en el Capítulo 3 de Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, P. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

45 En el caso de que se desee amplificar el ácido nucleico objetivo antes de la investigación y comparación de expresión de genes puede ser preferible a usar un método que mantiene o controla las frecuencias relativas de los ácidos nucleicos amplificados en el sujeto o tejido de control a partir del cual se deriva la muestra.

Los métodos adecuados de amplificación "cuantitativa" son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Un ejemplo bien conocido, PCR cuantitativo, involucra co-amplificar simultáneamente una secuencia de control cuyas cantidades son conocidas por permanecer sin cambio entre muestras de control y del sujeto. Esto proporciona una norma interna que puede ser usada para calibrar la reacción de PCR.

50 Además del método delineado antes, la persona experta apreciará que también puede ser adecuada para cuantificación cualquier tecnología que acople la amplificación de producto específico de transcripto de gen a la generación de una señal. Un ejemplo preferido emplea mejorías convenientes a la reacción en cadena de polimerasa (US 4683195 y 4683202) que se han vuelto adecuadas para la cuantificación exacta de transcriptos específicos de mARN mediante la incorporación de una transcripción inversa inicial de mARN a cADN. Mejorías clave adicionales permiten la medición de productos de PCR de acumulación en tiempo real a medida que 55 progresa la reacción.

En muchos casos puede ser preferible evaluar el grado de expresión de genes en el sujeto o muestras de control

usando moléculas sonda capaces de indicar la presencia de moléculas objetivo en la muestra relevante.

Las sondas se pueden seleccionar con referencia al producto (directo o indirecto) de expresión de genes a ser investigada. Ejemplos de sondas adecuadas incluyen sondas de oligonucleótido, anticuerpos, aptámeros y proteínas de enlazamiento o moléculas pequeñas que tienen especificidad adecuada.

5 Se pueden usar sondas de oligonucleótidos como sondas. La generación de sondas de oligonucleótidos adecuadas es bien conocida por aquellos expertos en la técnica (Oligonucleotide synthesis: Methods and Applications, Piet Herdewijn (ed) Humana Press (2004)). El oligonucleótido y los oligonucleótidos modificados están disponibles comercialmente de numerosas compañías.

10 Para los propósitos de la presente descripción, se puede tomar una sonda de oligonucleótidos que comprenda un oligonucleótido capaz de hibridar específicamente a una molécula de ácido nucleico objetivo de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos. Tal enlazamiento ocurre usualmente a través de apareamiento de base complementario y usualmente a través de formación de enlaces de hidrógeno. Las sondas de oligonucleótidos adecuadas pueden incluir bases naturales (es decir, A, G, C o T) o modificadas (7-deazaguanosina, inosina, etc.). Además, se puede usar un enlace diferente a enlace de fosfodiéster para unir las bases en la(s) sonda(s) de oligonucleótidos, tanto que esta variación no interfiera con la hibridación de la sonda de oligonucleótidos hacia su objetivo. Así, las sondas de oligonucleótidos adecuadas pueden ser ácidos péptido nucleicos en los cuales las bases constituyentes están unidas por enlaces de péptido en lugar de enlaces de fosfodiéster.

20 Como se explica en la presente, las moléculas de microARN ("miARNs") son generalmente de 21 a 22 nucleótidos de longitud, aunque se han reportado longitudes de 17 y hasta 25 nucleótidos. Los miARNs se procesan, cada uno, a partir de una molécula de ARN precursora más larga ("miARN precursor"). Los miARNs precursores son transcritos a partir de genes no codificadores de proteína. Los miARNs precursores tienen dos regiones de complementaridad que les permite formar una estructura similar a tallo-asa o doblez atrás, la cual es escindida mediante una enzima llamada Dicer en animales. Dicer es ribonucleasa III como nucleasa. El miARN procesado es típicamente una porción del vástago.

25 El miARN procesado (aludido también como "miARN maduro") se vuelve parte de un complejo grande para desregular un gen objetivo en particular. Ejemplos de miARNs de animales incluyen aquellos que hacen par de base de manera imperfecta con el objetivo, lo cual detiene la translación (Olsen et al, 1999; Seggerson et al, 2002). Las moléculas de miARN se procesan también mediante Dicer, pero a partir de una molécula larga de ARN de doble hebra. Los miARNs no se encuentran naturalmente en células de animales, pero pueden funcionar en tales células en un complejo silenciador ARN-inducido (RISC) para dirigir la escisión específica de secuencia de un mRNA objetivo (Denli et al., 2003).

30 El estudio de moléculas de miARN endógeno se describe, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de E.U. 60/575,743. Los miARNs sintéticos son aparentemente activos en la célula cuando el ARN maduro de hebra sencilla está unido mediante un complejo de proteínas que regula la translación de mARNs que hibridan al miARN. La introducción de moléculas de ARN exógeno que afectan a las células en la misma manera que los miARNs expresados de manera endógena requiere que una molécula de ARN de hebra sencilla de la misma secuencia que el miARN maduro endógeno sea tomado por el complejo de proteínas que facilita el control de traslación. Se ha evaluado una variedad de diseños de molécula de ARN. Se han identificado tres diseños generales que maximizan la toma del miARN de hebra sencilla deseado mediante la trayectoria de miARN. Una molécula de ARN con una secuencia de miARN que tiene por lo menos uno de los tres diseños se alude como miARN sintético.

35 Los miARNs sintéticos de la invención comprenden, en algunas realizaciones, dos moléculas de ARN en donde un ARN es idéntico a un miARN maduro, que ocurre naturalmente. La molécula de ARN que es idéntica a un miARN maduro se alude como la hebra activa. La segunda molécula de ARN, aludida como la hebra complementaria, es por lo menos parcialmente complementaria de la hebra activa. Las hebras activa y complementaria se hibridan para crear un ARN de doble hebra, llamado el ARN sintético, que es similar al miARN precursor que ocurre naturalmente que se une mediante el complejo de proteínas inmediatamente antes de la activación de miARN en la célula. Maximizar la actividad del miARN sintético requiere maximizar la toma de la hebra activa y minimizar la toma de la hebra complementaria mediante el complejo de proteínas de miARN que regula la expresión de genes en el nivel de traslación. Los diseños moleculares que proporcionan actividad óptima de miARN involucran modificaciones a la hebra complementaria.

40 Dos diseños incorporan modificaciones químicas en la hebra complementaria. La primera modificación involucra crear un ARN complementario con un grupo químico diferente a un fosfato o hidroxilo en su término 5'. La presencia de la modificación en 5' elimina aparentemente la toma de la hebra complementaria y subsiguientemente favorece la toma de la hebra activa mediante el complejo de proteínas de miARN. La

modificación en 5' puede ser cualquiera de una variedad de moléculas que incluyen NH₂, NHCOCH₃, biotina y otras.

La segunda estrategia de modificación química que reduce significativamente la toma de la hebra complementaria mediante la trayectoria de miARN es incorporar nucleótidos con modificaciones de azúcar en los primeros 2 a 6 nucleótidos de la hebra complementaria. Se debe notar que las modificaciones al azúcar consistentes con la segunda estrategia de diseño pueden acoplarse con modificaciones terminales en 5' consistentes con la primera estrategia de diseño para aumentar adicionalmente las actividades del miARN sintético.

Un tercer diseño de miARN sintético involucra incorporar nucleótidos en el extremo 3' de la hebra complementaria que no son complementarios a la hebra activa.

Los híbridos de los ARNs activo y complementario resultantes son muy estables en el extremo 3' de la hebra activa, pero relativamente inestables en el extremo 5' de la hebra activa. Estudios con siARNs indican que la estabilidad del híbrido 5' es un indicador clave de toma de ARN mediante el complejo de proteínas que soporta la interferencia de ARN, que está por lo menos relacionado con la trayectoria de miARN en las células. El uso juicioso de disparidades en la hebra complementaria de ARN aumenta significativamente la actividad del miARN sintético.

Como se explica en la presente, el término "miARN" se refiere generalmente a una molécula de hebra sencilla, pero en realizaciones específicas, las moléculas implementadas en la invención abarcarán también una región o una hebra adicional que está parcialmente (entre 10 y 50% de longitud transversal complementaria de la hebra), sustancialmente (mayor que 50%, pero menor que 100% de longitud transversal complementaria de la hebra) o totalmente complementaria para otra región de la misma molécula de hebra sencilla o para otro ácido nucleico. Así, los ácidos nucleicos pueden abarcar una molécula que comprende una o más hebra(s) complementaria(s) o auto-complementaria(s) o "complemento(s)" de una secuencia particular que comprende una molécula. Por ejemplo, el miARN precursor puede tener una región auto-complementaria, la cual es hasta 100% complementaria.

Los miARNs sintéticos comprenden típicamente dos hebras, una hebra activa que es idéntica en secuencia al miARN maduro que está siendo estudiado y una hebra complementaria que es por lo menos parcialmente complementaria de la hebra activa. La hebra activa es la molécula biológicamente relevante y debe ser tomada de preferencia por el complejo en células que modulan la translación ya sea a través de la degradación de mRNA o control translacional. La toma preferencial de la hebra activa tiene dos resultados profundos: (1) la actividad observada del miARN sintético aumenta dramáticamente; y (2) efectos no intencionados inducidos por la toma y la activación de la hebra complementaria son esencialmente eliminados. De acuerdo con la invención, se pueden usar varios diseños de miARN sintético para asegurar la toma preferencial de la hebra activa.

La introducción de una porción estable diferente de fosfato o hidroxilo en el extremo 5' de la hebra complementaria afecta su actividad en la trayectoria de miARN. Esto asegura que solamente la hebra activa del miARN sintético será usada para regular la translación en la célula. Las modificaciones en 5' incluyen, pero no están limitadas a, NH₂, biotina, un grupo amina, un grupo alquilamina inferior, un grupo acetilo, 2 O-me, DMTO, fluoresceína, un tiol o acridina o cualquier otro grupo con este tipo de funcionalidad.

Otras modificaciones de hebra de sentido. La introducción de modificaciones de nucleótido como 2'-Ome, NH₂, biotina, un grupo amina, un grupo alquilamina inferior, un grupo acetilo, DMTO, fluoresceína, un tiol, o acridina o cualquier otro grupo con este tipo de funcionalidad en la hebra complementaria del miARN sintético puede eliminar la actividad de la hebra complementaria y aumenta la toma de la hebra activa del miARN.

Como sucede con los siARNs (Schwarz 2003), la estabilidad relativa de los extremos 5' y 3' de la hebra activa del miARN sintético determina aparentemente la toma y la activación de la activa mediante la trayectoria de miARN. La desestabilización del extremo 5' de la hebra activa del miARN sintético mediante la colocación estratégica de disparidades de base en el extremo 3' de la hebra complementaria del miARN sintético aumenta la actividad de la hebra activa y elimina esencialmente la actividad de la hebra complementaria.

El miR-122, llamado también miARN-1222, un microARN de 22 nucleótidos, se deriva de un ARN poliadenilado no codificante específico de hígado transcrito del gen her. La secuencia exacta de miR-122 así como también la estructura adyacente secundaria dentro del her mRNA se conservan a partir de especies de mamíferos hacia atrás a los peces. Los niveles de miR-122 en el hígado de ratón aumenta hasta un medio de los valores máximos alrededor del día 17 de la embriogénesis, y alcanza niveles cercanos al máximo de 50,000 copias por célula promedio antes del nacimiento (hasta 70% de todo el miARN) (Chang et al., 2004; Lagos-Quintana et al., 2002). Es uno de muchos microARNs específicos de tejido que se piensa que es importante para establecer patrones de expresión de genes que pueden ser responsables del mantenimiento del estado diferenciado de un

tejido (Lagos-Quintana et al., 2002; Lim et al., 2005).

La expresión “hibridar específicamente a” como se usa en la presente se refiere al enlazamiento, formación en dúplex o hibridación de una sonda de oligonucleótidos de preferencia con una secuencia de nucleótidos objetivo en particular bajo condiciones restrictivas cuando esa frecuencia está presente en una mezcla de complejos (tal como ADN o ARN celular total). En una realización, una sonda puede enlazar, formar en dúplex o hibridar solamente a la molécula objetivo en particular.

El término “condiciones restrictivas” se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda hibridará a su subsecuencia objetivo, pero mínimamente a otras secuencias. En algunas realizaciones, una sonda puede hibridar a ningunas secuencias diferentes de su objetivo bajo condiciones restrictivas. Las condiciones restrictivas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas.

En general, las condiciones restrictivas se pueden seleccionar para ser aproximadamente 5°C más bajas que el punto térmico de fusión (T_m) para la secuencia específica a una resistencia iónica y pH definidos. El T_m es la temperatura (bajo resistencia iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) a la cual 50% de las sondas de oligonucleótidos complementarias para un ácido nucleico objetivo hibrida al ácido nucleico objetivo en equilibrio. Como los ácidos nucleicos objetivo estarán presentes generalmente en exceso, a T_m, 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio. A manera de ejemplo, las condiciones restrictivas serán aquellas en las cuales la concentración de sal es por lo menos de aproximadamente 0.01 a 1.0 M de concentración de iones de Na⁺ (u otras sales) a pH de 7.0 a 8.3 y la temperatura es por lo menos de aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos). Las condiciones restrictivas pueden lograrse también con la adición de agentes desestabilizadores tal como formamida.

Se pueden usar sondas de oligonucleótidos para detectar secuencias complementarias de ácidos nucleicos (es decir, ácidos nucleicos objetivos) en una muestra representativa adecuada. Tales formas enlazantes complementarias forman la base de la mayoría de las técnicas en las cuales se pueden usar oligonucleótidos para detectar, y por lo tanto permitir la comparación de, la expresión de genes particulares. Algunas tecnologías adecuadas permiten la cuantificación paralela de la expresión de genes múltiples e incluyen tecnologías donde la amplificación y cuantificación de especies se acoplan en tiempo real, tales como las tecnologías de transcripción cuantitativa inversa PCR y tecnologías donde la cuantificación de especies amplificadas ocurre subsiguientemente a la amplificación, tales como tecnologías de arreglo.

Las tecnologías de arreglo involucran la hibridación de muestras, representativas del sujeto o muestra de control, con una pluralidad de sondas de oligonucleótidos en donde cada sonda hibrida de preferencia con un gen o genes descritos, o miARN. Las tecnologías de arreglo proporcionan la identificación única de secuencias de oligonucleótidos específicos, por ejemplo mediante su posición física (por ejemplo, una rejilla en un arreglo de dos dimensiones como se proporciona comercialmente por Affymetrix, Inc.) o mediante asociación con otra característica (por ejemplo, perlas etiquetadas como se proporcionan comercialmente por Illumina Inc. o Luminex Inc.). Los arreglos de oligonucleótidos pueden sintetizarse in situ (por ejemplo, mediante síntesis ligera directa como se proporciona comercialmente por Affymetrix Inc.) o preformados y graficados por tecnología de contacto o inyección de tinta (como se proporciona comercialmente por Agilent o Applied Biosystems). Será evidente para aquellos expertos en la técnica, que las secuencias de ADN totales o parciales pueden servir también como sondas para tecnología de arreglo (como se proporcionan por Clontech).

Se pueden usar sondas de oligonucleótidos en técnicas blotting, tales como tales como southern blotting o northern blotting, para detectar y comparar expresión de genes (por ejemplo, por medio de moléculas de cADN o mRNA objetivo representativas de expresión de genes). Técnicas y reactivos adecuados para uso en técnicas southern o northern blotting son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Brevemente, muestras que comprenden moléculas objetivo de ADN (en el caso de southern blotting) o ARN (en el caso de northern blotting) se separan de acuerdo con su habilidad de penetrar un gel de un material tal como acrilamida o agarosa. La penetración del gel puede ser impulsada por acción capilar o por la actividad de un campo eléctrico. Una vez que se ha logrado la separación de las moléculas objetivo estas moléculas son transferidas a una membrana delgada (típicamente nylon o nitrocelulosa) antes de ser inmovilizadas en la membrana (por ejemplo mediante horneado o radiación ultravioleta). Entonces se puede detectar la expresión de genes y comparar por hibridación de sondas de oligonucleótidos con las moléculas objetivo unidas a la membrana.

En ciertas circunstancias, el uso de protocolos tradicionales de hibridación para comparar la expresión de genes puede ser problemático. Por ejemplo, las técnicas blotting pueden tener dificultad para distinguir entre dos o más productos de genes o miARNs de aproximadamente el mismo peso molecular puesto que tales productos dimensionados de manera similar son difíciles de separar usando geles. En consecuencia, en tales circunstancias puede ser preferible comparar la expresión de genes usando técnicas alternativas, tales como aquellas descritas más adelante.

La expresión de genes en una muestra que representa la expresión de genes y/o los niveles de miARNs en un sujeto puede ser evaluada con referencia a niveles transcritos globales en muestras adecuadas de ácido nucleico por medio de tecnología de arreglo de oligonucleótidos de alta densidad. Tales tecnologías hacen uso de arreglos en los cuales se encadenan sondas de oligonucleótidos, por ejemplo mediante unión covalente, a un soporte sólido. Estos arreglos de sondas de oligonucleótidos inmovilizados en soportes sólidos representan los componentes preferidos para ser usados en los métodos y paquetes de la invención para la comparación de la expresión de genes. Números grandes de tales sondas pueden unirse de esta manera para proporcionar arreglos adecuados para la comparación de expresión de grandes números de genes o miARNs. En consecuencia, se reconocerá que tales arreglos de oligonucleótidos pueden ser particularmente preferibles en realizaciones donde se desea comparar la expresión de más de un miARN y/o un gen.

Otras metodologías adecuadas que pueden usarse en la comparación de objetivos de ácido nucleico representativos de la expresión de genes incluyen, pero no están limitadas a, amplificación con base en secuencia de ácido nucleico (NASBA); o amplificación de ADN de círculo rodante (RCA).

Normalmente es deseable etiquetar las sondas con el fin de que sean fácilmente detectadas. Ejemplos de porciones detectables que se pueden usar en la etiquetación de sondas u objetivos adecuados para uso de acuerdo con la invención incluyen cualquier composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, eléctricos, ópticos o químicos. Las porciones detectables adecuadas incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos y materiales colorimétricos. Estas porciones detectables son adecuadas para incorporar en todos los tipos de sondas u objetivos que pueden usarse en los métodos de la invención a menos que se indique lo contrario.

Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupo prostético incluyen estreptavidin/biotina y avidin/biotina; ejemplos de ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo, ficoeritrin, rojo texas, rodamina, proteína fluorescente verde y los similares; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferin y aequorin; ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H , ^{14}C o ^{32}P ; ejemplos de materiales colorimétricos adecuados incluyen perlas de vidrio o plástico coloidal dorado o coloreado (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

Los medios para detectar tales etiquetas son bien conocidos por la persona experta. Por ejemplo, las radioetiquetas pueden ser detectadas usando película fotográfica o contadores de destellos; los marcadores fluorescentes pueden ser detectados usando un fotodetector para detectar la luz emitida. Las etiquetas enzimáticas se detectan típicamente proporcionando la enzima con un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima en el sustrato y las etiquetas colorimétricas se detectan simplemente visualizando la etiqueta coloreada.

En una realización de la invención, se pueden escanear sondas u objetivos etiquetados de manera fluorescente y detectar la fluorescencia usando un escáner de láser confocal.

En el caso de sondas u objetivos de ácidos nucleicos etiquetados, la etiquetación adecuada puede tener lugar antes, durante o después de la hibridación. En una realización, las sondas o los objetivos de ácidos nucleicos se etiquetan antes de la hibridación. Las etiquetas fluorescentes son adecuadas también y, cuando se usan, la cuantificación de la hibridación de las sondas de ácido nucleico con sus objetivos de ácido nucleico se hace mediante la cuantificación de fluorescencia del ácido nucleico hibridado etiquetado de manera fluorescente. La cuantificación se puede hacer a partir de un reactivo etiquetado de manera fluorescente que une un hapteno incorporado al ácido nucleico.

En una realización de la invención, el análisis de hibridación se puede lograr usando software adecuado de análisis, tal como Microarray Analysis Suite (Affymetrix Inc.).

La cuantificación efectiva se puede lograr usando un microscopio de fluorescencia que puede estar equipado con una platina automatizada para permitir el escaneo automático del arreglo, y que puede estar equipado con un sistema de adquisición de datos para la medición automatizada, registro y procesamiento subsiguiente de la información de la intensidad de fluorescencia. Las disposiciones adecuadas de tal información son convencionales y bien conocidas por aquellos expertos en la técnica.

En una realización, los ácidos nucleicos hibridados son detectados mediante la detección de una o más porciones detectables unidas a los ácidos nucleicos. Las porciones detectables pueden ser incorporadas mediante cualquier número de medios bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Sin embargo, en una realización, tales porciones se incorporan simultáneamente durante un paso de amplificación en la preparación

- 5 de los ácidos nucleicos de muestra (sondas u objetivos). Así, por ejemplo, la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) usando cebadores o nucleótidos etiquetados con una porción detectable proporcionará un producto de amplificación etiquetado con dicha porción. En una realización alternativa, la amplificación de transcripción usando un nucleótido etiquetado de manera fluorescente (por ejemplo, UTP y/o CTP etiquetado con fluoresceína) incorpora de etiqueta en los ácidos nucleicos transcritos.
- 10 Alternativamente, se puede agregar una porción detectable adecuada directamente a la muestra de ácido nucleico original (por ejemplo, ARNm, poliA ARNm, ADNc, etc. del tejido de interés) o a un producto de la amplificación después de que se completa la amplificación del ácido nucleico original. Medios para pegar etiquetas tales como etiquetas fluorescentes a los ácidos nucleicos son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, translación de nick o etiquetado de extremo (por ejemplo, con un ARN etiquetado) mediante tratamiento del ácido nucleico con quinasa y unión subsiguiente (ligación) de un vinculador de ácido nucleico que une el ácido nucleico de muestra a una etiqueta (tal como un fluoróforo adecuado).
- 15 Aunque el método de la invención es más adecuado para uso en asociación con sujetos humanos se apreciará que puede usarse también en la determinación de un curso de tratamiento de infección viral en animales no humanos (por ejemplo, caballos, perros, ganado, camellos).
- 20 En estudios previos, los inventores establecieron que el sistema de IFN endógeno es activado constantemente en muchos pacientes infectados. Además, los inventores se sorprendieron al correlacionar pacientes con un sistema de IFN pre-activado con una respuesta deficiente a la terapia con IFN. Este hallazgo es contra-intuitivo, porque se podría esperar que un sistema inmune innato ayudaría a eliminar el virus durante la terapia con IFN α .
- 25 Los inventores analizaron la expresión de ISG en biopsias del hígado y concluyeron además que hay pacientes donde el HCV induce de manera sorprendente (no bloquea) el sistema de IFN endógeno, y hay pacientes donde el HCV no induce (quizá mediante la escisión de TRIF y/o Cardif) el sistema de IFN endógeno, pero que esta diferencia no tiene impacto en la habilidad del HCV para mantener una infección crónica.
- 30 En pacientes sin una pre-activación del sistema de IFN, los inventores encontraron que pegIFN α 2b indujo en 4 horas una regulación máxima robusta (sub-) de muchos ISGs en el hígado. De manera sorprendente, tales niveles de expresión elevada de ISG ya estaban presentes en las biopsias de pre-tratamiento de pacientes que más tarde no mostraron una respuesta virológica rápida en la semana 4.
- 35 Se encontró también que la pre-activación del sistema de IFN endógeno fue encontrada más frecuentemente en biopsias del hígado de pacientes infectados con HCV genotipo 1 (y 4) que con genotipo 2 o 3. Esto es intrigante, porque es bien sabido que las infecciones con genotipos 2 y 3 pueden curarse en más del 80% de los pacientes, en comparación con menos del 50% de los pacientes con genotipo 1. Los inventores encontraron que la frecuencia y grado de pre-activación del sistema de IFN endógeno que depende del genotipo de HCV proporcionan una explicación para la susceptibilidad diferente del tratamiento de genotipos de HCV.
- 40 Los inventores advirtieron que estos datos establecen que el HCV interfiere con la señalización de IFN y por lo tanto reduce la respuesta a la terapia. Además, una inhibición de la señalización de IFN α mediante HCV explica por qué la pre-activación fuerte del sistema de IFN endógeno no conduce a una eliminación espontánea de HCV. Los inventores no desean estar limitados por alguna hipótesis, pero se cree que esto significa que el IFN α no induciría un estado antiviral en los hepatocitos que están infectados con HCV. La regulación por incremento (up-regulation) de ISGs observada en el hígado de muchos pacientes ocurriría entonces solamente en los hepatocitos no infectados. La inducción fuerte de ISGs encontrados en biopsias del hígado es compatible con tal modelo, porque hay más hepatocitos no infectados que infectados. La producción de IFN β ocurriría en los hepatocitos infectados con un virus que no es exitoso en la escisión de Cardif y/o TRIF. Debido a la inhibición inducida de HCV de la trayectoria Jak-STAT, el IFN β secretado no induciría un estado antiviral en estos hepatocitos infectados, sino solamente en células vecinas no-infectadas.
- 45 Por "reduce" queremos decir ese agente es efectivo para reducir la estimulación de ISGs de manera que los niveles de expresión de ISGs no son significativamente diferentes a los niveles de expresión en tejidos de control.
- Los agentes pueden ser usados en el tratamiento de un número de diferentes infecciones virales del hígado, incluyendo virus de hepatitis B, y virus de hepatitis C. En una realización, los agentes se usan para prevenir o reducir la infección con virus de hepatitis C (HCV).
- 50 Ejemplos de agentes que pueden usarse de acuerdo con la invención incluyen cuando el agente puede enlazar al polipéptido de IFN α y prevenir la actividad funcional de IFN, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos y derivados del mismo (por ejemplo, anticuerpos de dominio o Fabs). Alternativamente, el agente puede actuar como un inhibidor competente para el sistema de IFN actuando como un antagonista en receptores de IFN α (por ejemplo, IFNAR1, IFNAR2a, b o c). Alternativamente, el agente puede inhibir enzimas u otras moléculas en la trayectoria

- de IFN. Alternativamente, el agente puede enlazar a mRNA que codifica polipéptido de IFN α de tal manera para conducir a una reducción de ese mRNA y por ende una reducción de polipéptido de IFN α . Alternativamente, el agente puede enlazar a una secuencia que codifica IFN α de tal manera que conduce a una reducción en la cantidad de mRNA transcrito que codifica polipéptido de IFN α . Por ejemplo, el agente puede enlazar a regiones codificantes o no codificantes del gen IFN α o a ADN 5' o 3' del IFN y reducir así la expresión de la proteína.
- 5
- Existe un número de diferentes secuencias de polipéptido de interferón α humano. Se ha determinado una secuencia de consenso. Esta información se puede usar por la persona experta para desarrollar un agente de enlazamiento para el polipéptido IFN α .
- 10
- Cuando los agentes se enlazan a polipéptido de IFN α , se prefiere que el agente se aglutine a un epítipo definido por la proteína que se ha doblado correctamente a su forma nativa. Se apreciará que puede haber alguna variabilidad de secuencia entre especies y también entre genotipos. En consecuencia, otros epítipos preferidos comprenderán regiones equivalentes de variantes del gen. Las regiones equivalentes de polipéptidos de IFN adicionales pueden identificarse usando una similitud de secuencia y herramientas de identidad, y métodos de búsqueda de bases de datos, antes delineados.
- 15
- Se pueden producir anticuerpos como sueros policlonales mediante la inyección de antígeno en animales. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales pueden originarse mediante inoculación de un animal (por ejemplo, un conejo) con antígeno (por ejemplo, todo o un fragmento del polipéptido de IFN α) usando técnicas conocidas en la técnica.
- 20
- Alternativamente, al anticuerpo puede ser monoclonal. Se pueden usar técnicas convencionales de hibridoma para dar origen a tales anticuerpos. El antígeno usado para generar anticuerpos monoclonales para uso en la presente invención puede ser el mismo que el que se usaría para generar sueros policlonales.
- 25
- En su forma más simple, los anticuerpos o proteínas de inmunoglobulina son moléculas en forma de Y ejemplificadas usualmente por la clase de γ -inmunoglobulina (IgG) de anticuerpos. La molécula consiste de cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas (L) idénticas de aproximadamente 50 kD y 25 kD cada una respectivamente. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada (H-L) mediante enlaces de disulfuro y no covalentes. Dos combinaciones de cadenas H-L idénticas están vinculadas entre ellas mediante enlaces similares no covalentes y de disulfuro entre las dos cadenas H para formar la estructura básica de inmunoglobulina de cuatro cadenas (H-L)₂.
- 30
- Las inmunoglobulinas de cadena ligera se hacen de un dominio V (V_L) y un dominio constante (C_L) mientras que las cadenas pesadas consisten de un dominio V y, dependiendo del isotipo de cadena H, tres o cuatro dominios C (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} y C_{H4}).
- 35
- En la región N-terminal de cada cadena ligera o pesada es un dominio variable (V) que varía grandemente en secuencia, y es responsable de la unión específica al antígeno. La especificidad de anticuerpos para antígeno se determina realmente mediante secuencias de aminoácidos dentro de las regiones V conocidas como asas hipervariables o Regiones de Determinación Complementaria (CDRs). Cada región V de las cadenas H y L tiene 3 de tales CDRs y es la combinación de todas las 6 la que forma el sitio de enlazamiento del antígeno del anticuerpo. Los aminoácidos restantes de la región V que exhiben menos variación y que soportan los asas hipervariables se llaman regiones de marco (FRs).
- 40
- Las regiones más allá de los dominios de variable (dominios C) son de secuencia relativamente constante. Se apreciará que el aspecto característico de los anticuerpos de acuerdo con la invención son los dominios V_H y V_L. Se apreciará además que la naturaleza precisa de los dominios C_H y C_L no es, en su totalidad, crítica para la invención. De hecho, los anticuerpos preferidos para uso en la invención pueden tener dominios C_H y C_L muy diferentes. Además, como se discute más completamente más adelante, los derivados funcionales de anticuerpos preferidos pueden comprender dominios de Variable sin un dominio C (por ejemplo, anticuerpos scFV).
- 45
- 50
- Los anticuerpos, y particularmente mAbs, generados en una especie son conocidos por tener varias desventajas serias cuando se usan para tratar una especie diferente. Por ejemplo, cuando se usan anticuerpos murínicos en seres humanos, tienden a tener una vida media circulante corta en suero y se pueden reconocer como proteínas extrañas mediante el sistema inmune de un paciente que se trata. Esto puede conducir al desarrollo de una respuesta indeseable de anticuerpo anti-ratón (HAMA) de humano. Esto es particularmente problemático cuando se requiere la administración frecuente de un anticuerpo ya que puede aumentar su despeje, bloquear su efecto terapéutico e inducir reacciones de hipersensibilidad. Estos factores limitan el uso de anticuerpos monoclonales de ratón en terapia para humanos y han acelerado el desarrollo de la tecnología de ingeniería de anticuerpos para generar anticuerpos humanizados.

Por lo tanto, cuando el anticuerpo capaz de reducir la actividad de IFN se va a usar como un agente terapéutico para tratar infecciones de HCV en un sujeto humano, entonces se prefiere que los anticuerpos y fragmentos de los mismos de una fuente no humana sean humanizados.

5 La humanización se puede lograr dividiendo las secuencias de la región V (por ejemplo, de un anticuerpo monoclonal generado en un hibridoma no humano) con secuencias de la región C (e idealmente FRs de la región V) de anticuerpos humanos. Los anticuerpos 'manipulados' resultantes son menos inmunogénicos en humanos que los anticuerpos no humanos a partir de los cuales se derivaron y así son mejor adecuados para uso clínico.

10 Los anticuerpos humanizados pueden ser anticuerpos monoclonales quiméricos, en los cuales, usando la tecnología de ADN recombinante, se reemplazan las regiones constantes de inmunoglobulina de roedor por las regiones constantes de anticuerpos humanos. Los genes quiméricos de la cadena H y la cadena L pueden ser clonados entonces en vectores de expresión que contienen elementos reguladores adecuados e inducidos en células de mamífero con el fin de producir anticuerpos completamente glicosilados. Mediante la selección de un gen humano de región C de cadena H apropiado para este proceso, se puede predeterminedir la actividad biológica del anticuerpo. Tales moléculas quiméricas pueden usarse para tratar o prevenir el cáncer de acuerdo con la presente invención.

15 La humanización adicional de anticuerpos puede involucrar el injerto CDR o preformado de anticuerpos. Tales anticuerpos son producidos mediante el trasplante de CDRs de cadena pesada y ligera de un anticuerpo no humano (que forma el sitio de unión del antígeno del anticuerpo) en las regiones de marco correspondientes de un anticuerpo humano.

20 Los fragmentos de anticuerpos humanizados representan agentes preferidos para uso de acuerdo con la invención. FAbs de humano que reconocen un epítopo en polipéptido de IFN α o un receptor de IFN pueden identificarse a través de clasificación de una biblioteca de fagos de anticuerpos humanos de cadena variable. Las técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, las desarrolladas por Morphosys o Cambridge Antibody Technology) pueden ser empleadas para generar Fabs que pueden usarse como agentes de acuerdo con la invención. Brevemente, se puede generar una biblioteca de anticuerpos Fab combinatorios humanos mediante la transferencia de regiones variables de cadena pesada y ligera de una biblioteca de cadena sencilla Fv en un vector de despliegue de Fab. Esta biblioteca puede dar 2.1×10^{10} fragmentos de anticuerpo diferentes. El péptido puede usarse entonces como cebo para identificar fragmentos de anticuerpo de la biblioteca que tiene las propiedades deseadas de enlazamiento.

25 30 Los anticuerpos de dominio (dAbs) representan otro agente preferido que puede usarse de acuerdo con esta realización de la invención. Los dAbs son la unidad más pequeña de enlazamiento funcional de anticuerpos y corresponden a las regiones variables de las cadenas ya sean pesadas o ligeras de anticuerpos humanos. Tales dAbs pueden tener un peso molecular de alrededor de 13 kDa (que corresponde aproximadamente a 1/10 (o menos) del tamaño de un anticuerpo completo).

35 40 45 Los aptámeros representan otro agente preferido del tercer o cuarto aspecto de la invención. Los aptámeros son moléculas de ácidos nucleicos que asumen una forma específica, dependiente de la secuencia y se unen a ligandos específicos objetivos con base en un ajuste de cerradura y llave entre el aptámero y el ligando. Típicamente, los aptámeros pueden comprender moléculas de ADN de hebra sencilla o doble (ssADN o dsADN) o moléculas de ARN de cadena sencilla (ssARN). Los aptámeros pueden usarse para unir objetivos de ácido nucleico y de ácido no nucleico. En consecuencia, los aptámeros pueden ser generados para reconocer y así reducir la actividad de la expresión de IFN α . Se pueden seleccionar aptámeros adecuados a partir de fuentes de secuencias aleatorias, de las cuales se pueden identificar aptámeros específicos que se unen a las moléculas objetivo seleccionadas con alta afinidad. Los métodos para la producción y selección de aptámeros que tienen especificidad deseada son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, e incluyen el proceso SELEX (evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial). Brevemente, se producen grandes bibliotecas de oligonucleótidos, que permiten el aislamiento de grandes cantidades de ácidos nucleicos funcionales mediante un proceso repetitivo de selección in vitro y amplificación subsiguiente mediante la reacción en cadena de polimerasa.

50 55 Las moléculas antisentido presentan otro agente preferido para uso en el tratamiento de pacientes. Las moléculas antisentido son típicamente ácidos nucleicos de hebra sencilla, que pueden unirse específicamente a una secuencia de ácido nucleico complementario producida por un gen y que lo inactiva, efectivamente "apagando" ese gen. La molécula se denomina "antisentido" ya que es complementaria al mRNA del gen, que se denomina secuencia "sentido", como se aprecia por la persona experta. Las moléculas antisentido son típicamente de 15 a 35 bases de longitud de ADN y ARN o un análogo químico. Los ácidos nucleicos antisentido se han usado experimentalmente para unir a mRNA y evitar la expresión de genes específicos. Esto ha conducido al desarrollo de "terapias antisentido" como fármacos para el tratamiento del cáncer, diabetes y enfermedades inflamatorias. Los fármacos antisentido han sido aprobados recientemente por la FDA de EU para

uso terapéutico humano. En consecuencia, mediante el diseño de una molécula antisentido para polipéptido de IFN que codifica una secuencia de polinucleótidos sería posible reducir la expresión del polipéptido de IFN en una célula y por lo tanto reducir la actividad de IFN α y reducir la pre-activación vista en infecciones con HCV. En la Figura 8 se proporciona una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido de IFN α .

5 ARN interferente pequeño (siARN), conocido algunas veces como ARN interferente corto o ARN silenciador, representa agentes adicionales preferidos para uso de acuerdo con el tercer o el cuarto aspectos de la invención. Como se expone antes, los inventores se dieron cuenta de que la pre-activación del sistema de IFN está asociada con una resistencia a la terapia antiviral. Es aparente, por lo tanto, que las moléculas de siARN que pueden reducir la expresión de IFN α tienen gran utilidad en la preparación de medicamentos para el tratamiento de infección con HCV. Los siARNs son una clase de moléculas de ARN largo de 20 a 25 nucleótidos involucradas en la trayectoria de interferencia de ARN (ARNi), por lo cual el siARN puede conducir a una reducción en la expresión de un gen específico, o interferir específicamente con la traducción de tal mRNA inhibiendo así la expresión de proteína codificada por el mRNA. Los siARNs tienen una estructura bien definida: una hebra doble corta (generalmente 21 nt) de ARN (dsARN) con salientes en 3' de 2 nt en cualquier extremo. Cada hebra tiene un grupo fosfato en 5' y un grupo hidroxilo (-OH) en 3'. Esta estructura in vivo es el resultado del procesamiento mediante Dicer, una enzima que convierte dsARNs largos o ARNs de horquilla en siARNs. Los siARNs también pueden ser introducidos de manera exógena (artificialmente) en células mediante varios métodos de transfección para provocar la caída específica del gen de interés. Esencialmente cualquier gen del cual se conozca la secuencia puede entonces ser tomado por objetivo con base en la complementariedad de secuencia con un siARN hecho a la medida de manera apropiada. Dada la habilidad de derribar esencialmente cualquier gen de interés, ARNi vía siARNs ha generado un gran interés en biología tanto básica como aplicada. Hay un número creciente de clasificaciones de ARNi a gran escala que están diseñadas para identificar los genes importantes en varias trayectorias biológicas. Como los procesos de las enfermedades dependen también de la actividad de múltiples genes, se espera que en algunas situaciones apagando la actividad de un gen con un siARN se pueda producir un beneficio terapéutico. De ahí que su descubrimiento ha conducido a un brote de interés en aprovechar ARNi para investigación biomédica y desarrollo de fármacos. Los resultados recientes de la fase I de las pruebas terapéuticas con ARNi demuestran que los siARNs son bien tolerados y tienen propiedades farmacocinéticas adecuadas. Los métodos de inducción de siARNs y ARNi relacionados, por lo tanto, están listos para volverse una importante nueva clase de fármacos en el futuro inmediato. Las moléculas de siARN diseñadas para ácido nucleico que codifica polipéptido de IFN α se puede usar para reducir la expresión de IFN α y resulta, por lo tanto, en una reducción en la pre-activación del sistema de IFN. Por lo tanto, una realización de este aspecto de la invención es en donde el agente es una molécula de siARN que tiene secuencia complementaria para el polinucleótido de IFN α .

35 El uso de tal información está dentro, de manera sencilla y adecuada, de la capacidad de la persona experta diseñar moléculas de siARN que tienen secuencia complementaria al polinucleótido de IFN α . Por ejemplo, una simple búsqueda en internet da muchos sitios en la red que pueden usarse para diseñar moléculas de siARN.

Por "molécula de siARN" incluimos una molécula de ARN larga de 20 a 25 nucleótidos de doble hebra, así como también cada una de las dos hebras sencillas de ARN que hacen una molécula de siARN.

40 Por ejemplo, el siARN se usa en la forma de ARN de horquilla (shARN). Tal shARN puede comprender dos moléculas de siARN complementarias que están enlazadas mediante una secuencia espaciadora (por ejemplo, de aproximadamente 9 nucleótidos). Las moléculas de siARN complementarias pueden duplicarse de manera que pueden unirse conjuntamente.

Un ribozima capaz de escindir ARN o ADN que codifica un polipéptido de IFN α representa otro agente preferido del tercer o el cuarto aspecto de la invención.

45 Un "sujeto" puede ser un vertebrado, mamífero, animal doméstico o ser humano. Se prefiere que el sujeto a ser tratado sea humano. Cuando este es el caso, los agentes pueden diseñarse de manera que son los más adecuados para terapia humana (por ejemplo, humanización de anticuerpos según se discutió antes). Sin embargo, se apreciará también que los agentes se pueden usar también para tratar otros animales de interés veterinario (por ejemplo, caballos, camellos, ganado, perros o gatos).

50 Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se alude en la presente es cualquier vehículo conocido por aquellos expertos en la técnica útil en la formulación de composiciones farmacéuticas.

Los varios elementos requeridos para que un técnico realice el método del primer aspecto de la invención puede incorporarse en un paquete.

55 Así, de acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un paquete para determinar la probabilidad de que un sujeto que tiene una infección viral del hígado responderá a la terapia antiviral que incluye la estimulación

de la actividad del Interferón (IFN), que comprende:

(i) medios para analizar, en una muestra de un sujeto, los niveles de un miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p; y opcionalmente,

5 (ii) medios para comparar los niveles del miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, en la muestra con los niveles de dicho miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, en una muestra de control.

10 Por "medios para analizar, en una muestra de un sujeto, los niveles de un miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p" incluimos las moléculas específicas de unión que pueden apuntar a moléculas representativas de los niveles del miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, en la muestra. En algunas realizaciones, la molécula específica de unión es una sonda de oligonucleótidos, anticuerpo, aptámero o proteínas de unión o moléculas pequeñas antes mencionadas.

Por "medios para comparar los niveles del miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, en la muestra con los niveles de dicho miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p, en una muestra de control" incluimos las muestras de control antes mencionadas en el primer aspecto de la invención. Incluimos también los datos de referencia de control mencionados en la presente.

15 El paquete de la invención puede comprender también:

(iii) reguladores y reactivos relevantes para analizar el nivel de expresión del miARN, por ejemplo miR-122 o miR-296-5p.

20 Los reguladores y reactivos proporcionados con el paquete pueden estar en forma líquida y en algunas realizaciones proporcionarse como alícuotas pre-medidas. Alternativamente, los reguladores y los reactivos pueden estar en forma concentrada (o aun en forma de polvo) para dilución.

Todos los aspectos descritos en la presente (incluyendo cualesquiera reivindicaciones, resumen y dibujos) y/o todos los pasos de cualquier método o proceso así descritos pueden combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores en cualquier combinación, excepto combinaciones donde por lo menos algunos de tales aspectos y/o pasos son mutuamente excluyentes.

25 La invención será descrita ahora con referencia al siguiente Ejemplo y figuras en las cuales:

Figura 1 Expresión de miR-122 en hígados de pacientes con hepatitis C crónica (CHC).

30 (A) Los niveles de miR-122 son significativamente más bajos en no respondedores primarios (PNR) a la terapia con pegIFN α que en pacientes con una respuesta virológica temprana completa (cEVR). La cantidad de miR-122, en los hígados de 42 pacientes con CHC y de 6 pacientes de control sin enfermedad en el hígado, se midió mediante RT-qPCR y se representa como copias/ARN total 10pg. La diferencia entre 16 pacientes de PNR y 26 de cEVR es significativa estadísticamente ($p < 0.0001$) según se determina mediante prueba t de dos colas de Mann Whitney. No hay diferencia significativa entre pacientes con cEVR y los controles.

35 (B) El ensayo de protección de RNasa confirma la diferencia en niveles de miR-122 entre pacientes de PNR y cEVR. El ARN que se origina de cuatro pacientes de control y ocho pacientes de CHC (cuatro PNR y cuatro cEVR; número de pacientes, mostrados en la parte superior de los paneles) se analizó con sondas específicas para miR-122 (panel superior) y let-7b (panel intermedio). Las barras en el panel inferior representan proporciones relativas entre ARNs de miR-122 y let-7b (promedios de dos experimentos similares con aquellos mostrados en los paneles superior e inferior), determinadas mediante PhosphorImaging para cada paciente. Los pacientes con PNR muestran niveles de 3 a 4 veces menores que los pacientes con cEVR y de control.

40 (C) Los niveles de ARN en suero de HCV no correlacionan con la expresión intra-hepática de miR-122. Carga viral en suero (unidades internacionales por ml) se grafica en una escala logarítmica (eje y). La correlación no es significativa ($p = 0.35$), con un coeficiente de correlación $r = 0.15$.

45 (D) Niveles de ARN intra-hepático de HCV no correlacionan con la expresión de miR-122. ARN intra-hepático de HCV (copias por μg de ARN total de hígado) se grafica en una escala logarítmica (eje y). La correlación no es significativa ($p = 0.06$, coeficiente de correlación $r = -0.29$).

(E) La administración de PegIFN α no tiene un efecto significativo sobre el nivel de miR-122 en hígado humano. Los niveles de miR-122 (copias/10 pg de ARN total) en biopsias emparejadas de hígado humano de seis pacientes de cEVR y cinco de PNR con CHC se midieron mediante RT-qPCR. La primera biopsia de hígado

se realizó antes de iniciar el tratamiento (-pegIFN α). La segunda biopsia (+pegIFN α) se realizó 4 horas después de la primera inyección de pegIFN α . El diagrama muestra el nivel de miR-122 en muestras emparejadas de hígado (conectadas mediante una línea) de cada paciente.

5 Figura 2 Expresión de miR-296-5p en hígados con hepatitis C crónica (CHC). Los niveles de miR-296-5p son significativamente superiores en no respondedores primarios (PNR) a la terapia de pegIFN α que en pacientes con una respuesta virológica temprana completa (cEVR). La cantidad de miR-296-5p en los hígados de 42 pacientes con CHC y 6 pacientes de control sin enfermedad en el hígado se midió mediante RT-qPCR y se representa como copias/10 pg de ARN total. La diferencia entre los 16 pacientes de PNR y los 26 de cEVR es estadísticamente significativa ($p < 0.001$) según se determina mediante la prueba t de dos colas de Mann Whitney.

10 Ejemplos

Muestras de pacientes y tratamiento de hepatitis C.

15 A partir de Octubre de 2006 hasta Marzo de 2008, a pacientes con CHC enviados a la University Hospital Basel se les pidió permiso para usar parte de su biopsia de hígado de diagnóstico para propósitos de investigación. 42 pacientes que fueron tratados con IFN α 2b-pegilado (pegIFN α ; PegIntron, Essex Chemie AG, Suiza) y ribavirin (Rebetol, Essex Chemie AG, Suiza; dosificación con base en peso: <65 kg, 800 mg/d; 65-85 kg, 1 g/d; >85 kg, 1.2 g/d) tuvieron suficiente material de biopsia de hígado disponible para extracciones repetidas de ARN. Todos eran Caucásicos. 11 de esos 42 pacientes acordaron también experimentar una segunda biopsia de hígado 4 horas después de la primera inyección de pegIFN α . El protocolo fue aprobado por el Ethics Committee de la University Hospital Basel y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes. Se cuantificó ARN de HCV en suero antes del inicio del tratamiento y en las semanas 4 y 12 del tratamiento usando la prueba de HCV AmpliPrep/COBAS Taqman $\text{\textcircled{R}}$ de COBAS de Roche Molecular Systems. Se realizaron la Graduación y Escalonamiento de las biopsias de hígado de acuerdo con el sistema de clasificación Metavir en el Pathology Institute of the University Hospital Basel. Se obtuvo tejido de control sin CHC saludable de 6 pacientes quienes experimentaron biopsias del hígado guiadas por ultrasonido de lesiones focales y dieron consentimiento informado para una biopsia del tejido normal del hígado fuera de la lesión focal. Estos pacientes tuvieron valores normales del hígado y la ausencia de patología del hígado se confirmó histológicamente para todas las muestras de control.

Selección de miARNs para cuantificación en tejidos de hígado y células Huh7.

30 Además de miR-122, los miARNs seleccionados para cuantificación y análisis de efectos de IFN en células Huh7 y muestras de hígado humano y de ratón hubieron miR-1, miR-196, miR-296, miR-351 y miR-448, todos reportados como inducibles por IFN por Pedersen et al (Pedersen IM et al. Nature 2007;449:919-922). Se reportó también que la transfección de cada uno de ellos, con la excepción de miR-1, disminuye la cantidad de ARN replicón de HCV en células Huh7 (Pedersen IM et al. Nature 2007;449:919-922). Otro miARN reportado como conducente a la disminución del rendimiento de ARN replicón de HCV es miR-431, pero este miARN no fue analizado por nosotros puesto que no hay disponible un análisis para su cuantificación por parte de Applied Biosystems y a la fecha este miARN no ha sido identificado como expresado en células del hígado o hepatoma. De manera similar, el miR-30 no se analizó puesto que existe en múltiples formas (miR-30a, b, c, d y e), pero la forma analizada no fue de especificada por Pedersen et al. Además, la sobreexpresión de este miARN no tuvo efecto en el rendimiento de ARN de HCV (Pedersen IM et al. Nature 2007;449:919-922). Aunque las formas específicas de miR-196 y miR-296 analizadas por Pedersen et al., no habían sido indicadas, seleccionamos para cuantificación de miR-196b (los dos clones específicos de miR-196 identificados en células de hepatoma humano representan miR-196b y no miR-196a) y miR-296-5p (the Applied Biosystems Taqman $\text{\textcircled{R}}$ microRNA Assay, usado también por Pedersen et al., está disponible para miR-296-5p, pero no para miR-296-3p). Aparte del miR-196b, no se han aislado clones que representen otros miARNs analizados (miR-1, miR-296, miR-351 y miR-448) del hígado humano o células de hepatoma (ref. 3).

Let-7b y miR-15a se seleccionaron como niveles de miARN de control los cuales no se esperaba que fueran afectados en CHC o por el tratamiento de IFN.

Extracción de ARN, transcripción inversa y cuantificación de qPCR en tiempo real de ARNs pequeños.

50 Se extrajeron fracciones de ARN total y pequeño de células Huh7.5 usando el paquete de aislamiento de miARN Trizol y mirVana TM (Ambion, Austin, TX), respectivamente y de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se aisló ARN total de hígado humano o de ratón mediante homogenización de 10 a 30 mg de tejidos congelados en reactivo Trizol. Se cuantificó la concentración de ARN usando Espectrómetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, EUA).

Para análisis de expresión de let-7b, miR-15a, miR-122, miR-1, miR-196b, miR-296-5p, miR-351 y miR-448 en

material humano y de ratón (las secuencias de estos miARNs en ratón y humano son idénticas), se usó el Applied Biosystem Taqman® microRNA Assay System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las reacciones de transcriptasa inversa (RT), en volumen final de 7.5 µl, regulador contenido 1 x RT, 5 ng de ARN, cebador de RT específico de miARN 50 nM, 0.25 mM de cada dNTP, 0.25 U/µl de inhibidor de RNasa y 3.33 U/µl de RT MultiScribe, se incubaron durante 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C y después se mantuvo a 4°C. Todas las reacciones, incluyendo controles no templados, se corrieron en triplicado. Se realizó PCR en tiempo real usando un Applied Biosystems Prism 7000 Sequence Detection System. Los 10 µl de PCR incluían 0.67 µl de producto de RT, mezcla maestra de 1* Taqman Universal de PCR y 1 µl de cebadores y una mezcla de sondas del ensayo Taqman® MicroRNA Assay. Las reacciones se incubaron en una placa óptica de 96 pozos a 95°C durante 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos. Los valores de Ct se determinaron usando establecimientos de umbral por omisión. El ciclo de umbral (Ct) se define como el número fraccional de ciclo al cual pasa la fluorescencia el umbral fijado.

Normalización de estimación de número de copias de miARN.

Los valores de Ct determinados para cada muestra se normalizaron al promedio obtenido de Ct para ARN U6, calculados a partir de reacciones por triplicado. Para determinar los números de copias de miARN, se generaron curvas normales, usando oligoribonucleótidos purificados por electroforesis de gel de poliacrilamida (PAGE) (Microsynth, Suiza) que corresponden a miARNs de let-7b, miR-15a, miR-122, miR-1, miR-196b, miR-296-5p, miR-351, y miR-448. La alimentación de ARN sintético fluctuó desde 1.3 aM (equivalente a 7 copias por reacción) hasta 13 pM (7×10^7 copias por reacción) y las reacciones se analizaron mediante el Taqman® MicroRNA Assay en duplicado usando el Applied Biosystems Prism 7000, como se describió antes. Para validar adicionalmente la normalización realizada con miARNs sintéticos aislados, las reacciones que contenían 5 ng del ARN total de cualesquiera células de HeLa o de retina de ratón fueron rematadas con concentraciones crecientes (1.3 aM a 13 pM) de miR-122 sintético y se analizaron mediante el Taqman® MicroRNA Assay. MiR-122 no se expresa en HeLa y células de retina de ratón como se determina mediante reacciones de control sin adición de ARN miR-122 sintético. No se observaron diferencias entre las curvas normales obtenidas en la ausencia o la presencia del ARN "portador" (datos no mostrados).

Los valores Ct de obtenidos a partir de reacciones diferentes se convirtieron a número absoluto de copias de miARNs específicos por 10 pg de ARN total de tejido de hígado o por célula Huh7 sencilla, usando curvas de normalización apropiadas. Cuando se indica, la recuperación de miARNs se normalizó además para niveles de mRNA de albúmina específica de hepatocito. Los cebadores usados para RT-qPCR de albúmina humana fueron TTGGAAAATCCCCTGCAT (SEQ ID NO:1) y CTCCAAGCTGCTCAAAAAGC (SEQ ID NO:2). Las reacciones SYBR-PCR se realizaron usando la mezcla maestra SYBR verde PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Para determinar números de copias de miARNs individuales por célula Huh7, la recuperación de ARN total por célula se calculó mediante tres procedimientos diferentes. Para los primeros dos procedimientos, se contaron las células usando el CASY1 Cell Counter de acuerdo con el protocolo del fabricante (Scharfe System, Alemania) y se extrajo el ARN de un número conocido de células usando Trizol o el paquete mirVana. En el tercer procedimiento, se contaron las células bajo el microscopio y se extrajo ARN mediante Trizol. Los tres procedimientos se realizaron por triplicado usando números diferentes de células para extracción de ARN. Las muestras se remataron con un ARN etiquetado con ³²P para determinar la recuperación de ARN. Los tres procedimientos dieron las siguientes cantidades de ARN total por célula: 13.8 +/- 3.5 pg, 14.52 +/- 2.65 pg y 13.98 +/- 2.37 pg. Se usó un valor promedio de 14.1 pg/célula para cálculos adicionales. Este valor es menor que 25 pg de ARN por célula usado previamente por Chang et al., para cálculo del contenido de miR-122 en hepatocitos y células de hepatoma. Sin embargo, cae en el rango de valores calculados para linfocitos T de ratón en etapas diferentes del desarrollo (0.67 a 6.82 pg/célula) o células de ratón (20 pg/célula).

Para determinar ARN pequeño (<200 nt) contenido por célula, el ARN total de células Huh7 obtenido mediante procedimientos diferentes se sujetó a fraccionación mediante el paquete de mirVana™. Se calculó que una sola célula Huh7 contiene 1.125 pg de ARN pequeño (promedio de determinación que fluctúa desde 1.05 hasta 1.2 pg por célula). Este valor, que es similar a aquel determinado por Brown et al., se usó para recalcular números de copias de ARN por 10 pg de ARN pequeño (según determinación de Brown et al., usando también el Applied Biosystem Taqman® Assay) para copias de miARN por célula. Notamos que los valores de copias de miARN por célula determinados mediante el Applied Biosystem Taqman® Assay tienden a ser menores que aquellos determinados mediante protección de RNasa (nuestros resultados sin publicar). Esto se debe al hecho de que el Applied Biosystem Taqman® System no detecta variantes individuales de secuencia en el extremo 3' de un miARN específico con eficacia idéntica (resultados sin publicar).

Detección de miARN mediante ensayo de protección RNasa

La detección de miARN mediante ensayo de protección RNasa (RPA) se realizó usando la construcción de sondas de miARN de mirVANA y paquetes de detección (Ambion), de acuerdo con las instrucciones del

5 fabricante. Los cebadores usados para reparación de las sondas de fueron: let-7b, TGAGGTAGTAGTTGTGTGGTTCTGTCTC (SEQ ID NO:3); y miR-122, TGGAGTGTGACAATGGTGTGGTTCTGTCTC (SEQ ID NO:4). Brevemente, las reacciones de RPA contenían 5 fmol (100,000 cpm) de sondas de RPA etiquetado internamente y purificado por PAGE y 1 µg de ARN total de hígado. La hibridación se llevó a cabo durante la noche a 42°C y la digestión de RNasa A/T1 fue a 37°C durante 20 min. Los fragmentos protegidos se analizaron mediante PAGE 12% bajo condiciones desnaturalizantes, seguido por cuantificación de PhosphorImager (Typhoon, Molecular Dynamics).

Determinación de niveles de mARN ISG.

10 El ARN total extraído de tejido de hígado de humano o de ratón se usó para cuantificación de mARNs ISG "clásicos" (PKR, OAS1, STAT1 y SOCS1) como una medida de la acción de IFN. El ARN se transcribió de manera inversa mediante transcriptasa inversa de virus de leucemia de murino Moloney (Promega Biosciences, Inc., Wallisellen, Suiza) en la presencia de hexámeros aleatorios (Promega) y trifosfatos de deoxinucleósido. Las reacciones fueron incubadas durante 5 minutos a 70°C, después durante 1 hora a 37°C, y se detuvieron por calentamiento a 95°C durante 5 minutos. Las reacciones de SYBR-PCR se realizaron usando mezcla maestra de PCR SYBR verde (Applied Biosystems) y cebadores que abarcan los empalmes de exón-intron para evitar la amplificación de ADN genómico. Los siguientes cebadores se usaron para genes de ratón (m): proteína ribosomal L-19 (mRPL-19), ATCCGCAAGCCTGTGACTGT (SEQ ID NO:5) y TCGGGCCAGGGTGTGTTTTT (SEQ ID NO:6); mPKR, TGATAACGAAAACAAGGTGGATTG (SEQ ID NO:7) y ACAAGGCCTATGTAGTTACCAACGA (SEQ ID NO:8); mOAS1, CACCCA GTGAGGGTCTCCAA (SEQ ID NO:9) y CCCTTGAGTGTGGTGCCTTT (SEQ ID NO:10); mSTAT1, CGCGCAGAGAGATTTGC (SEQ ID NO:11) y AGCTGAAACGACTGGC TCTCA (SEQ ID NO: 12). Los cebadores para genes humanos (h) fueron: gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (hGAPDH); GCTCCTCTGTTTCGACAGTCA (SEQ ID NO:13) y ACCTTCCCATGGTGTCTGA (SEQ ID NO:14), hPKR, TGATTATCTGCGTGCATTTTGG (SEQ ID NO:15) y GCTGAAAGATCACCAGCCATTT (SEQ ID NO:16); hOAS1, TGATGCCCTGGGTCAGTTG (SEQ ID NO:17) y TCGGTGCACTCCTCGATGA (SEQ ID NO:18); hSOCS1, CCCCTTCTGTAGGATGGTAGCA (SEQ ID NO:19) y TGCTGTGGAGACTGCATTGTC (SEQ ID NO:20); hSTAT1 TCCCCAGGCCCTTGTTG (SEQ ID NO:21) y CAAGCTG CTG AAGTTGGTACCA (SEQ ID NO:22); hIP10, CGATTCTGATTTGCTGCCTTAT (SEQ ID NO:23) y GCAGGTACAGCGTACGGTTCT (SEQ ID NO:24); hUSP18, CTCAGTCCCAGCTGGAAC (SEQ ID NO:25) y ATCTCTCAAGCGCCATGCA (SEQ ID NO:26); hIFI27, CCTCGGGCAGCCTTGTTG (SEQ ID NO:27) y AATCCGGAGAGTCCAGTTGCT (SEQ ID NO:28). La diferencia en el valor de umbral de ciclo (ΔCt) se derivó restando el valor Ct para hGAPDH o mRPL-19, que sirven como controles internos, a partir del valor Ct para transcritos de interés. Todas las reacciones se corrieron por duplicado, usando un Applied Biosystems Prism 7000 Sequence Detection System. Los niveles de expresión de mARN se calcularon con relación a hGAPDH o mRPL-19 a partir de valores de ΔCt , usando la fórmula $2^{-\Delta Ct}$. El cambio de expresión en muestras de biopsia de hígado en pares se calculó como un cambio de doblez de acuerdo con la fórmula $2^{(\Delta Ct B-1-\Delta Ct B-2)}$.

Cuantificación de ARN de HCV intra-hepático.

40 1 µg de ARN total aislado a partir de biopsias de 42 pacientes de CHC y 6 de control se transcribió de manera inversa de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando una mezcla de cebadores RT específicos de patógeno (Paquete de Cuantificación para HCV PrimerDesign Ltd, Southampton, UK) diseñado para la cuantificación in vitro de todos los subtipos de HCV. El ARN de HCV se cuantificó de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando una mezcla de cebador/sonda específica para patógenos (PrimerDesign Ltd) y la mezcla maestra Taqman® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, manufactured by Roche, New Jersey, EUA). La fluorescencia se detectó a través del canal de FAM del Applied Biosystems 7000 Sequence Detection System y se calcularon copias de ARN de HCV por 1 µg de ARN total de acuerdo con la curva estándar obtenida usando la plantilla de control positiva para patógenos (PrimerDesign Ltd).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis Forschungsstiftung, Zweigniederlassung

Friedrich Miescher Institute for Biomedicine

Research University Hospital, Basel

50 <120> Predicción de respuesta a terapia antiviral

<130> 52675

<160> 28

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 1

ttgaaaaat cccactgcat 20

<210> 2

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

ctccaagctg ctcaaaaagc 20

<210> 3

15 <211> 30

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

tgaggtagta ggtgtgtgg ttcctgtctc 30

20 <210> 4

<211> 31

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

25 ttgagtgatga caatggtgtt tgcctgtct c 31

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Mus musculus

30 <400> 5

atccgcaagc ctgtgactgt 20

<210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 5 <400> 6
 tcgggccagg gtgtttt 18
 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> Mus musculus
 <400> 7
 tgataacgaa aacaaggtgg attg 24
 <210> 8
 <211> 25
 15 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 8
 acaaggccta thtagttacc aacga 25
 <210> 9
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 9
 caccagtgga gggctcctca 20
 25 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 10
 30 cccttgagtg tgggccttt 20
 <210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 11

5 cggcgcagag agattgc 18

<210> 12

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

10 <400> 12

agctgaaacg actggctctc a 21

<210> 13

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 13

gctcctctg ttcgacagtc a 21

<210> 14

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 14

acctcccca tgggtctga 20

<210> 15

25 <211> 22

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 15

tgattatctg cgtgcatttt gg 22

30 <210> 16

<211> 22

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 16

gctgaaagat caccagccat tt 22

5 <210> 17

<211> 19

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 17

10 tgatgccctg ggtcagttg 19

<210> 18

<211> 19

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15 <400> 18

tcggtgcact cctcgatga 19

<210> 19

<211> 22

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<400> 19

gctgaaagat caccagccat tt 22

<210> 20

<211> 21

25 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 20

tgctgtggag actgcattgt c 21

<210> 21

30 <211> 17

<212> ADN

<213> Homo sapiens
 <400> 21
 tccccaggcc cttgtg 17
 <210> 22
 5 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 caagctgctg aagttggtac ca 22
 10 <210> 23
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 15 cgattctgat ttgctgcctt at 22
 <210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 24
 gcaggtacag cgtacggttc t 21
 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 ctcagtcccg acgtggaact 20
 <210> 26
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 26

atctctcaag cgccatgca 19

<210> 27

<211> 17

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 27

cctcgggcag cctgtg 17

<210> 28

10 <211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 28

aatccggaga gtccagttgc t 21

15

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la probabilidad de que un sujeto que tiene una infección viral en el hígado responderá a terapia antiviral que incluye la estimulación de la actividad de Interferón (IFN), comprendiendo el método:
 - 5 (a) analizar una muestra del sujeto para el nivel de expresión de un miR-122 y/o miR-296-5p y
 - (b) comparar el nivel de expresión de miR-122 y/o miR-296-5p en la muestra de tejido del sujeto que tiene la infección viral en el nivel de expresión de miR-122 y/o miR-296-5p en una muestra de tejido de control de un sujeto sin infección viral,
- 10 en donde un nivel significativamente inferior de miR-122 en la muestra del sujeto que tiene la infección viral en comparación con el nivel de miR-122 en la muestra de control de un individuo que no está sufriendo de una infección viral del hígado indica que el sujeto que tiene la infección viral no va a responder probablemente a dicha terapia antiviral; y
- 15 en donde un nivel significativamente más alto de miR-296-5p en la muestra del sujeto que tiene la infección viral en comparación con el nivel de miR-296-5p en la muestra de control del sujeto sin infección viral indica que el sujeto que tiene la infección viral probablemente no va a responder a dicha terapia antiviral.
2. El método de cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde la terapia individual incluye IFN α pegilado (pegIFN α), combinado opcionalmente con ribavirin.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde la infección viral es infección con virus de hepatitis B o con virus de hepatitis C.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en donde el virus es virus de hepatitis C.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde la muestra de tejido del sujeto que tiene la infección viral comprende tejido de hígado.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde el sujeto es humano.

Figura 1

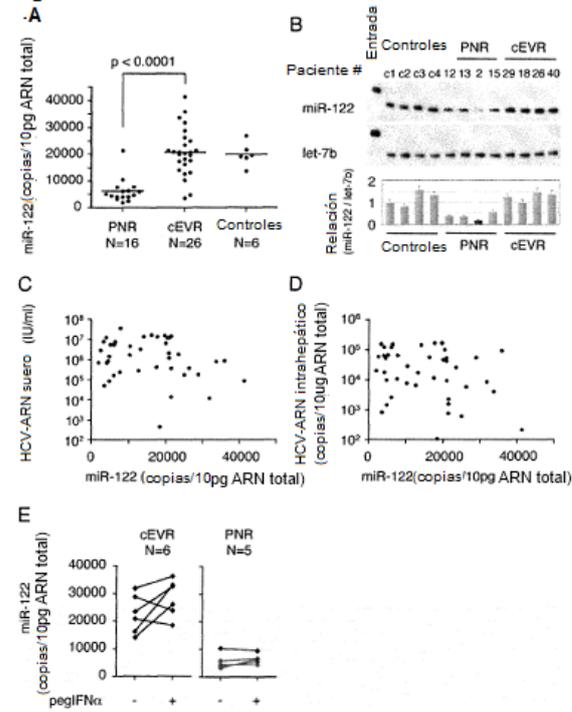


Figura 2

