

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 442**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2009 E 09781075 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2315832**

54 Título: **Modulación mediada por microARN de factores estimulantes de colonias**

30 Prioridad:

01.08.2008 US 85644 P
10.12.2008 US 121204 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.07.2015

73 Titular/es:

**ROCHE INNOVATION CENTER COPENHAGEN
A/S (100.0%)
Fremtidsvej 3
2970 Hørsholm, DK**

72 Inventor/es:

**WORM, JESPER;
STENVANG, JAN;
OBAD, SUSANNA y
KAUPPINEN, SAKARI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 541 442 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

Modulación mediada por microARN de factores estimulantes de colonias

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la modulación de proteínas inmunorreguladoras, incluyendo citocinas tales como factores estimulantes de colonias (CSF), mediante el uso de inhibidores de microARN-155 o miméticos. La presente invención se refiere a compuestos de LNA novedosos que median la regulación negativa simultánea de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1 o CCL2) e interleucina 6, así como de M-CSF y G-CSF. Dichos compuestos de LNA son altamente útiles en la prevención o el tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias crónicas o agudas, especialmente aquellas asociadas a una acumulación aberrante de linfocitos o monocitos tales como enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias crónicas y agudas, acumulación aberrante de linfocitos o monocitos, artritis, artritis idiopática juvenil, artritis reumatoide, artritis aguda y crónica, asma, aterosclerosis, nefropatía diabética, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, nefritis, glomerulonefritis, pancreatitis, fibrosis pulmonar, psoriasis, reestenosis, rechazo de trasplante, etapas tempranas de respuestas alérgicas, inhibición de LTC₄ para prevenir la AHR (hipersensibilidad de las vías respiratorias), infección por tuberculosis y malignidad, apoplejía, enfermedad de Castleman, neoplasia, mieloma múltiple de grado alto, mesoteliomas malignos, síndrome paraneoplásico de mesoteliomas, inmunosupresión, caquexia, trombocitosis, amiloidosis, osteogénesis imperfecta, homocistinuria, osteoporosis, osteopetrosis, inflamación ósea asociada a artritis y artritis reumatoide, enfermedad periodontal, displasia fibrosa, enfermedad de Paget, insuficiencia renal crónica, endocrinopatías, hipercalcemia, estados de deficiencia, síndromes de malabsorción, enfermedad hepática crónica, metástasis de cáncer y progresión de tumor mamario hasta metástasis.

Más específicamente, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos de LNA y al uso de estos compuestos y composiciones en la prevención o el tratamiento de dichas enfermedades.

CASOS RELACIONADOS

Las siguientes solicitudes relacionadas dan a conocer inhibidores de microARN-155 (antimiR): WO2007/112754, WO2007/112753, solicitud EP número 08104780 y solicitudes provisionales de EE.UU. US 60/979217 y US 61/028062.

ANTECEDENTES

Los factores estimulantes de colonias (CSF) son glicoproteínas secretadas que se unen a proteínas receptoras sobre las superficies de citoblastos hematopoyéticos y activan así rutas de señalización intracelular que pueden causar que las células proliferen y se diferencien en una clase específica de células sanguíneas (habitualmente leucocitos). En seres humanos, existen tres genes de CSF, CSF1 que codifica el CSF de macrófagos (M-CSF), CSF2 que codifica el CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y CSF3 que codifica el CSF de granulocitos (G-CSF).

Hamilton, Nature Reviews 8 (2008), pág. 533-544 reseña que el agotamiento de los CSF tiene un beneficio terapéutico en muchas enfermedades inflamatorias y/o autoinmunitarias y que existen numerosas terapias de anticuerpos en desarrollo clínico orientadas a CSF para la terapia de la inflamación. El documento WO 2003/028752 describe igualmente que pueden modularse las respuestas inmunitarias reduciendo la actividad de CSF1.

Neupogen® (filgrastim) es un G-CSF humano producido heterológamente por Amgen para potenciar la concentración de leucocitos en pacientes de cáncer que se están tratado con quimioterapia.

Se ha indicado G-CSF en enfermedades inflamatorias autoinmunitarias crónicas, tales como respuestas de hipersensibilidad de tipo II, incluyendo artritis reumatoide.

El microARN-155 se induce durante la respuesta inflamatoria de macrófagos (O'Connell *et al.*, PNAS 104(5), pág.1604-9), y la sobreexpresión de miR-155 aumenta el número de células granulocíticas/monocíticas (GM) en la médula ósea (O'Connell *et al.*, 2008, J. Experimental Med. 205(3), pág. 585-594).

El documento WO 2007/016548 describe que mir-155 está regulado positivamente en cáncer de mama. Esto se confirma en un resumen de póster de Obad *et al.* 2008, European Journal of Cancer-Supplements 2008, 6(9), pág.142.

El documento WO2008/017126 hace referencia a compuestos anticodificantes orientados al factor estimulante de granulocitos (G-CSF) y al uso de dichos compuestos para el tratamiento de enfermedad pulmonar. La proteína G-CSF se ha desarrollado como agente terapéutico para aumentar los recuentos de leucocitos y puede potenciar la capacidad del sistema inmunitario de generar una respuesta tipo Th-2 que puede reducir las respuestas inflamatorias mediadas por Th-1, por ejemplo en enfermedad de Crohn.

G-CSF

5 El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una hormona factor estimulante de colonias. Es una glicoproteína, factor de crecimiento o citocina producido por una serie de tejidos diferentes para estimular la médula ósea a producir granulocitos y citoblastos. El G-CSF estimula entonces la médula ósea a liberarlos en la sangre. Estimula también la supervivencia, proliferación, diferenciación y función de precursores de neutrófilos y neutrófilos maduros.

10 Desempeña un papel importante en enfermedades inflamatorias de articulaciones, ya que los ratones deficientes en G-CSF están protegidos de artritis aguda y crónica. Se asociaba la gravedad reducida a una movilización debilitada de células granulocíticas de la médula ósea y menos infiltrado celular y activación celular en las articulaciones inflamadas. Se ha demostrado también que el bloqueo de G-CSF en artritis inducida por colágeno establecida en ratones WT reduce notablemente las manifestaciones patológicas y es tan eficaz como el bloqueo del factor de necrosis tumoral. El G-CSF desempeña un papel crítico en el avance de la inflamación de articulaciones y el G-CSF es una diana terapéutica potencial en enfermedades inflamatorias de articulaciones tales como artritis reumatoide (Lawlor *et al.*, PNAS, 2004).

20 Se ha reseñado el empeoramiento de la psoriasis después del tratamiento con G-CSF (Feliu *et al.*, JNCI, 1997) indicando un papel para G-CSF en la patogénesis de la psoriasis.

M-CSF

25 El factor estimulante de colonias de macrófagos, o M-CSF, es una citocina secretada que influye a citoblastos hematopoyéticos a diferenciarse en macrófagos u otros tipos celulares relacionados. También el factor estimulante de colonias de macrófagos, M-CSF, apoya la formación de osteoclastos (Yoshida *et al.* Nature 345: 442-444, 1990). Los osteoclastos median la reabsorción ósea. Los osteoclastos son células multinucleadas que se diferencian a partir de las células hematopoyéticas (Walker, Science 190: 784-785, 1975) y comparten un citoblasto común con las células del linaje de monocitos-macrófagos (Ash *et al.*, Nature 283: 669-670, 1980). La diferenciación de precusores de osteoclastos en osteoclastos multinucleados maduros requiere diferentes factores, incluyendo estímulos hormonales y locales (Walker, Science 190: 784-785, 1975) y se ha mostrado que el hueso vivo y las células óseas desempeñan un papel crítico en el desarrollo de osteoclastos (Hagenaars *et al.*, Bone Miner. 6: 179-189, 1989). Se requieren también células osteoblásticas o de estroma de médula ósea para la diferenciación de osteoclastos, y uno de los factores producidos por estas células que apoya la formación de osteoclastos es el factor estimulante de colonias de macrófagos, M-CSF (Yoshida *et al.*, Nature 345: 442-444, 1990).

40 Por tanto, sigue habiendo la necesidad en la técnica de identificar nuevos agentes y procedimientos para prevenir o tratar la osteólisis o metástasis del cáncer, incluyendo metástasis ósea osteolítica. Las enfermedades óseas metabólicas asociadas a una actividad osteoclástica relativamente aumentada incluyen endocrinopatías (incluyendo hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo primario o secundario, hipertiroidismo), hipercalcemia, estados de deficiencia (incluyendo raquitismo/osteomalacia, escorbuto, malnutrición), enfermedades crónicas (incluyendo síndromes de malabsorción, insuficiencia renal crónica (incluyendo osteodistrofia renal), enfermedad hepática crónica (incluyendo osteodistrofia hepática)), fármacos (incluyendo glucocorticoides (osteoporosis inducida por glucocorticoides), heparina y alcohol) y enfermedades hereditarias (incluyendo osteogénesis imperfecta, homocistinuria), cáncer, osteoporosis, osteopetrosis, inflamación ósea asociada a artritis y artritis reumatoide, enfermedad periodontal, displasia fibrosa y/o enfermedad de Paget.

50 El M-CSF desempeña un papel más general en la formación de metástasis de cáncer. Los estudios de ratones mutantes completos de M-CSF demostraron que el M-CSF desempeña un papel importante en la progresión de tumor mamario hasta metástasis. El M-CSF regula estos procesos mediante el agrupamiento y regulación de macrófagos, células que se asocian a tumores mamaros y a los brotes terminales al final de los conductos en crecimiento. Este fenómeno sugiere que los tumores trastocan los procesos de desarrollo normales permitiendo la invasión del estroma circundante, un proceso que da acceso al tumor a los vasos y por consiguiente la promoción de la metástasis. Además, el M-CSF soluble secretado del tumor actúa desviando las respuestas antitumorales macrofágicas y suprime la diferenciación de células dendríticas maduras presentadoras de antígeno tumoral (Lin *et al.*, J. Exp. Med., 2002).

Ligando 2 de quimiocina (motivo C-C) (CCL2) (alt.: proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1))

60 Las citocinas quimioatrayentes, denominadas quimiocinas, son una gran familia de proteínas de bajo peso molecular que comparten la capacidad de estimular la migración celular dirigida [Schall, Cytokine 3: 165-183 (1991); Murphy, Rev. Immun. 12:593-633 (1994)]. Las quimiocinas se han implicado como mediadores importantes de trastornos y enfermedades inflamatorias y autoinmunitarios tales como asma, aterosclerosis, glomerulonefritis, pancreatitis, reestenosis, artritis reumatoide, nefropatía diabética, fibrosis pulmonar, esclerosis múltiple y rechazo de trasplante. En consecuencia, el uso de antagonistas de la función de quimiocina puede ayudar a revertir o detener la progresión de estos trastornos y enfermedades.

Con pocas excepciones, las quimiocinas tienen cuatro residuos de cisteína conservados que forman enlaces disulfuro en las proteínas de quimiocina. Se han clasificado dos subfamilias de quimiocina principales basándose en la localización cromosómica de los genes de quimiocina y la posición relativa de los dos primeros residuos de cisteína (Van Collie *et al.*, Cytokine Growth Factor Rev. 10: 61-86 (1999)). La proteína quimioatrayente de monocitos 1 (CCL-2) es un miembro de la clase C-C de la familia de quimiocinas β y uno de los factores claves implicados en la iniciación de la inflamación. La CCL-2 se secreta típicamente en las formas prevalentes, de 9 y 13 kDa respectivamente, como resultado de una O-glicosilación diferencial. Desencadena el quimiotactismo y la migración transendotelial de monocitos hasta las lesiones inflamatorias al interactuar con el receptor de quimiocina CC de membrana 2 (CCR2) en monocitos (O'Hayre *et al.*, 2008). La CCL-2 se secreta por fibroblastos, células endoteliales, células de músculo liso vascular, monocitos, linfocitos T y otros tipos celulares que median en el flujo de entrada de células a los sitios de inflamación (Conti y DiGiacchino, 2001). Se ha observado la expresión de CCL-2 en un gran número de tejidos durante la progresión de enfermedades dependientes de la inflamación, incluyendo aterosclerosis (Shin *et al.*, 2002), artritis (Taylor *et al.*, 2000) y cáncer (O'Hayre *et al.*, 2008). En estos casos, se ha sugerido que el flujo de entrada de macrófagos en estos tejidos exagera las enfermedades. Por tanto, la expresión de CCL-2, que es probable que sea crítica para combatir enfermedades infecciosas, debe regularse estrechamente.

CCL-2 en enfermedades

Se ha observado la expresión elevada de CCL-2 en una serie de enfermedades inflamatorias crónicas [Proost *et al.*, Int. J. Clin. Lab. Res. 26: 211-223 (1996); Taub, D. D. Cytokine Growth Factor Rev. 7: 355-376 (1996)] incluyendo, pero sin limitación, artritis reumatoide [Robinson *et al.*, Clin. Exp. Immunol. 101: 398-407 (1995); Hosaka *et al.*, *ibid.* 97: 451-457 (1994); Koch *et al.*, J. Clin. Invest. 90: 772-779 (1992); Villiger *et al.*, J. Immunol. 149: 722-727 (1992)], asma [Hsieh *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 580-587 (1996); Alam *et al.*, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153: 1398-1404 (1996); Kurashima *et al.*, J. Leukocyte Biol. 59: 313-316 (1996); Sugiyama *et al.*, Eur. Respir. J. 8: 1084-1090 (1995)] y aterosclerosis [Yla-Herttuala *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5252-5256 (1991); Nelken *et al.*, J. Clin. Invest. 88: 1121-1127 (1991)].

La CCL-2 parece desempeñar un papel significativo durante las etapas tempranas de las respuestas alérgicas debido a su capacidad de inducir la activación de mastocitos y la liberación de LTC₄ en las vías respiratorias, lo que induce directamente AHR (hipersensibilidad de las vías respiratorias) [Campbell *et al.*, J. Immunol. 163: 2160-2167 (1999)].

La CCL-2 se ha encontrado en los pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y se cree que es responsable del flujo de entrada de fagocitos mononucleares y de la producción de factores de crecimiento que estimulan las células mesenquimáticas y la consiguiente fibrosis [Antoniades *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5371-5375 (1992)]. Además, la CCL-2 está también implicada en la acumulación de monocitos en efusiones pleurales implicadas tanto en la infección por *Mycobacterium tuberculosis* como en la malignidad [Strieter *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 123: 183-197 (1994)].

Se ha mostrado también que la CCL-2 se expresa constitutivamente por fibroblastos sinoviales en pacientes de artritis reumatoide, y sus niveles son mayores en articulaciones de artritis reumatoide en comparación con articulaciones normales o aquellas de otras enfermedades artríticas [Koch *et al.*, J. Clin. Invest. 90: 772-779 (1992)]. Estos niveles elevados de CCL-2 son probablemente responsables de la infiltración monocítica en el tejido sinovial. La CCL-2 desempeña también un papel crítico en la iniciación y desarrollo de lesiones ateroscleróticas. La CCL-2 es responsable del agrupamiento de monocitos en zonas ateroscleróticas, como se muestra por la inmunohistoquímica de la pared arterial rica en macrófagos [Yla-Herttuala *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5252-5256 (1991); Nelken *et al.*, J. Clin. Invest. 88: 1121-1127 (1991)] y la detección de anticuerpos anti-CCL-2 [Takeya *et al.*, Human Pathol. 24: 534-539 (1993)]. Los ratones deficientes en receptor de LDL/CCL-2 y transgénicos de apoB/deficientes en CCL-2 muestran considerablemente menos deposición lipídica y acumulación de macrófagos a lo largo de sus aortas en comparación con cepas CCL-2 de tipo silvestre [Alcami *et al.*, J. Immunol. 160: 624-633 (1998); Gosling *et al.*, J. Clin. Invest. 103: 773-778 (1999); Gu *et al.*, Mol. Cell. 2: 275-281 (1998); Boring *et al.*, Nature 394: 894-897 (1998)]. Otras enfermedades inflamatorias marcadas por elevaciones específicas de sitio de CCL-2 incluyen esclerosis múltiple (EM), glomerulonefritis y apoplejía. En conjunto, de estos hallazgos se infiere CCL-2 como una diana terapéutica en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y se sugiere enérgicamente que sería altamente beneficioso el descubrimiento y desarrollo de compuestos novedosos que bloqueen o regulen negativamente la actividad de CCL-2 en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Interleucina 6 (IL-6)

La IL-6 es una citocina multifuncional identificada originalmente como un factor derivado de linfocitos T que causa la maduración terminal de linfocitos B inmaduros estimulada por antígeno hasta células plasmáticas productoras de inmunoglobulina [Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985; 82: 5490-4]. Una serie de tipos celulares producen IL-6, incluyendo linfocitos T, linfocitos B, monocitos, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, células mesangiales y células de estroma de médula ósea [Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, *et al.* Nature 1988; 332: 83-5]. La IL-6 tiene también un amplio

intervalo de células sensibles, incluyendo linfocitos B, linfocitos T, hepatocitos, células precursoras hematopoyéticas, células neuronales, queratinocitos epidérmicos, células mesangiales y osteoclastos [Adachi *et al.* Current Pharmaceutical Design, 2008, 14, 1217-1224]. La IL-6 funciona como regulador inmunitario, inductor de proteínas en fase aguda, factor de diferenciación celular, factor de crecimiento celular y regulador del metabolismo óseo frente a estas células efectoras. Adicionalmente, la IL-6 induce proteína C reactiva (CRP) y amiloide A sérico (SAA) en hepatocitos [Adachi *et al.* Current Pharmaceutical Design, 2008, 14, 1217-1224]. Ambas proteínas son marcadores importantes de inflamación y se usan clínicamente en la monitorización de pacientes que padecen afecciones inflamatorias. Recientemente, se ha implicado a IL-6 en el equilibrio de Th17 y los linfocitos T reguladores se han convertido en un enfoque novedoso en inmunología [Tato CM, O'Shea JJ. Nature 2006; 441: 166-8]. Dado que se observa una regulación aberrante de linfocitos T auxiliares en estados inflamatorios crónicos en seres humanos, esta acción puede conferir superioridad a los tratamientos anti-IL-6 frente a enfoques orientados a otras citocinas inflamatorias.

IL-6 en enfermedades inflamatorias

La IL-6 es uno de los reguladores clave de las respuestas inflamatorias e induce la maduración final de linfocitos B hasta células productoras de inmunoglobulina [Adachi *et al.* Current Pharmaceutical Design, 2008, 14, 1217-1224]. A causa de estas propiedades, la IL-6 es una molécula crucial en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias crónicas, tales como la enfermedad de Castleman, artritis reumatoide (AR), artritis idiopática juvenil y enfermedad de Crohn [Adachi *et al.* Current Pharmaceutical Design, 2008, 14, 1217-1224]. Estas enfermedades son a menudo resistentes a terapias convencionales tales como corticosteroides e inmunosupresores. Adicionalmente, la sobreproducción de IL-6 desempeña un papel patológico importante en varias neoplasias, incluyendo mielomas múltiples de grado alto [17-19] a mesoteliomas malignos [20, 21]. El síndrome paraneoplásico de mesoteliomas, que incluye inmunosupresión, caquexia, trombocitosis y amiloidosis, está relacionado con la sobreproducción de IL-6 [Nakano *et al.* Br. J. Cancer 1998; 77: 907-912; Fitzpatrick *et al.* Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1995; 12: 455-60]. Como tal, el tratamiento anti-IL-6 puede tanto aliviar el síndrome paraneoplásico clínicamente devastador como suprimir el crecimiento tumoral. Por tanto, las terapias orientadas a IL-6 muestran un alto potencial para el tratamiento de afecciones inflamatorias y malignidades.

Existe por lo tanto la necesidad de desarrollar agentes que puedan regular negativamente la expresión de genes tales como M-CSF, G-CSF, CCL-2 e IL-6, o regular positivamente genes tales como M-CSF, G-CSF, CCL-2 e IL-6 para su uso en el tratamiento de enfermedades en las que la modulación de la expresión de estos factores será beneficiosa. Como resulta evidente en la presente memoria, puede ser deseable también para dichos agentes modular la expresión de otros genes inmunorelacionados tales como Bcl2l1, Cd40, Nos2, Socs1, Stat1 y Cxcr3.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención emplea un modulador de microARN-155 para su uso en la inhibición de la función de un microARN y la inhibición así de la expresión de una o más citocinas, tales como citocinas proinflamatorias (genes diana).

La presente invención emplea un modulador de microARN-155 para su uso en la inhibición de la función (o actividad) de un microARN y la inhibición así de la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo consistente en CSF, tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, Bcl2l1, Ccl2, Cd40, IL-6, Nos2, Socs1, Stat1 y Cxcr3, en una célula.

La presente invención emplea un modulador de microARN-155 para su uso en la inhibición de la función (o actividad) de un microARN y la inhibición así de la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo consistente en CSF, tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, Ccl2 e IL-6 en una célula.

La presente invención emplea un inhibidor de microARN-155 para su uso en la inhibición de la función de microARN-155 y la reducción así de la expresión de una o más citocinas, tales como citocinas proinflamatorias (genes diana).

La presente invención emplea un inhibidor de microARN-155 para su uso en la inhibición de la función de microARN-155 y la reducción así de la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo consistente en CSF, tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, Bcl2l1, Ccl2, Cd40, IL-6, Nos2, Socs1 y Stat1, en una célula.

La presente invención emplea un inhibidor de microARN-155 para su uso en la inhibición de la función de microARN-155 y la reducción así de la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo consistente en uno o más genes seleccionados del grupo consistente en CSF, tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, Ccl2 e IL-6 en una célula.

La invención proporciona un procedimiento de regulación negativa (de la expresión) de una o más citocinas, tales como citocinas proinflamatorias (genes diana) en una célula, comprendiendo dicho procedimiento administrar un inhibidor de microARN-155 a la célula.

- 5 La invención proporciona un procedimiento de regulación negativa (de la expresión) de uno o más genes seleccionados del grupo consistente en CSF, tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, Bcl2l1, Ccl2, Cd40, IL-6, Nos2, Socs1 y Stat1, en una célula, comprendiendo dicho procedimiento administrar un inhibidor de microARN-155 a la célula.
- 10 La invención proporciona un procedimiento de regulación negativa (de la expresión) de uno o más genes seleccionados del grupo consistente en CSF, tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, Ccl2 e IL-6 en una célula.
- La invención proporciona un procedimiento de regulación negativa simultánea de G-CSF, M-CSF, CCL2 e IL-6 en una célula, comprendiendo dicho procedimiento administrar un inhibidor de microARN-155 a la célula.
- 15 La presente invención emplea un inhibidor de microARN-155 para su uso en la inhibición de la función de microARN-155 y la potenciación así de la expresión de Cxcr3, en una célula.
- La invención proporciona un procedimiento de regulación positiva (de la expresión) de Cxcr3 en una célula, comprendiendo dicho procedimiento administrar un inhibidor de microARN-155 a la célula.
- 20 La invención proporciona un procedimiento de modulación de la expresión de una o más citocinas, tales como citocinas proinflamatorias (genes diana) en una célula, comprendiendo dicho procedimiento administrar un inhibidor de microARN-155 a la célula.
- La invención proporciona un procedimiento de regulación negativa (de la expresión) de uno o más genes seleccionados del grupo consistente en CSF, tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, Ccl2 e IL-6 en una célula.
- 25 La invención proporciona un procedimiento de modulación de la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo consistente en CSF, tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, Bcl2l1, Ccl2, Cd40, IL-6, Nos2, Socs1, Stat1 y Cxcr3, en una célula, comprendiendo dicho procedimiento administrar un modulador de microARN-155 a la célula.
- 30 Adecuadamente, cuando se añade a una célula, el modulador de microARN se administra a la célula en una cantidad eficaz para modular la expresión de uno o más de los genes diana, tales como un gen diana seleccionado del grupo consistente en CSF, tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, Bcl2l1, Ccl2, Cd40, IL-6, Nos2, Socs1, Stat1 y Cxcr3.
- 35 Adecuadamente, cuando se añade a una célula, el modulador de microARN se administra a la célula en una cantidad eficaz para modular la expresión de uno o más de los genes diana, tales como un gen diana seleccionado del grupo consistente en CSF, tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, Ccl2 e IL-6 en una célula.
- La invención proporciona un modulador de microARN-155 para su uso en la modulación de la expresión de una o más citocinas, tales como citocinas proinflamatorias, en una célula, un tejido o un organismo tal como un mamífero, tal como un ser humano.
- 40 La invención proporciona un modulador de microARN-155 para su uso en la modulación de la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo consistente en CSF, tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, Bcl2l1, Ccl2, Cd40, IL-6, Nos2, Socs1, Stat1 y Cxcr3, en una célula, un tejido o un organismo tal como un mamífero, tal como un ser humano.
- 45 La invención proporciona un modulador de microARN-155 para su uso en la modulación de la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo consistente en CSF, tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, y/o M-CSF, Ccl2 e IL-6 en una célula.
- 50 La invención proporciona un inhibidor de microARN-155 para su uso en la modulación de la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo consistente en CSF, tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, Bcl2l1, Ccl2, Cd40, IL-6, Nos2, Socs1, Stat1 y Cxcr3, en una célula.
- 55 La invención proporciona un inhibidor de microARN-155 para su uso en la modulación de la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo consistente en CSF, tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, Ccl2 e IL-6 en una célula.
- 60 La presente invención emplea un modulador de microARN para su uso en la modulación, tal como inhibición o potenciación (o suplementación) de la función (o actividad) de un microARN y la modulación así, tal como inhibición o potenciación, de la expresión de uno o más factores estimulantes de colonias tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, en una célula.
- 65 La presente invención emplea un inhibidor de microARN-155 para su uso en la inhibición de la función de microARN-155 y la reducción así de la expresión de uno o más factores estimulantes de colonias tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, en una célula.

La presente invención emplea un mimético de microARN-155 para su uso en la potenciación o suplementación de la función o actividad de un microARN y la potenciación así de la expresión de uno o más factores estimulantes de colonias tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, en una célula.

5 La invención proporciona un procedimiento de regulación negativa de uno o más factores estimulantes de colonias tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF en una célula, comprendiendo dicho procedimiento administrar un inhibidor de microARN a la célula.

10 La invención proporciona un procedimiento de modulación de la expresión de CSF, tal como uno o más de G-CSF, GMCSF y/o M-CSF, en una célula, comprendiendo dicho procedimiento administrar un inhibidor de microARN-155 a la célula.

15 Adecuadamente, cuando se añade a una célula, el modulador de microARN se administra a la célula en una cantidad eficaz para modular la expresión de uno o más de los factores CSF, tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF.

20 La invención proporciona un procedimiento de modulación de la concentración de leucocitos, tales como granulocitos y/o macrófagos y/o eosinófilos en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administración de un modulador de microARN-155 a dicho sujeto.

25 La invención proporciona un procedimiento de reducción de la concentración de leucocitos, tales como granulocitos y/o macrófagos y/o eosinófilos en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administración de un inhibidor de microARN-155 a dicho sujeto.

La invención proporciona un modulador de microARN-155 para su uso en la modulación de la expresión de uno o más CSF, tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, en una célula, un tejido o un organismo tal como un mamífero, tal como un ser humano.

30 La invención proporciona un inhibidor de microARN-155 para su uso en la regulación negativa de uno o más CSF, tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, en una célula.

La invención proporciona el uso de un inhibidor de microARN-155 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

35 La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de microARN-155, al menos un agente antiinflamatorio adicional y un diluyente, portador o coadyuvante farmacéutico.

40 Los compuestos de la invención pueden usarse en un procedimiento de potenciación del recuento de leucocitos en un paciente tal como un paciente de quimioterapia, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administración de un modulador de microARN-155, tal como la composición farmacéutica de la invención, a dicho paciente, tal como durante o después del tratamiento de quimioterapia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45 Fig.1. Inducción mediada por LPS de miR-155 en macrófagos Raw264.7 de ratón cultivados

(A). Se estimularon células Raw264.7 con las concentraciones indicadas de LPS durante 18 h y se analizó la expresión de miR-155 por PCRc. Los valores representan media \pm DE. (B) Análisis del ensayo indicador de luciferasa dual de células Raw264.7 transfectadas con el vector psiCHECK2 de luciferasa de *Renilla*/luciérnaga vacío o el vector psiCHECK2 que contiene la secuencia coincidente perfecta con miR-155 en la 3' UTR del transcrito de *Renilla*-luciérnaga (sensor de miR-155). Después de la transfección, se estimularon las células Raw264.7 con las concentraciones indicadas de LPS durante 18 h. Los valores representan media \pm DE. (C) Análisis del ensayo indicador de luciferasa dual de células Raw264.7 cotransfectadas con LNA antimir o LNA de control junto con el vector psiCHECK2 de luciferasa de *Renilla*/luciérnaga vacío (datos no mostrados) o el vector psiCHECK2 que contiene la secuencia coincidente perfecta con miR-155 en la 3' UTR del transcrito de luciferasa de *Renilla* (sensor de miR-155). Se estimularon las células Raw264.7 con LPS 100 ng/ml durante 18 h. Los valores representan media \pm DE. Los datos son representativos de tres experimentos realizados cada uno por triplicado.

60 Fig.2. Represión traduccional de isoformas de c/ebp Beta por miR-155.

(A) Visión esquemática del transcrito de c/ebp Beta. La secuencia diana de miR-155 (semilla) se indica en la 3' UTR. TAD= dominio de transactivación, bZIP= dominio de cremallera de leucina de región básica, ATG= sitio de inicio traduccional; LAP= proteína de activación transcripcional enriquecida hepáticamente; LIP= proteína inhibidora transcripcional enriquecida hepáticamente. (B) Análisis del ensayo indicador de luciferasa dual de células HeLa cotransfectadas con premiR-155 en combinación con el vector psiCHECK2 de luciferasa de *Renilla*/luciérnaga vacío,

el vector psiCHECK2 (sensor de miR-155) que contiene la secuencia coincidente perfecta con miR-155 o el vector psiCHECK2 que contiene la 3' UTR de *c/ebp Beta* en la 3' UTR del transcrito de luciferasa de *Renilla*. Los valores representan media \pm DE. Los datos son representativos de tres experimentos efectuados cada uno por triplicado. (C) Análisis de transferencia Western de las formas LAP*, LAP y LIP de *c/ebp Beta* en lisados de células Raw264.7. Se sometieron a análisis Western los lisados de células Raw264.7 cotransfectadas con premiR155 5 nM junto con LNA de control 5 nM o LNA antimir 5 nM. Paneles derechos: Las columnas muestran la cuantificación de las bandas de proteínas LIP y LAP del análisis Western. (D) Análisis de transferencia Western de las formas LAP*, LAP y LIP de *c/ebp Beta* en lisados de células Raw264.7. Se transfectaron las células Raw264.7 con las concentraciones indicadas de LNA de control o LNA antimir y se trataron con LPS 100 ng/ml durante 6 h. Paneles inferiores: Las columnas muestran la cuantificación de las bandas de proteínas LIP y LAP del análisis Western. (E) Análisis de transferencia Western de las formas LAP y LIP de *c/ebp Beta* y proteínas Pu.1 en lisados de células THP-1. Se sometieron a análisis Western los lisados celulares de células THP-1 cotransfectadas con premiR-155 5 nM conjuntamente con LNA de control 5 nM o LNA antimir 5 nM. Paneles inferiores: Las columnas muestran la cuantificación de las bandas de proteínas Pu.1 y LIP del análisis Western. Los datos son representativos de dos experimentos.

Fig.3. El miR-155 regula *c/ebp Beta* en esplenocitos de ratones tratados con LPS

(A) Microscopia confocal de linfocitos B de murino (CD19) y monocitos/macrófagos (CD11b) aislados de bazo de murino después de la dosificación intravenosa de un oligonucleótido LNA marcado con 6-carboxifluoresceína (FAM), demostrando que los oligonucleótidos LNA se captaban fácilmente por estas células. (B) Análisis de expresión por PCRc de la expresión de miR-155 en esplenocitos de ratón después de la dosificación intravenosa de LNA antimir 25 mg/kg o LNA de control 25 mg/kg durante tres días consecutivos. Se diseccionaron las muestras de bazo 2 h después de dosificar por vía intraperitoneal LPS 0,5 mg/kg. Los valores representan media \pm DE de 5 ratones en cada grupo. Valor de P (**; $p < 0,01$) mostrado por la prueba de t de Student bilateral. (C) Análisis de transferencia Western de las formas LAP y LIP de *c/ebp Beta* en esplenocitos de ratón después de dosificación intravenosa de LNA antimir 25 mg/kg o LNA de control 25 mg/kg durante tres días consecutivos. Se diseccionaron las muestras de bazo 24 h después de dosificar por vía intraperitoneal LPS 0,5 mg/kg.

Fig.4. El miR-155 media a regulación del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)

(A) Análisis de inmunomatrix por PCRc de transcritos de G-CSF normalizados a transcritos de microglobulina $\beta 2$. Se transfectaron células Raw264.7 con LNA de control 5 nM o LNA antimir 5 nM y se estimularon con LPS 100 ng/ml durante 6 h. Los valores representan media \pm DE de un experimento efectuado con 5 repeticiones. (B) Análisis de la expresión por PCRc de transcritos de G-CSF normalizados a transcritos de GAPDH después de la estimulación con LPS de células THP-1. Se cotransfectaron las células THP-1 con premiR-155 5 nM junto con LNA de control 5 nM o LNA antimir 5 nM antes de la estimulación con LPS durante 6 h. Los valores representan media \pm DE de un experimento efectuado por triplicado. Valor de P (**; $p < 0,01$) mostrado por la prueba de t de Student bilateral. (C) Análisis de la expresión por PCRc de los transcritos indicados normalizados a transcrito de GAPDH en esplenocitos de ratón después de la dosificación intravenosa de LNA antimir 25 mg/kg o LNA de control 25 mg/kg durante 3 días consecutivos. Se diseccionaron las muestras de bazo 2 h después de dosificar por vía intraperitoneal LPS 0,5 mg/kg. Los valores representan media \pm DE de 5 ratones en cada grupo. Valor de P (***) ($p < 0,001$) mostrado por la prueba de t de Student bilateral. (D) Panel izquierdo, análisis de transferencia Western de lisados de células Raw264.7 24 h después de la transfección con vectores pCDNA3 o pCDNA3-LIP, (D) panel derecho, análisis de la expresión por PCRc de transcritos de G-CSF normalizados a transcritos de GAPDH después de la transfección de células Raw264.7 con vectores pCDNA3 o pCDNA3-LIP. 24 h después de la transfección, se estimularon las células con LPS 100 ng/ml durante 6 h. Los valores representan media \pm DE. Valor de P (***) ($p < 0,001$) mostrado por la prueba de t de Student bilateral de un experimento efectuado por triplicado.

Fig. 5. Identificación de CCL2 (Mcp-1), IL-6, M-CSF (Csf1) y G-CSF (Csf3), como transcritos regulados por miR-155

Análisis de inmunomatrix por PCRc de transcritos de CCL2, IL-6, G-CSF y M-CSF normalizados a transcritos de microglobulina $\beta 2$. Se transfectaron células Raw264.7 con vehículo vacío (LPS +) o LNA antimir 5 nM (LPS + LNA antimir) antes de la estimulación con LPS 100 ng/ml durante 6 h. Los valores representan media \pm DE de un experimento efectuado con 5 repeticiones.

Fig. 6. Tabla 1. Identificación de G-CSF como transcrito regulado por miR-155.

Datos del perfil de expresión de muestras de ARN extraídas de células Raw264.7 de ratón no tratadas (sin LPS), estimuladas con LPS 100 ng/ml durante 6 h (LPS + tratamiento ficticio) o transfectadas con LNA antimir-155 (SPC3989) (LPS + antimir) 5 nM o control de LNA desaparejado (SPC4077) (LNA de control) 5 nM. Se muestran en negrita los niveles de expresión del gen *Csf3* que codifica el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Se normalizan todos los transcritos a transcritos de microglobulina $\beta 2$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Modulación de la expresión de los genes diana, tales como factores estimulantes de colonias

- 5 Se ha encontrado que los inhibidores de microARN-155 descritos en la presente memoria son potentes moduladores de un grupo de genes inmunorelacionados, incluyendo citocinas tales como citocinas proinflamatorias, CSF tales como G-CSF, GM-CSF, M-CSF, así como otros genes tales como Bcl2l1, Ccl2, Cd40, IL-6, Nos2, Socs1, Stat1 y Cxcr3. La supresión de la actividad de microARN-155 por el uso de un antimicroARN-155 daba como resultado una expresión reducida de CSF tales como G-CSF, GM-CSF, M-CSF, Bcl2l1, Ccl2, Cd40, IL-6, Nos2, Socs1 y Stat1, y una expresión potenciada de Cxcr3. El uso de un mimético de microARN-155 daba como resultado una expresión potenciada de CSF tales como G-CSF, GM-CSF, M-CSF, Bcl2l1, Ccl2, Cd40, IL-6, Nos2, Socs1 y Stat1, y una expresión reducida de Cxcr3. El antimicroARN de microARN-155 y miméticos pueden usarse por lo tanto para modular la expresión de uno o más, o incluso todos, estos genes en una célula.
- 10
- 15 En algunas realizaciones, el gen o genes diana son un gen que codifica una citocina, tal como una citocina proinflamatoria.
- Adecuadamente, el ARNm del gen diana no contiene un microARN.
- 20 El "gen o genes diana" a que se hace referencia en la presente memoria pueden ser por lo tanto uno o más genes seleccionados del grupo consistente en CSF tales como G-CSF, GM-CSF, M-CSF, Bcl2l1, Ccl2, Cd40, IL-6, Nos2, Socs1 y Stat1 y Cxcr3.
- Los genes diana preferidos incluyen uno o más o todos los factores estimulantes de colonias (CSF), tales como CSF1, CSF2 y/o CSF3, opcionalmente con uno o más de Bcl2l1, Ccl2, Cd40, IL-6, Nos2, Socs1 y Stat1 y Cxcr3.
- 25
- En algunos aspectos, el gen diana es el gen de G-CSF CSF3, tal como el gen CSF3 humano (registros de acceso a NCBI NM_172220, NM_172219 y/o NM_000759, GeneID 1440), o el gen CSF2 de ratón (registros de acceso a NCBI NM_009971, M13926).
- 30
- En algunos aspectos, el gen diana es el gen de M-CSF CSF1, tal como el CSF1 humano (registros de acceso a NCBI NM_000757, NM_172211.1, NM_172212.1 y/o NM_172210.1, GeneID: 1435), o el gen CSF1 de ratón (registros de acceso a NCBI M_007778, M21952, S78392, BC066200, BC066205, BC066187, BC025593).
- 35
- En algunos aspectos, el gen diana es el gen de GM-CSF CSF2, tal como el CSF2 humano (registros de acceso a NCBI NM_000758.2 GeneID: 1437), o el gen CSF1 de ratón (registros de acceso a NCBI NM_009969, X03221, X05906, X03019, X02333).
- 40
- En algún aspecto, los genes diana son CSF1 y CSF2; CSF2 y CSF3; CSF3 y CSF1; o CSF1, CSF2 y CSF3. La invención proporciona por lo tanto un procedimiento para la modulación simultánea de la expresión de múltiples CSF en la célula.
- En algunos aspectos, el gen diana es Cxcr3 - GeneID: 2833 (humano). En algunos aspectos, el gen diana es BCL2L1 - GeneID: 598 (humano). En algunos aspectos, el gen diana es CCL2 - GeneID: 6347 (humano). En algunos aspectos, el gen diana es CD40 - GeneID: 958 (humano). En algunos aspectos, el gen diana es STAT3 - GeneID: 6774 (humano). En algunos aspectos, el gen diana es GeneID: 6772 (humano). En algunos aspectos, el gen diana es SOCS1 - GeneID: 8651 (humano). En algunos aspectos, el gen diana es - GeneID: 4843 (humano). En algunos aspectos, el gen diana es IL-6 - GeneID: 3569 (humano).
- 45
- 50 En algunos aspectos, la modulación de la expresión es una inhibición de la expresión. En dichos casos, la administración de una cantidad eficaz de inhibidor de microARN-155 (antimicroARN) da como resultado una reducción de la concentración del ARNm y/o proteína del gen diana en la célula.
- En algunas realizaciones, el nivel de modulación (concretamente inhibición o potenciación) de la expresión del gen diana es de al menos un 10 %, tal como de al menos un 20 %, tal como de al menos un 30 %, tal como de al menos un 40 %, medido a nivel de ARN o proteína.
- 55
- Adecuadamente, el oligómero es capaz de modular la expresión de uno o más de los genes diana.
- 60
- En algunas realizaciones, el oligómero es capaz de modular la expresión de la proteína de unión al potenciador CCAAT beta (c/ebp Beta), (ARNm NM_005194.2 o NC_000020.9, proteína NP_005185.2 - registros de acceso a NCBI).
- En algunas realizaciones, el oligómero es capaz de la regulación negativa simultánea de la expresión de M-CSF, G-CSF, Ccl2 e IL-6.
- 65

En algunas realizaciones, los oligómeros de la invención efectúan la inhibición de la expresión o potencian la expresión del gen diana en al menos un 10 o 20 % en comparación con el nivel de expresión normal, más preferiblemente al menos un 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95 % en comparación con el nivel de expresión normal, medida a nivel de ARNm o proteína. En algunas realizaciones, se observa dicha modulación cuando se usan concentraciones entre 0,04 y 25 nM, tales como entre 0,8 y 20 nM, del compuesto de la invención. En la misma o una realización diferente, la modulación de la expresión es menor del 100 %, tal como menor del 98 %, menor del 95 %, menor del 90 %, menor del 80 %, tal como menor del 70 %. La modulación del nivel de expresión puede determinarse midiendo los niveles de proteína, p.ej. mediante procedimientos tales como PAGE-SDS, seguido de transferencia Western usando anticuerpos adecuados generados contra la proteína diana. Como alternativa, la modulación de los niveles de expresión puede determinarse midiendo los niveles de ARNm, p.ej. mediante transferencia Northern o PCR-TI cuantitativa.

La célula

La célula es preferiblemente una célula de mamífero, tal como una célula inmunitaria, tal como un leucocito o precursor del mismo. El término célula engloba una población de células que pueden ser, por ejemplo, leucocitos.

En algunas realizaciones, la célula puede seleccionarse del grupo consistente en células precursoras hematopoyéticas, células no hematopoyéticas, leucocitos, monocitos, macrófagos, esplenocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células dendríticas, células dendríticas inmaduras, células mieloides, células mieloides maduras, fibroblastos y células endoteliales.

En algunas realizaciones, la célula puede ser un esplenocito. En algunas realizaciones, la célula puede ser un monocito.

En algunas realizaciones, la célula puede ser una célula de médula ósea o una célula precursora de médula ósea.

En algunas realizaciones preferidas, la célula es un macrófago o una célula precursora de macrófago. En algunas realizaciones, la célula puede ser un neutrófilo o una célula precursora de neutrófilo. En algunas realizaciones, la célula puede ser un basófilo o una célula precursora de basófilo.

En algunas realizaciones, la célula está *in vivo*, tal como en un sujeto o paciente. En algunas realizaciones, la célula está *in vitro*.

Oligómero modulador de microARN

Un modulador de microARN es un compuesto que inhibe (inhibidor de microARN) o suplementa o potencia (mimético de microARN) la actividad de un microARN.

Preferiblemente, el inhibidor de microARN (antimiR) es un compuesto oligomérico (al que se hace referencia en la presente memoria como un oligómero). Adecuadamente, el oligómero es complementario (antimiR) de la secuencia de microARN o una región de la misma, aunque se considera que el oligómero puede comprender uno o más desaparejamientos con la correspondiente secuencia de microARN o complemento inverso de la misma.

En algunas realizaciones, la presente invención emplea un inhibidor de microARN, tal como un oligómero, para su uso en la inhibición de la función de un microARN y la inhibición así de la expresión de uno o más de los genes diana, tales como CSF, en una célula.

El término "oligómero", en el contexto de la presente invención, hace referencia a una molécula formada mediante ligamiento covalente de dos o más nucleótidos (concretamente un oligonucleótido). El oligómero, en algunas realizaciones tales como los oligómeros antimiR, puede consistir en o comprender una secuencia nucleotídica contigua de entre 6-30 nucleótidos de longitud. La longitud del oligómero o secuencia nucleotídica contigua del mismo puede ser de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25; 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud. Se reconocerá que, en relación con los miméticos de microARN, el tamaño del oligómero puede ser mayor, tal como de hasta 70, hasta 80, hasta 90 o hasta 100 nucleótidos de longitud, ya que pueden utilizarse miméticos de pre-microARN que se procesan en la célula formando un mimético de microARN maduro funcional. En algunos aspectos, los miméticos de microARN pueden ser de al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, menos 20 o al menos 21 nucleótidos de longitud.

En diversas realizaciones, el oligómero puede no comprender ARN (unidades), por ejemplo en algunas realizaciones de antimiR. El oligómero puede ser, en alguna realización, una molécula lineal o se sintetiza como una molécula lineal. En alguna realización, el oligómero puede ser una molécula monocatenaria, y preferiblemente no comprende regiones cortas de, por ejemplo, al menos 3, 4 o 5 nucleótidos contiguos que sean complementarias de regiones equivalentes en el mismo oligómero (concretamente dúplex); en este sentido, el oligómero puede no ser, en algunos aspectos, (esencialmente) bicatenario. En algunas realizaciones, el oligómero es esencialmente no bicatenario, tal

como no siendo un ARNip. En diversas realizaciones, el oligómero puede consistir enteramente en la región nucleotídica contigua. Por tanto, en algunas realizaciones, el oligómero no es sustancialmente autocomplementario.

5 En alguna realización, la secuencia nucleotídica contigua del oligómero es de entre 6-12 nucleótidos de longitud, tal como de 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 unidades nucleobásicas, en la que al menos un 50 % de las unidades nucleobásicas del oligómero consisten en análogos nucleotídicos tales como, cuando el oligómero es un antimiR, análogos nucleotídicos de LNA.

10 En algunas realizaciones, la nucleobase 3' del oligómero antimiR corresponde al nucleótido 5' de la región de semilla del microARN, y el antimiR comprende una secuencia nucleotídica contigua, que es totalmente complementaria de la secuencia de semilla del microARN, y opcionalmente entre 1 y 15 nucleótidos adicionales, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, tales como uno o dos nucleótidos adicionales correspondientes a los nucleótidos de microARN en 3' de la secuencia de semilla.

15 En una realización, el oligómero no comprende un nucleótido que corresponda al primer nucleótido presente en la secuencia de microARN contando desde el extremo 5'.

20 En una realización, al menos un 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 % o todas las unidades nucleotídicas de la secuencia nucleotídica contigua son unidades análogas a nucleótidos, tales como análogos nucleotídicos de alta afinidad. Los análogos nucleotídicos de alta afinidad son análogos nucleotídicos que dan como resultado oligonucleótidos que tienen una estabilidad térmica de dúplex mayor con un nucleótido de ARN complementario que la afinidad de unión de un nucleótido de ADN equivalente. Esto se determina típicamente midiendo la T_m .

25 En una realización, las unidades análogas a nucleótidos presentes en la secuencia nucleotídica contigua se seleccionan del grupo consistente en unidad de 2'-O-alkil-ARN, unidad de 2'-OMe-ARN, unidad de 2'-amino-ADN, unidad de 2'-fluoro-ADN, unidad de LNA, unidad de PNA, unidad de HNA, unidad de INA y unidad de 2'MOE-ARN.

MicroARN-155

30 El microARN es preferiblemente microARN-155 o un precursor del mismo tal como microARN-155 de mamífero, tal como microARN-155 humano o de ratón; las secuencias de pre-miR y miR-155 maduro se proporcionan a continuación:

```
>hsa-mir-155 MI0000681 (SEQ ID NO 1)
CUGUAAUUGC UAAUCGUGAUAGGGGUUUUGCCUCCAACUGACUCCUACAUAUUAGCAUUAACAG
>hsa-miR-155 MIMAT0000646 (SEQ ID NO 2)
UAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
>mmu-mir-155 MI0000177 (SEQ ID NO 3)
CUGUAAUUGC UAAUUGUGAUAGGGGUUUUGGCCUCUGACUGACUCCUACCUGUUAGCAUUAACAG
>mmu-miR-155 MIMAT0000165 (SEQ ID NO 4)
UAAUGCUAAUUGUGAUAGGGGU
```

(Se muestran las regiones de semilla, de la posición 2-7 u 8 de los microARN maduros)

35 *Inhibidor de microARN (antimir)*

Se ha encontrado en la presente memoria que el microARN-155 antimiR potencia la expresión de Cxcr3 en una célula.

40 Se ha encontrado en la presente memoria que el microARN-155 antimiR inhibe la expresión de los siguientes genes diana en una célula: CSF tales como G-CSF, GM-CSF y/o M-CSF, Bcl2l1, Ccl2, Cd40, IL-6, Nos2, Socs1 y Stat1.

45 Pueden usarse inhibidores de microARN-155 (antimiR) para inhibir la expresión de citocinas proinflamatorias en una célula.

En algunas realizaciones, el inhibidor de microARN es, o puede comprender, un oligómero de entre 6 y 30 nucleótidos contiguos de longitud. Adecuadamente, el inhibidor de microARN puede ser un oligómero monocatenario que consiste en o comprende una secuencia nucleotídica contigua que es totalmente complementaria de la correspondiente región de una secuencia seleccionada de una cualquiera de las SEQ ID 1, 2, 3 o 4, o comprende no más de 1 o 2 desaparejamientos con el complemento inverso de una secuencia seleccionada de las SEQ ID 1, 2, 3 o 4, o una región correspondiente de la misma. Aunque se reconoce que los oligómeros antimiR pueden consistir en o comprender una secuencia nucleotídica contigua que es complementaria de la secuencia de microARN entera (tal como la SEQ ID NO 2), pueden ser altamente eficaces oligómeros más cortos que sean complementarios de una subsecuencia de la secuencia de microARN, especialmente cuando comprenden análogos nucleotídicos potenciadores de la afinidad, tales como unidades de LNA. La longitud de la secuencia nucleotídica contigua del oligómero puede ser, por ejemplo, de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 nucleótidos

consecutivos que son totalmente complementarios de la SEQ ID NO 2, o que comprenden no más de 1 o 2 desaparejamientos con el complemento inverso de la SEQ ID NO 2 o subsecuencia de la misma, y preferiblemente comprenden una región que es totalmente complementaria de la región de semilla de microARN-155. Se ha encontrado que los antimiR fuertemente modificados son particularmente eficaces: WO2007/112754, WO2007/112753, solicitud EP número 08104780 y solicitudes provisionales de EE.UU. 60/979217 y US 61/028062 proporcionan inhibidores de microARN que pueden usarse en la presente invención.

En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica contigua consiste en o comprende una secuencia que es complementaria (tal como 100 % complementaria) de la secuencia de semilla de dicho microARN (concretamente, un "semillómero") tal como miR-155

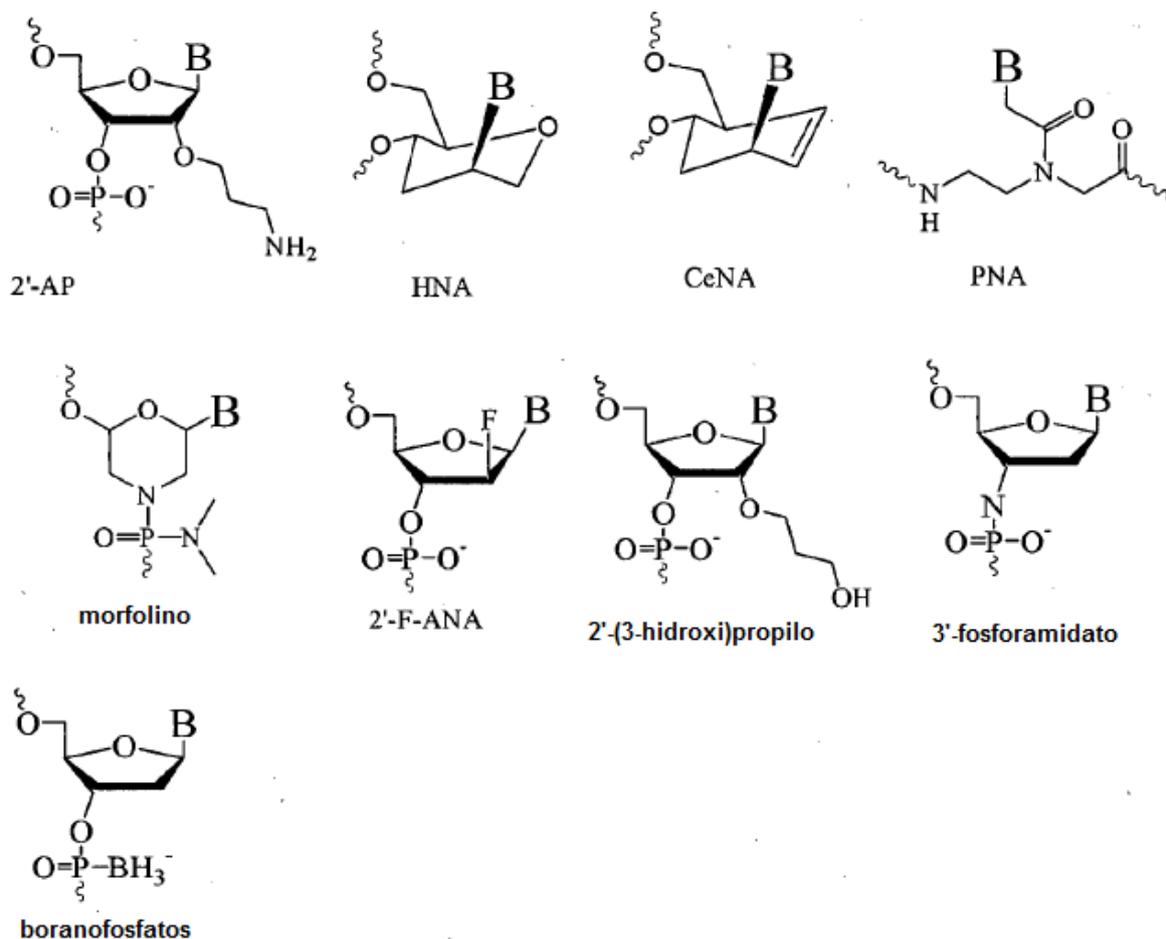
Preferiblemente, el oligómero antimiR comprende análogos nucleotídicos, tales como LNA, que forman parte de o pueden formar la secuencia nucleotídica contigua entera

En una realización del oligómero antimiR, al menos un 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 % o todas las unidades nucleobásicas de la secuencia nucleotídica contigua son unidades nucleobásicas de ácido nucleico bloqueado (LNA). En una realización, todas las unidades nucleobásicas de la secuencia nucleotídica contigua del oligómero antimiR son unidades nucleobásicas de LNA. En una realización del oligómero antimiR, la secuencia nucleotídica contigua comprende o consiste en 7, 8, 9 o 10, unidades análogas a nucleótidos preferiblemente contiguas tales como unidades nucleobásicas de LNA.

Aunque se prevé que puedan ser útiles otros análogos nucleotídicos, tales como 2'-MOE-ARN o 2'-fluoronucleótidos, en los oligómeros antimiR según la invención, en algunas realizaciones los oligómeros tienen una alta proporción, tal como al menos un 50 %, de nucleótidos de LNA. En una realización, al menos un 75 %, tal como un 80 u 85 o 90 o 95 % o todos los ligamientos internucleosídicos presentes entre las bases nucleobásicas de la secuencia nucleotídica contigua son ligamientos internucleosídicos de fosforotioato. En una realización, dicho oligómero se conjuga con uno o más compuestos no nucleobásicos. En una realización, el oligómero está constituido como un profármaco.

La siguiente tabla proporciona ejemplos de inhibidores de microARN-155 que pueden usarse:

diana: hsa-miR-155 MIMAT0000646 - AntimiRs:	
5'-CCCCtatcagcattagcaTTAA-3'	SEQ ID NO: 5
5'-cccctaTCACGATTagcattaa-3'	SEQ ID NO: 6
5'-cCccTatCacGatTagCatTaa-3'	SEQ ID NO: 7
5'-TcAcgATtaGcAtTA-3'	SEQ ID NO: 8
5'-TcAcGATtaGCAtTA-3'	SEQ ID NO: 9
5'-ACGATtAGCaTA-3'	SEQ ID NO: 10
5'-GATtAGCaTTA-3'	SEQ ID NO: 11
5'-TC ^M AC ^M G ^M ATTA ^M GC ^M AT ^M TA-3'	SEQ ID NO: 12
5'-TC ^F AC ^F G ^F ATT ^F AF ^F GC ^F FAT ^F TA-3'	SEQ ID NO: 13
5'- cCcCtAtCaCgAtTaGcAtTaa -3'	SEQ ID NO: 14
5'- tcAcgAttAgcAttAa -3'	SEQ ID NO: 15
5'- tCaCgAtTaGcAtTa -3'	SEQ ID NO: 16
5' - TcAcAATtaGCAtTA -3'	SEQ ID NO: 17
5' - TcAaCATtaGACtTA -3'	SEQ ID NO: 18
5' -TATGTAGGA -3'	SEQ ID NO: 19
5' -TTAGCATTAA-3'	SEQ ID NO: 20
5' -TAGCATTAA -3'	SEQ ID NO: 21
5' -AGCATTAA-3'	SEQ ID NO: 22
5' -TATGTAGGA -3'	SEQ ID NO: 23
5' -ATGTAGGA -3'	SEQ ID NO: 24
5' -TGTAGGA-3'	SEQ ID NO: 25



Esquema 1

- 5 El oligómero puede por tanto comprender o consistir en una secuencia sencilla de nucleótidos de origen natural, preferiblemente 2'-desoxinucleótidos (a los que se hace referencia aquí en general como "ADN"), pero también posiblemente ribonucleótidos (a los que se hace referencia aquí en general como "ARN"), o una combinación de dichos nucleótidos de origen natural y uno o más nucleótidos de origen no natural, concretamente análogos nucleotídicos. Dichos análogos nucleotídicos pueden potenciar adecuadamente la afinidad del oligómero por la secuencia diana.

Se proporcionan ejemplos de análogos nucleotídicos adecuados y preferidos en el documento WO2007/031091 o se referencian en el mismo.

- 15 La incorporación de análogos nucleotídicos potenciadores de la afinidad al oligómero, tales como LNA o azúcares 2'-sustituidos, puede permitir reducir el tamaño de los oligómeros de unión específica, y puede reducir también el límite superior del tamaño del oligómero antes de que tenga lugar una unión no específica o aberrante.

- 20 En algunas realizaciones, el oligómero comprende al menos 2 análogos nucleotídicos. En algunas realizaciones, el oligómero comprende 3-8 análogos nucleotídicos, p.ej. 6 o 7 análogos nucleotídicos. En las realizaciones de anti-miR más preferidas de lejos, al menos uno de dichos análogos nucleotídicos es un ácido nucleico bloqueado (LNA), por ejemplo al menos 3 o al menos 4 o al menos 5 o al menos 6 o al menos 7 u 8 de los análogos nucleotídicos pueden ser LNA. En algunas realizaciones, todos los análogos nucleotídicos pueden ser LNA.

- 25 Se reconocerá que, cuando se hace referencia a un motivo de secuencia nucleotídica o secuencia nucleotídica preferido que consiste en solo nucleótidos, los oligómeros de la invención que se definen por esa secuencia pueden comprender el correspondiente análogo nucleotídico en lugar de uno o más de los nucleótidos presentes en dicha secuencia, tales como unidades de LNA u otros análogos nucleotídicos que eleven la estabilidad del dúplex/ T_m del dúplex oligómero/diana (concretamente, análogos nucleotídicos potenciadores de la afinidad).

30

Los ejemplos de dicha modificación del nucleótido incluyen modificar el resto de azúcar proporcionando un grupo sustituyente 2' o produciendo una estructura de puente (ácido nucleico bloqueado) que potencia la afinidad de unión y puede proporcionar también una resistencia a nucleasa aumentada.

5 Es un análogo nucleotídico preferido para los oligómeros antimir el LNA, tal como oxi-LNA (tales como β -D-oxi-LNA y α -L-oxi-LNA), y/o amino-LNA (tales como β -D-amino-LNA y α -L-amino-LNA) y/o tio-LNA (tales como β -D-tio-LNA y α -L-tio-LNA) y/o ENA (tales como β -D-ENA y α -L-ENA). El más preferido es β -D-oxi-LNA.

10 En algunas realizaciones, los análogos nucleotídicos presentes en el oligómero se seleccionan independientemente, por ejemplo, de: unidades de 2'-O-alkil-ARN, unidades de 2'-amino-ADN, unidades de 2'-fluoro-ADN, unidades de LNA, unidades de ácido arabinonucleico (ANA), unidades de 2'-fluoro-ANA, unidades de HNA, unidades de INA (ácido nucleico intercalante -Christensen, 2002. Nucl. Acids. Res. 2002 30: 4918-4925) y unidades de 2'MOE. En algunas realizaciones, hay solo uno de los tipos anteriores de análogos nucleotídicos presentes en el oligómero de la invención, o la secuencia nucleotídica contigua del mismo.

15 En algunas realizaciones, los análogos nucleotídicos son 2'-O-metoxietil-ARN (2'MOE), monómeros de 2'-fluoro-ADN o análogos nucleotídicos de LNA, y como tal el oligómero antimir puede comprender análogos nucleotídicos que se seleccionan independientemente de estos tres tipos de análogo, o pueden comprender solo un tipo de análogo seleccionado de los tres tipos. En algunas realizaciones, al menos uno de dichos análogos nucleotídicos es 2'-MOE-ARN, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 unidades nucleotídicas de 2'-MOE-ARN. En algunas realizaciones, al menos uno de dichos análogos nucleotídicos es 2'-fluoro-ADN tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 unidades nucleotídicas de 2'-fluoro-ADN.

25 En algunas realizaciones, el oligómero antimir comprende al menos una unidad de ácido nucleico bloqueado (LNA) tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 unidades de LNA, tal como entre 3-7 o 4 a 8 unidades de LNA, o 3, 4, 5, 6 o 7 unidades de LNA. En algunas realizaciones, todos los análogos nucleotídicos son LNA. En algunas realizaciones, el oligómero antimir puede comprender tanto β -D-oxi-LNA como uno o más de las siguientes unidades de LNA: tio-LNA, amino-LNA, oxi-LNA y/o ENA en cualquiera de las configuraciones β -D o α -L o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, todas las unidades de citosina de LNA son 5'-metil-citosina. En algunas realizaciones de la invención, el oligómero antimir puede comprender tanto unidades de LNA como ADN. Preferiblemente, el total combinado de unidades de LNA y ADN es de 10-25, preferiblemente 10-20, aún más preferiblemente 12-16. En algunas realizaciones de la invención, la secuencia nucleotídica del oligómero antimir, tal como la secuencia nucleotídica contigua, consiste en al menos un LNA y las unidades nucleotídicas restantes son unidades de ADN. En algunas realizaciones, el oligómero antimir comprende solo análogos nucleotídicos de LNA y nucleótidos de origen natural (tales como nucleótidos de ARN o ADN, lo más preferiblemente ADN), opcionalmente con ligamientos internucleotídicos modificados tales como fosforotioato.

35 El término "nucleobase" hace referencia al resto básico de un nucleótido y cubre tanto las variantes de origen natural como de origen no natural. Por tanto, "nucleobase" cubre no solo los heterociclos de purina y pirimidina conocidos, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de los mismos.

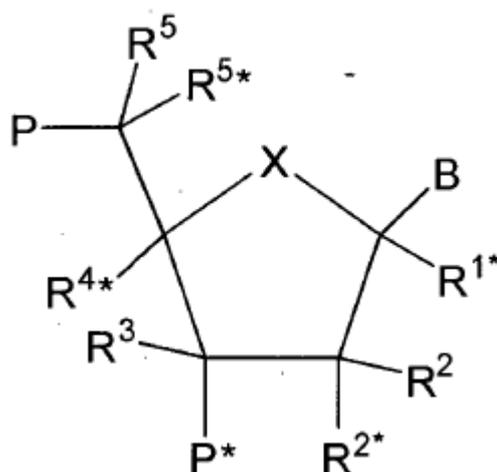
40 Los ejemplos de nucleótidos incluyen, pero sin limitación, adenina, guanina, citosina, timidina, uracilo, xantina, hipoxantina, 5-metilcitosina, isocitosina, seudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina.

45 En algunas realizaciones, al menos uno de los nucleótidos presentes en el oligómero es una nucleobase modificada seleccionada del grupo consistente en 5-metilcitosina, isocitosina, seudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina.

50 *LNA*

El término "LNA" hace referencia a un análogo nucleotídico bicíclico conocido como "ácido nucleico bloqueado". Puede hacer referencia a un monómero de LNA o, cuando se usa en el contexto de un "oligonucleótido de LNA", LNA hace referencia a un oligonucleótido que contiene uno o más de dichos análogos nucleotídicos bicíclicos. Los nucleótidos de LNA se caracterizan por la presencia de un "puente" dirradicálico entre C2' y C4' del anillo de azúcar ribosa, por ejemplo como se muestra en el dirradical R¹-R² como se describe a continuación.

El LNA usado en los compuestos oligonucleotídicos de la invención tiene preferiblemente la estructura de fórmula general I



Fórmula I

en la que para todos los centros quirales pueden encontrarse grupos asimétricos en orientación R o S;
 en la que X se selecciona de -O-, -S-, -N(R^N)-, -C(R⁶R^{6*})-, tales como en algunas realizaciones -O-;

5 B se selecciona de hidrógeno, alcoxilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido, alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido, acil C₁₋₄-oxilo opcionalmente sustituido, nucleobases que incluyen de origen natural y análogos nucleobásicos, intercalantes de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores y ligandos;

10 P designa un ligamiento internucleotídico con un monómero adyacente, o un grupo 5'-terminal, incluyendo opcionalmente dicho ligamiento internucleotídico o grupo 5'-terminal el sustituyente R⁵ o siendo igualmente aplicable el sustituyente R^{5*};

P* designa un ligamiento internucleotídico con un monómero adyacente o un grupo 3'-terminal;

15 R^{4*} y R^{2*} designan conjuntamente un dirradical consistente en 1-4 grupos/átomos seleccionados de -C(R^aR^b)-, -C(R^a)=C(R^b)-, -C(R^a)=N-, -O-, -Si(R^a)₂-, -S-, -SO₂-, -N(R^a)- y >C=Z, en la que Z se selecciona de -O-, -S- y -N(R^a)-, y R^a y R^b se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido, alqueno C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, alquino C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxilo C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido, alcoxi C₂₋₁₂-alquilo, alqueno C₂₋₁₂-oxilo, carboxilo, alcoxi C₁₋₁₂-carbonilo, alquil C₁₋₁₂-carbonilo, formilo, arilo, ariloxycarbonilo, ariloxilo, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxycarbonilo, heteroariloxilo, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y dialquil C₁₋₆-amino, carbamoilo, mono- y dialquil C₁₋₆-aminocarbonilo, aminoalquil C₁₋₆-aminocarbonilo, mono- y dialquil C₁₋₆-aminoalquil C₁₋₆-aminocarbonilo, alquil C₁₋₆-carbonilamino, carbamido, alcanoil C₁₋₆-oxilo, sulfono, alquil C₁₋₆-sulfoniloxilo, nitro, azido, sulfanilo, alquil C₁₋₆-tio, halógeno, intercalantes de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores y ligandos, en que arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos y en que dos sustituyentes geminales R^a y R^b pueden designar conjuntamente metileno (=CH₂)opcionalmente sustituido, en el que para todos los centros quirales pueden encontrarse grupos asimétricos en orientación R o S; y

25 cada uno de los sustituyentes R^{1*}, R², R³, R⁵, R^{5*}, R⁶ y R^{6*} que están presentes se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido, alqueno C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, alquino C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxilo C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido, alcoxi C₂₋₁₂-alquilo, alqueno C₂₋₁₂-oxilo, carboxilo, alcoxi C₁₋₁₂-carbonilo, alquil C₁₋₁₂-carbonilo, formilo, arilo, ariloxycarbonilo, ariloxilo, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxycarbonilo, heteroariloxilo, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y dialquil C₁₋₆-amino, carbamoilo, mono- y dialquil C₁₋₆-aminocarbonilo, aminoalquil C₁₋₆-aminocarbonilo, mono- y dialquil C₁₋₆-aminoalquil C₁₋₆-aminocarbonilo, alquil C₁₋₆-carbonilamino, carbamido, alcanoil C₁₋₆-oxilo, sulfono, alquil C₁₋₆-sulfoniloxilo, nitro, azido, sulfanilo, alquil C₁₋₆-tio, halógeno, intercalantes de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores y ligandos, en que arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos, y en que dos sustituyentes geminales pueden designar conjuntamente oxo, tioxo, imino o metileno opcionalmente sustituido;

30 en la que R^N se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄ y en que dos sustituyentes adyacentes (no geminales) pueden designar un enlace adicional dando como resultado un doble enlace; y R^{N*}, cuando está presente y no implicado en un dirradical, se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄; y sales básicas y sales de adición de ácido de los mismos. Para todos los centros quirales, pueden encontrarse grupos asimétricos en cualquier orientación R o S.

45 En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} designan conjuntamente un dirradical consistente en un grupo seleccionado del grupo consistente en C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-, C(R^aR^b)-O-, C(R^aR^b)-NR^a-, C(R^aR^b)-S- y C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-O-, en el que cada R^a y R^b opcionalmente pueden seleccionarse independientemente. En algunas realizaciones, R^a y R^b pueden opcionalmente seleccionarse independientemente del grupo consistente en hidrógeno y alquilo C₁₋₆, tal como metilo, tal como hidrógeno.

En algunas realizaciones, R^{1*}, R², R³, R⁵ y R^{5*} se seleccionan independientemente del grupo consistente en hidrógeno, halógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alqueno C₂₋₆, alqueno C₂₋₆ sustituido, alquino C₂₋₆ o

alquinilo C₂₋₆ sustituido, alcoxilo C₁₋₆, alcoxilo C₁₋₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C₁₋₆ o aminoalquilo C₁₋₆ sustituido. Para todos los centros quirales, pueden encontrarse grupos asimétricos en cualquier orientación R o S.

5 En algunas realizaciones, R^{1*}, R², R³, R⁵ y R^{5*} son hidrógeno.

En algunas realizaciones, R^{1*}, R² y R³ se seleccionan independientemente del grupo consistente en hidrógeno, halógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alqueno C₂₋₆, alqueno C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆ o alquinilo C₂₋₆ sustituido, alcoxilo C₁₋₆, alcoxilo C₁₋₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C₁₋₆ o aminoalquilo C₁₋₆ sustituido. Para todos los centros quirales, pueden encontrarse grupos asimétricos en cualquier orientación R o S.

En algunas realizaciones, R^{1*}, R² y R³ son hidrógeno.

15 En algunas realizaciones, R⁵ y R^{5*} se seleccionan cada uno independientemente del grupo consistente en H, -CH₃, -CH₂-CH₃, -CH₂-O-CH₃ y -CH=CH₂. Adecuadamente en algunas realizaciones, cualquiera de R⁵ o R^{5*} es hidrógeno, en que el otro grupo (R⁵ o R^{5*} respectivamente) se selecciona del grupo consistente en alquilo C₁₋₅, alqueno C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alqueno C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆ sustituido o acilo sustituido (-C(=O)-); en los que cada grupo sustituido está mono- o polisustituido con grupos sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alqueno C₂₋₆, alqueno C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, N₃, COOJ₁, CN, OC(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=NH)NRR₂ o N(H)C(=X)N(H)J₂, en la que X es O o S; y cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alqueno C₁₋₆, alqueno C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ sustituido, aminoalquilo C₁₋₆, aminoalquilo C₁₋₆ sustituido o un grupo protector. En algunas realizaciones, cualquiera de R⁵ o R^{5*} es alquilo C₁₋₆ sustituido. En algunas realizaciones, cualquiera de R⁵ o R^{5*} es metileno sustituido en el que los grupos sustituyentes preferidos incluyen uno o más grupos seleccionados independientemente de F, NJ₁J₂, N₃, CN, OJ₁, SJ₁, O-C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=NH)NJ₂ o N(H)C(O)N(H)J₂. En algunas realizaciones, cada J₁ y J₂ es, independientemente, H o alquilo C₁₋₆. En algunas realizaciones, cualquiera de R⁵ o R^{5*} es metilo, etilo o metoximetilo. En algunas realizaciones, cualquiera de R⁵ o R^{5*} es metilo. En una realización adicional, cualquiera de R⁵ o R^{5*} es etilenilo. En algunas realizaciones, cualquiera de R⁵ o R^{5*} es acilo sustituido. En algunas realizaciones, cualquiera de R⁵ o R^{5*} es C(=O)NJ₁J₂. Para todos los centros 20 25 30 quirales, pueden encontrarse grupos asimétricos en cualquier orientación R o S. Dichos nucleótidos bicíclicos 5' modificados se dan a conocer en el documento WO 2007/134181.

En algunas realizaciones, B es una nucleobase, incluyendo análogos nucleobásicos y nucleobases de origen natural tales como una purina o pirimidina, o una purina sustituida o pirimidina sustituida, tales como una nucleobase a la que se hace referencia en la presente memoria, tales como una nucleobase seleccionada del grupo consistente en adenina, citosina, timina, adenina, uracilo y/o una nucleobase modificada o sustituida, tal como 5-tiazolouracilo, 2-tiouracilo, 5-propiniluracilo, 2'-tiotimina, 5-metilcitosina, 5-tiozolocitosina, 5-propinilcitosina y 2,6-diaminopurina.

40 En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} designan conjuntamente un dirradical seleccionado de -C(R^aR^b)-O-, -C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-O-, -C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-C(R^eR^f)-O-, -C(R^aR^b)-O-C(R^cR^d)-, -C(R^aR^b)-O-C(R^cR^d)-O-, -C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-, -C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-C(R^eR^f)-, -C(R^a)=C(R^b)-C(R^cR^d)-, -C(R^aR^b)-N(R^c)-, -C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-N(R^e)-, -C(R^aR^b)-N(R^c)-O- y -C(R^aR^b)-S-, -C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-S-, en los que R^a, R^b, R^c, R^d, R^e y R^f se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido, alqueno C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, alquinilo C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxilo C₁₋₁₂, alcoxi C₂₋₁₂-alquilo, alqueno C₂₋₁₂-oxilo, carboxilo, alcoxi C₁₋₁₂-carbonilo, alquil C₁₋₁₂-carbonilo, formilo, arilo, ariloxycarbonilo, ariloxilo, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxycarbonilo, heteroariloxilo, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y dialquil C₁₋₆-amino, carbamoilo, mono- y dialquil C₁₋₆-aminocarbonilo, aminoalquil C₁₋₆-aminocarbonilo, mono- y dialquil C₁₋₆-aminoalquil C₁₋₆-aminocarbonilo, alquil C₁₋₆-carbonilamino, carbamido, alcanilo C₁₋₆-oxilo, sulfono, alquil C₁₋₆-sulfoniloxilo, nitro, azido, sulfanilo, alquil C₁₋₆-tio, halógeno, intercalantes de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores y ligandos, en que arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos, y en que dos sustituyentes geminales R^a y R^b pueden designar conjuntamente metileno opcionalmente sustituido (=CH₂). Para todos los centros quirales, pueden encontrarse grupos asimétricos en cualquier orientación R o S.

55 En una realización adicional, R^{4*} y R^{2*} designan conjuntamente un dirradical (grupo divalente) seleccionado de -CH₂-O-, -CH₂-S-, -CH₂-NH-, -CH₂-N(CH₃)-, -CH₂-CH₂-O-, -CH₂-CH(CH₃)-, -CH₂-CH₂-S-, -CH₂-CH₂-NH-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-, -CH₂-CH₂-CH(CH₃)-, -CH=CH-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-O-, -CH₂-NH-O-, -CH₂-N(CH₃)-O-, -CH₂-O-CH₂-, -CH(CH₃)-O- y -CH(CH₂-O-CH₃)-O- y/o, -CH₂-CH₂ y -CH=CH-. Para todos los centros quirales, pueden encontrarse grupos asimétricos en cualquier orientación R o S.

60 En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} designan conjuntamente el dirradical C(R^aR^b)-N(R^c)-O-, en el que R^a y R^b se seleccionan independientemente del grupo consistente en hidrógeno, halógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alqueno C₂₋₆, alqueno C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆ o alquinilo C₂₋₆ sustituido, alcoxilo C₁₋₆, alcoxilo C₁₋₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C₁₋₆ o aminoalquilo C₁₋₆ sustituido, tal como hidrógeno y; en los que R^c se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, halógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alqueno C₂₋₆, alqueno C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆ o alquinilo C₂₋₆ sustituido, alcoxilo C₁₋₆, alcoxilo C₁₋₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C₁₋₆ o aminoalquilo C₁₋₆ sustituido, tal como hidrogeno.

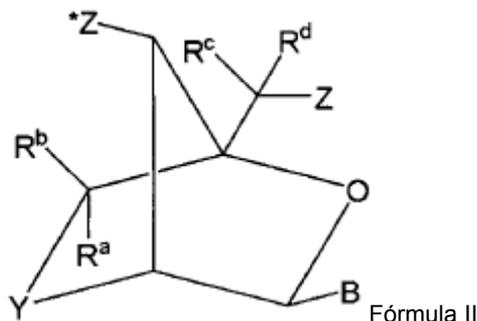
En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} designan conjuntamente el dirradical $C(R^aR^b)-O-C(R^cR^d)-O-$, en el que R^a , R^b , R^c y R^d se seleccionan independientemente del grupo consistente en hidrógeno, halógeno, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, alquenoilo C_{2-6} , alquenoilo C_{2-6} sustituido, alquinoilo C_{2-6} o alquinoilo C_{2-6} sustituido, alcoxilo C_{1-6} , alcoxilo C_{1-6} sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_{1-6} o aminoalquilo C_{1-6} sustituido, tal como hidrógeno.

En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} forman el dirradical $-CH(Z)-O-$, en el que Z se selecciona del grupo consistente en alquilo C_{1-6} , alquenoilo C_{2-6} , alquinoilo C_{2-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, alquenoilo C_{2-6} sustituido, alquinoilo C_{2-6} sustituido, acilo, acilo sustituido, amida sustituida, tiol o tio sustituido; y en el que cada uno de los grupos sustituidos está, independientemente, mono- o polisustituido con grupos sustituyentes opcionalmente protegidos independientemente seleccionados de halógeno, oxo, hidroxilo, OJ_1 , NJ_1J_2 , SJ_1 , N_3 , $OC(=X)J_1$, $OC(=X)NJ_1J_2$, $NJ_3C(=X)NJ_1J_2$ y CN , en los que cada J_1 , J_2 y J_3 es, independientemente, H o alquilo C_{1-6} y X es O, S o NJ_1 . En algunas realizaciones, Z es alquilo C_{1-6} o alquilo C_{1-6} sustituido. En algunas realizaciones, Z es metilo. En algunas realizaciones, Z es alquilo C_{1-6} sustituido. En algunas realizaciones, dicho grupo sustituyente es alcoxilo C_{1-6} . En algunas realizaciones, Z es CH_3OCH_2- . Para todos los centros quirales, pueden encontrarse grupos asimétricos en cualquiera de las orientaciones R o S. Dichos nucleótidos bicíclicos se dan a conocer en el documento US 7.399.845. En algunas realizaciones, R^{1*} , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} son hidrógeno. En algunas realizaciones, R^{1*} , R^2 y R^{3*} son hidrógeno, y uno o ambos de R^5 y R^{5*} pueden ser distintos de hidrógeno como se hace referencia anteriormente y en el documento WO 2007/134181.

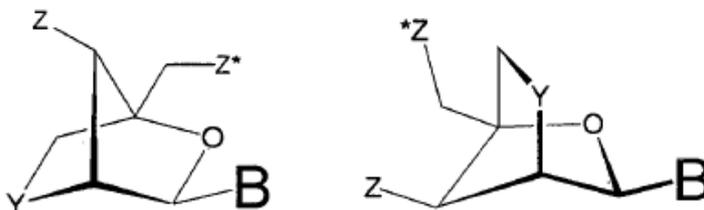
En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} designan conjuntamente un dirradical que comprende un grupo amino sustituido en el puente, tal como consiste en o comprende el dirradical $-CH_2-N(R^c)-$, en el que R^c es alquil C_{1-12} -oxilo. En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} designan conjuntamente un dirradical $-Cq_3q_4-NOR-$, en el que q_3 y q_4 se seleccionan independientemente del grupo consistente en hidrógeno, halógeno, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, alquenoilo C_{2-6} , alquenoilo C_{2-6} sustituido, alquinoilo C_{2-6} o alquinoilo C_{2-6} sustituido, alcoxilo C_{1-6} , alcoxilo C_{1-6} sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_{1-6} o aminoalquilo C_{1-6} sustituido; en los que cada grupo sustituido está, independientemente, mono- o polisustituido con grupos sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, OJ_1 , SJ_1 , NJ_1J_2 , $COOJ_1$, CN , $O-C(=O)NJ_1J_2$, $N(H)C(=NH)NJ_1J_2$ o $N(H)C(=X=N(H))J_2$, en los que X es O o S; y cada uno de J_1 y J_2 es, independientemente H, alquilo C_{1-6} , alquenoilo C_{2-6} , alquinoilo C_{2-6} , aminoalquilo C_{1-6} o un grupo protector. Para todos los centros quirales, pueden encontrarse grupos asimétricos en cualquiera de las orientaciones R o S. Se dan a conocer dichos nucleótidos bicíclicos en el documento WO2008/150729. En algunas realizaciones, se seleccionan independientemente R^{1*} , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} de grupo consistente en hidrógeno, halógeno, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, alquenoilo C_{2-6} , alquenoilo C_{2-6} sustituido, alquinoilo C_{2-6} o alquinoilo C_{2-6} sustituido, alcoxilo C_{1-6} , alcoxilo C_{1-6} sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_{1-6} o aminoalquilo C_{1-6} sustituido. En algunas realizaciones, R^{1*} , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} son hidrógeno. En algunas realizaciones, R^{1*} , R^2 y R^3 son hidrógeno y uno o ambos de R^5 y R^{5*} pueden ser distintos de hidrógeno como se hace referencia anteriormente y en el documento WO 2007/134181. En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} designan conjuntamente un dirradical (grupo divalente) $C(R^aR^b)-O-$, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente halógeno, alquilo C_{1-12} , alquilo C_{1-12} sustituido, alquenoilo C_{2-12} , alquenoilo C_{2-12} sustituido, alquinoilo C_{2-12} , alquinoilo C_{2-12} sustituido, alcoxilo C_{1-12} , alcoxilo C_{1-12} sustituido, OJ_1 , SJ_1 , SOJ_1 , SO_2J_1 , NJ_1J_2 , N_3 , CN , $C(=O)OJ_1$, $C(=O)NJ_1J_2$, $C(=O)J_1$, $O-C(=O)NJ_1J_2$, $N(H)C(=NH)NJ_1J_2$, $N(H)C(=O)NJ_1J_2$ o $N(H)C(=S)NJ_1J_2$; o R^a y R^b son conjuntamente $=C(q_3)(q_4)$; q_3 y q_4 son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C_{1-12} o alquilo C_{1-12} sustituido; cada grupo sustituido está, independientemente, mono- o polisustituido con grupos sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, alquenoilo C_{2-6} , alquenoilo C_{2-6} sustituido, alquinoilo C_{2-6} , alquinoilo C_{2-6} sustituido, OJ_1 , SJ_1 , NJ_1J_2 , N_3 , CN , $C(=O)OJ_1$, $C(=O)NJ_1J_2$, $C(=O)J_1$, $O-C(=O)NJ_1J_2$, $N(H)C(=O)NJ_1J_2$ o $N(H)C(=S)NJ_1J_2$ y cada uno de J_1 y J_2 es, independientemente, H, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, alquenoilo C_{2-6} , alquenoilo C_{2-6} sustituido, alquinoilo C_{2-6} , alquinoilo C_{2-6} sustituido, aminoalquilo C_{1-6} , aminoalquilo C_{1-6} sustituido o un grupo protector. Dichos compuestos se dan a conocer en el documento WO2009006478A, incorporado por la presente en su totalidad como referencia.

En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} forman el dirradical $-Q-$, en el que Q es $C(q_1)(q_2)C(q_3)(q_4)$, $C(q_1)=C(q_3)$, $C=C(q_1)(q_2)-C(q_3)(q_4)$ o $C(q_1)(q_2)-C=C(q_3)(q_4)$; q_1 , q_2 , q_3 y q_4 son cada uno independientemente H, halógeno, alquilo C_{1-12} , alquilo C_{1-12} sustituido, alquenoilo C_{2-12} , alcoxilo C_{1-12} sustituido, OJ_1 , SJ_1 , SOJ_1 , SO_2J_1 , NJ_1J_2 , N_3 , CN , $C(=O)OJ_1$, $C(=O)NJ_1J_2$, $C(=O)J_1$, $-C(=O)NJ_1J_2$, $N(H)C(=NH)NJ_1J_2$, $N(H)C(=O)NJ_1J_2$ o $N(H)C(=S)NJ_1J_2$; cada J_1 y J_2 es, independientemente, H, alquilo C_{1-6} , alquenoilo C_{2-6} , alquinoilo C_{2-6} , aminoalquilo C_{1-6} o un grupo protector; y, opcionalmente, en los que cuando Q es $C(q_1)(q_2)(q_3)(q_4)$ y uno de q_3 o q_4 es CH_3 , entonces al menos uno de los otros de q_3 o q_4 o uno de q_1 y q_2 es distinto de H. En algunas realizaciones, R^{1*} , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} son hidrógeno. Para todos los centros quirales, pueden encontrarse grupos asimétricos en cualquier orientación R o S. Dichos nucleótidos bicíclicos se dan a conocer en el documento WO2008/154401. En algunas realizaciones, R^{1*} , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} se seleccionan independientemente del grupo consistente en hidrógeno, halógeno, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, alquenoilo C_{2-6} , alquenoilo C_{2-6} sustituido, alquinoilo C_{2-6} o alquinoilo C_{2-6} sustituido, alcoxilo C_{1-6} , alcoxilo C_{1-6} sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C_{1-6} o aminoalquilo C_{1-6} sustituido. En algunas realizaciones, R^{1*} , R^2 , R^3 , R^5 y R^{5*} son hidrógeno. En algunas realizaciones, R^{1*} , R^2 y R^3 son hidrógeno y uno o ambos de R^5 y R^{5*} puede ser distinto de hidrógeno como se hace referencia anteriormente y en los documentos WO 2007/134181 o WO2009/067647 (análogos de ácidos nucleicos α -L-bicíclicos).

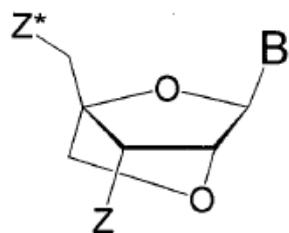
En algunas realizaciones, el LNA usado en los compuestos oligonucleotídicos de la invención tiene preferiblemente la estructura de fórmula general II:



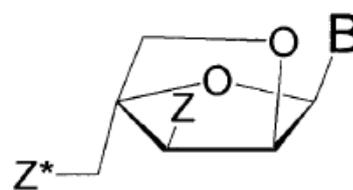
- 5 en la que Y se selecciona del grupo consistente en -O-, -CH₂O-, -S-, -NH-, N(R^e) y/o-CH₂-; Z y Z* se seleccionan independientemente entre un ligamiento internucleotídico, R^H, un grupo terminal o un grupo protector; B constituye un resto de base nucleotídica natural o no natural (nucleobase) y R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄; R^a, R^b, R^c, R^d y R^e opcionalmente se seleccionan independientemente del grupo consistente en hidrogeno, alquilo C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido, alqueno C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, alquino C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxilo C₁₋₁₂, alcoxi C₂₋₁₂-alquilo, alqueno C₂₋₁₂-oxilo, carboxilo, alcoxi C₁₋₁₂-carbonilo, alquil C₁₋₁₂-carbonilo, formilo, arilo, ariloxicarbonilo, ariloxilo, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxicarbonilo, heteroariloxilo, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y dialquil C₁₋₆-amino, carbamoilo, mono- y dialquil C₁₋₆-aminocarbonilo, aminoalquil C₁₋₆-carbonilo, mono- y dialquil C₁₋₆-aminoalquil C₁₋₆-aminocarbonilo, alquil C₁₋₆-carbonilamino, carbamido, alcanoil C₁₋₆-oxilo, sulfono, alquil C₁₋₆-sulfoniloxilo, nitro, azido, sulfanilo, alquil C₁₋₆-tio, halógeno, intercalantes de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores y ligandos, en que arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos y en que dos sustituyentes geminales R^a y R^b pueden designar conjuntamente metileno (=CH₂) opcionalmente sustituido; y R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄. En algunas realizaciones, R^a, R^b, R^c, R^d y R^e opcionalmente se seleccionan independientemente del grupo consistente en hidrógeno y alquilo C₁₋₆, tal como metilo. Para todos los centros quirales, pueden encontrarse grupos asimétricos en cualquier orientación R o S, por ejemplo, dos isómeros estereoquímicos ejemplares incluyen las isoformas β-D y α-L, que pueden ilustrarse como sigue:
- 10
- 15
- 20



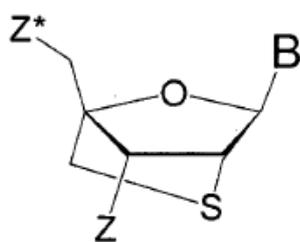
Se muestran a continuación unidades de LNA ejemplares:



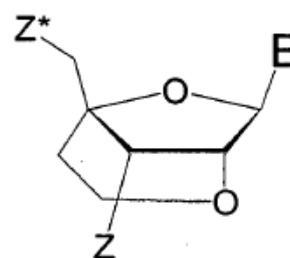
β-D-oxi-LNA



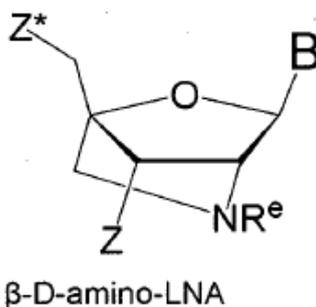
α-L-oxi-LNA



β-D-thio-LNA



β-D-ENA



El término "tio-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en que Y en la fórmula general anterior se selecciona de S o -CH₂-S-. Tio-LNA puede estar en configuración tanto β -D como α -L.

- 5 El término "amino-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en que Y en la fórmula general anterior se selecciona de -N(H)-, N(R)-, CH₂-N(H)- y -CH₂-N(R)-, en que R se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄. El amino-LNA puede estar tanto en configuración β -D como α -L.

10 El término "oxi-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en que Y en la fórmula general anterior representa -O-. El oxi-LNA puede estar tanto en configuración β -D como α -L.

El término "ENA" comprende un nucleótido bloqueado en que Y en la fórmula general anterior es -CH₂-O- (en que el átomo de oxígeno de -CH₂-O- está unido a la posición 2' respecto a la base B). R^e es hidrogeno o metilo.

- 15 En algunas realizaciones ejemplares, el LNA se selecciona de β -D-oxi-LNA, α -L-oxi-LNA, β -D-amino-LNA y β -D-tio-LNA, en particular β -D-oxi-LNA.

Ligamientos internucleotídicos

- 20 Se pretende que los términos "grupo de ligamiento" o "ligamiento internucleotídico" signifiquen un grupo capaz de acoplar conjuntamente de forma covalente dos nucleótidos, dos análogos nucleotídicos y un nucleótido y un análogo nucleotídico, etc. Los ejemplos específicos y preferidos incluyen grupos fosfato y grupos fosfortioato.

25 Los nucleótidos del oligómero o secuencia nucleotídica contigua del mismo se acoplan conjuntamente mediante grupos de ligamiento. Adecuadamente, cada nucleótido se liga con el nucleótido 3' adyacente mediante un grupo de ligamiento.

30 Los ligamientos internucleotídicos adecuados incluyen aquellos enumerados en el documento WO2007/031091, por ejemplo los ligamientos internucleotídicos enumerados en el primer párrafo de la página 34 del documento WO2007/031091.

35 Se prefiere, en algunas realizaciones, modificar el ligamiento internucleotídico desde su fosfodiéster normal a otro que sea más resistente al ataque de nucleasa, tal como fosfortioato o boranofosfato; al ser estos dos escindibles por ARNasa H, permiten también esa vía de inhibición anticodificante en la reducción de la expresión del gen diana.

Pueden preferirse ligamientos internucleotídicos que contienen azufre (S) adecuados como se proporcionan en la presente memoria. Se prefieren también ligamientos internucleotídicos de fosfortioato.

40 En algunas realizaciones, tales como las realizaciones a las que se hace referencia anteriormente, cuando sea adecuado y no se indique específicamente, todos los grupos de ligamiento restantes son fosfodiéster o fosfortioato, o una mezcla de los mismos.

En algunas realizaciones, todos los grupos de ligamiento internucleotídicos son fosfortioato.

45 *Conjugados*

50 En el contexto, el término "conjugado" pretende indicar una molécula heterogénea formada por la unión covalente ("conjugación") del oligómero como se describe en la presente memoria con uno o más restos no nucleotídicos o no polinucleotídicos. Los ejemplos de restos no nucleotídicos o no polinucleotídicos incluyen agentes macromoleculares tales como proteínas, cadenas de ácidos grasos, residuos de azúcar, glicoproteínas, polímeros o combinaciones de los mismos. Típicamente, las proteínas pueden ser anticuerpos de una proteína diana. Los polímeros típicos pueden ser polietilenglicol.

55 Por lo tanto, en diversas realizaciones, el oligómero puede comprender tanto una región polinucleotídica que consiste típicamente en una secuencia contigua de nucleótidos como una región adicional no nucleotídica. Cuando

se hace referencia al oligómero consistente en una secuencia nucleotídica contigua, el compuesto puede comprender componentes no nucleotídicos tales como un componente conjugado.

5 En diversas realizaciones de la invención, se liga el compuesto oligomérico con ligados/conjugados que pueden usarse, p.ej., para aumentar la captación celular de compuestos oligoméricos. El documento WO2007/031091 proporciona ligandos y conjugados adecuados.

Composiciones

10 El oligómero puede usarse en formulaciones y composiciones farmacéuticas. Adecuadamente, dichas composiciones comprenden un diluyente, portador, sal o coadyuvante farmacéuticamente aceptable. El documento WO2007/031091 proporciona diluyentes, portadores y coadyuvantes farmacéuticamente aceptables adecuados y preferidos. Se proporcionan también dosificaciones, formulaciones, vías de administración, composiciones, formas de dosificación, combinaciones con otros agentes terapéuticos y formulaciones de profármacos adecuados en el
15 documento WO2007/031091.

Aplicaciones e indicaciones médicas

20 Se ha encontrado que el uso de moduladores de microARN-155 afecta a una serie de dianas, incluyendo citocinas tales como citocinas proinflamatorias, tales como CSF. Los moduladores pueden usarse por lo tanto para modular simultáneamente varias dianas en la célula, y como tales proporcionan un modulador altamente eficaz de respuestas inflamatorias, particularmente aquellas asociadas a enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias.

25 La invención proporciona un procedimiento de potenciación del recuento de leucocitos en un paciente, tal como un paciente de quimioterapia, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar un modulador de microARN-155, tal como la composición farmacéutica de la invención, a dicho paciente, tal como durante o después de un tratamiento de quimioterapia; adecuadamente el modulador de microARN-155 es un mimético de microARN-155.

30 Potenciar el recuento de leucocitos puede ser ventajoso para reducir la gravedad o tratar respuestas de alergia de tipo I. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria es enfermedad de Crohn o una alergia de tipo I, que en algunas realizaciones puede tratarse con un mimético de microARN-155. Reducir el recuento de leucocitos puede ser ventajoso para reducir la gravedad o tratar respuestas de alergia de tipo II. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria es artritis tal como artritis reumatoide, que puede tratarse por ejemplo con un inhibidor de microARN-155. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria es psoriasis. En algunas realizaciones, la
35 enfermedad inflamatoria es aterosclerosis o enfermedad pulmonar tal como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En alguna realización, la enfermedad autoinmunitaria es esclerosis múltiple.

40 La invención proporciona composiciones que comprenden un inhibidor de miR-155 para usar en un procedimiento de tratamiento de una variedad de enfermedades, incluyendo la prevención o el tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias agudas o crónicas, especialmente aquellas asociadas a una acumulación aberrante de linfocitos o monocitos tales como enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias crónicas y agudas, acumulación aberrante de linfocitos o monocitos, artritis, artritis idiopática juvenil, artritis reumatoide, artritis aguda y crónica, asma, aterosclerosis, nefropatía diabética, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, nefritis, glomerulonefritis, pancreatitis, fibrosis pulmonar, psoriasis, reestenosis, rechazo de trasplante,
45 etapas tempranas de respuestas alérgicas, inhibición de LTC₄ para prevenir AHR (hipersensibilidad de las vías respiratorias), infección por tuberculosis y malignidad, apoplejía, enfermedad de Castleman, neoplasia, mieloma múltiple de grado alto, mesoteliomas malignos, síndrome paraneoplásico de mesoteliomas, inmunosupresión, caquexia, trombocitosis, amiloidosis, osteogénesis imperfecta, homocistinuria, osteoporosis, osteopetrosis, inflamación ósea asociada a artritis y artritis reumatoide, enfermedad periodontal, displasia fibrosa, enfermedad de Paget, insuficiencia renal crónica, endocrinopatías, hipercalcemia, estados de deficiencia, síndromes de malabsorción, enfermedad hepática crónica, metástasis de cáncer, progresión de tumor mamario hasta metástasis, todas las cuales son realizaciones individuales.

55 Puntos adicionales:

Los compuestos dados a conocer en la presente memoria pueden usarse en:

1. Un procedimiento de modulación de la expresión de uno o más factores estimulantes de colonias (CSF) en una célula, tales como G-CSF, M-CSF y/o GM-CSF, comprendiendo dicho procedimiento administrar un modulador de microARN-155 a la célula en una cantidad eficaz para modular la expresión de dicho CSF.
- 60 2. El procedimiento según el punto 1, en el que dicho procedimiento es un procedimiento de potenciación de la expresión del CSF en la célula, en el que el modulador de microARN-155 es un mimético de microARN-155 que potencia (o suplementa) la actividad de microARN-155 en dicha célula.
- 65 3. El procedimiento según el punto 1, en el que dicho procedimiento es un procedimiento de regulación negativa de la expresión de CSF en una célula que expresa CSF, en el que dicho modulador de microARN-155 es un inhibidor de microARN-155 en la célula.

4. Un procedimiento para la inhibición simultánea de la expresión de G-CSF, M-CSF, CCL-2 e IL-6 en una célula, comprendiendo dicho procedimiento administrar un modulador de microARN-155 a la célula en una cantidad eficaz para modular la expresión de dichos G-CSF, M-CSF, CCL-2 e IL-6.
5. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1-4, en el que dicha célula es una célula de mamífero tal como monocitos/macrófagos, granulocitos, neutrófilos y/o eosinófilos o un precursor de la misma, tal como un citoblasto hematopoyético pluripotente y/o unidad formadora de colonias (UFC).
6. El procedimiento según el punto 5, en el que dicha célula es una célula precursora de leucocitos.
7. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1-6, en el que dicha célula sobreexpresa o subexpresa dicho CSF.
8. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1-7, en el que dicho procedimiento se efectúa *in vitro*.
9. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1-7, en el que dicho procedimiento se efectúa *in vivo*.
10. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1-9, en el que dicho modulador de microARN-155 comprende un oligómero de entre 6 y 30 nucleótidos de longitud, en el que dicho oligómero consiste en o comprende una secuencia nucleotídica contigua que es
 - a. totalmente complementaria de al menos seis nucleótidos contiguos presentes en microARN-155 (el inhibidor de microARN-155); o.
11. El procedimiento según el punto 10, en el que dicho oligómero consiste en o comprende una secuencia nucleotídica contigua que es idéntica o totalmente complementaria con la región de semilla de microARN-155.
12. El procedimiento según los puntos 10 u 11, en el que la secuencia nucleotídica contigua del oligómero es idéntica a la correspondiente región de microARN-155 o complemento de la misma, o comprende no más de dos desaparejamientos con la correspondiente región de microARN-155, tal como las SEQ ID NO 1, 2, 3 o 4, o el complemento inverso de las mismas.
13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones de los puntos 10-12, en el que la secuencia nucleotídica contigua del oligómero consiste en o comprende entre 7-23 nucleótidos que son complementarios de la correspondiente región de microARN-155 o complemento de la misma, o que comprende no más de 1 o 2 desaparejamientos con la correspondiente región de microARN-155 o complemento inverso de la misma.
14. El procedimiento según el punto 13, en el que la secuencia nucleotídica contigua consiste en 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 nucleótidos que son idénticos o totalmente complementarios de una secuencia encontrada en la SEQ ID NO 2, o comprende no más de 1 o 2 desaparejamientos con la correspondiente región de la SEQ ID NO 2, o complemento inverso de la misma.
16. El procedimiento según el punto 14, en el que la secuencia nucleotídica contigua consiste en o comprende entre 7 y 16 nucleótidos que son totalmente complementarios de la correspondiente secuencia encontrada en la SEQ ID NO 2, o comprende no más de 1 o 2 desaparejamientos con la correspondiente región del complemento inverso de la SEQ ID NO 2.
17. El procedimiento según el punto 14, en el que la secuencia nucleotídica contigua del oligómero consiste en entre 8-11 nucleótidos que son totalmente complementarios de la correspondiente región de la SEQ ID NO 2.
18. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 10-17, en el que dicho oligómero consiste en dicha secuencia nucleotídica contigua.
19. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 10-18, en el que el oligómero es un antimicroARN, en el que la secuencia nucleotídica contigua del antimicroARN comprende una o más unidades de LNA.
20. El procedimiento según el punto 19, en el que el oligómero es un antimicroARN, en el que la secuencia nucleotídica contigua del antimicroARN comprende o consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO: 5 - 25.
21. El procedimiento según una cualquiera de los puntos 10-19, en el que dicho oligómero es un oligonucleótido monocatenario.
22. El procedimiento según una cualquiera de los puntos 10-19, en el que dicho oligómero forma una hebra de un complejo de ARN bicatenario tal como ARNip.
23. Un procedimiento de tratamiento de una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento una etapa de administración de una cantidad eficaz de un modulador de microARN-155 a dicho sujeto.
24. El procedimiento según el punto 23, en el que dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria crónica o una enfermedad autoinmunitaria.
25. El procedimiento según los puntos 23 o 24, en el que dicho modulador de microARN-155 es un inhibidor de microARN-155 y en el que dicha enfermedad inflamatoria está mediada por una respuesta de hipersensibilidad de tipo II.
26. El procedimiento según la reivindicación de uno cualquiera de los puntos 23-24, en el que la enfermedad se selecciona del grupo consistente en: artritis tal como artritis reumatoide o artritis inducida por colágeno, enfermedad pulmonar, psoriasis y esclerosis múltiple.
28. El procedimiento según los puntos 23, 24 o 27, en el que la enfermedad se selecciona del grupo consistente en enfermedad de Crohn o alergia de tipo I (mediada por IgE).
29. Un procedimiento de reducción de la concentración de leucocitos, tales como monocitos/macrófagos, granulocitos, neutrófilos y/o eosinófilos, en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar un inhibidor de microARN-155 a dicho sujeto.
31. Un inhibidor de microARN-155 para su uso en la regulación negativa de uno o más CSF en una célula.

32. Un inhibidor de microARN-155 para uso para el tratamiento de una enfermedad seleccionada de la lista: prevención o tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias agudas o crónicas, especialmente aquellas asociadas a una acumulación aberrante de linfocitos o monocitos tales como enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias crónicas y agudas, acumulación aberrante de linfocitos o monocitos, artritis, artritis idiopática juvenil, artritis reumatoide, artritis aguda y crónica, asma, aterosclerosis, nefropatía diabética, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, nefritis, glomerulonefritis, pancreatitis, fibrosis pulmonar, psoriasis, reestenosis, rechazo de trasplante, etapas tempranas de respuestas alérgicas, inhibición de LTC4 para prevenir AHR (hipersensibilidad de las vías respiratorias), infección por tuberculosis y malignidad, apoplejía, enfermedad de Castleman, neoplasia, mieloma múltiple de grado alto, mesoteliomas malignos, síndrome paraneoplásico de mesoteliomas, inmunosupresión, caquexia, trombocitosis, amiloidosis, osteogénesis imperfecta, homocistinuria, osteoporosis, osteopetrosis, inflamación ósea asociada a artritis y artritis reumatoide, enfermedad periodontal, displasia fibrosa, enfermedad de Paget, insuficiencia renal crónica, endocrinopatías, hipercalcemia, estados de deficiencia, síndromes de malabsorción, enfermedad hepática crónica, metástasis de cáncer, progresión de tumor mamario hasta metástasis.
35. Uso de un modulador de microARN-155 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una de las siguientes enfermedades: prevención o tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias agudas o crónicas, especialmente aquellas asociadas a una acumulación aberrante de linfocitos o monocitos tales como enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias crónicas y agudas, acumulación aberrante de linfocitos o monocitos, artritis, artritis idiopática juvenil, artritis reumatoide, artritis aguda y crónica, asma, aterosclerosis, nefropatía diabética, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, nefritis, glomerulonefritis, pancreatitis, fibrosis pulmonar, psoriasis, reestenosis, rechazo de trasplante, etapas tempranas de respuestas alérgicas, inhibición de LTC4 para prevenir AHR (hipersensibilidad de la vía aérea), infección por tuberculosis y malignidad, apoplejía, enfermedad de Castleman, neoplasia, mieloma múltiple de grado alto, mesoteliomas malignos, síndrome paraneoplásico de mesoteliomas, inmunosupresión, caquexia, trombocitosis, amiloidosis, osteogénesis imperfecta, homocistinuria, osteoporosis, osteopetrosis, inflamación ósea asociada a artritis y artritis reumatoide, enfermedad periodontal, displasia fibrosa, enfermedad de Paget, insuficiencia renal crónica, endocrinopatías, hipercalcemia, estados de deficiencia, síndromes de malabsorción, enfermedad hepática crónica, metástasis de cáncer, progresión de tumor mamario hasta metástasis.
36. Una composición farmacéutica que comprende un modulador de microARN-155, al menos un agente antiinflamatorio adicional y un diluyente, portador o coadyuvante farmacéutico.
37. La composición farmacéutica según la realización 36, en la que el al menos un agente antiinflamatorio se selecciona de un grupo consistente en: fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) o inhibidores del receptor de factor de necrosis tumoral.
38. Un procedimiento de potenciación del recuento de leucocitos en un paciente, tal como un paciente de quimioterapia, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar un modulador de microARN-155, tal como la composición farmacéutica de la invención, a dicho paciente, tal como durante o después del tratamiento de quimioterapia.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Inducción mediada por LPS de miR-155 en macrófagos Raw264.7 de ratón cultivados

Se ha reseñado recientemente un silenciamiento de microARN eficaz usando LNA antimir complementarios en combinación con análisis de transcriptoma como enfoque útil para analizar los papeles biológicos de los miARN individuales *in vitro* e *in vivo* (Elmen *et al.* (2008) *Nature* 452: 896-899; Elmen *et al.* (2008) *Nucleic Acids Res.* 36: 1153-1162. Por ello, para posibilitar estudios adicionales en dianas de miR-155 y redes génicas asociadas a miR-155, se diseñaron LNA antimir orientados a miR-155 de murino y humano así como un oligonucleótido de LNA de control.

Se investigó en primer lugar la expresión de miR-155 en macrófagos Raw264.7 de murino tras estimulación con LPS.

Resultados: El tratamiento con LPS de macrófagos de ratón cultivados mostró la inducción dependiente de la dosis de miR-155 con un aumento de más de 10 veces de los niveles de expresión de miR-155 a una concentración de LPS 100 ng/ml después de 18 h (Fig. 1A). Consistentemente con estos datos, un constructo indicador de luciferasa de miR-155 que alberga un sitio diana de miR-155 de coincidencia perfecta en la 3' UTR del gen de luciferasa de *Renilla* mostró una represión dependiente de la dosis del indicador luciferasa, que se correlacionaba con la expresión aumentada de miR-155 en macrófagos Raw264.7 de ratón tratados con LPS (Fig. 1B). El LNA antimir-155 mostró un silenciamiento dependiente de la dosis de miR-155 en macrófagos Raw264.7 de ratón tratados con LPS como se muestra por una desrepresión eficaz del indicador de luciferasa de miR-155, mientras que el oligonucleótido de LNA de control desaparejado no tenía efecto sobre la actividad indicadora luciferasa a las mismas concentraciones (Fig. 1C).

Puesto que el LNA antimir daba como resultado un antagonismo potente y específico de miR-155 en células Raw264.7 cultivadas a concentración 5 nM, se eligieron estas condiciones experimentales para estudios adicionales en macrófagos de ratón.

- 5 Conclusión: El LNA antimir-155 antagonizaba potente y específicamente miR-155 de murino en células Raw264.7 cultivadas a una concentración 5 nM.

10 **Materiales y procedimientos:** *Diseño y síntesis de oligonucleótidos de LNA:* Se sintetizaron los oligonucleótidos de LNA antimir como oligonucleótidos no conjugados y totalmente fosforotiolados. El oligonucleótido de LNA antimir 5'-TcAcAATtaG^mCAtTA-3' de coincidencia perfecta era complementario de los nucleótidos 2-16 de la secuencia de miR-155 de murino madura. Se sintetizó un oligonucleótido de LNA de control desaparejado con la siguiente secuencia: 5'-TcAa^mCATtaGA^m-CtTA-3' (mayúsculas: LNA; minúsculas: ADN; mC designa el LNA metilcitosina).

15 *Cultivo celular:* Se hicieron crecer células Raw264.7 en medio de Eagles modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen) suplementado con 10 % de FBS, Glutamax I 4 mM y gentamicina 25 µg/ml (Invitrogen). Se adquirió lipopolisacárido (LPS) en Sigma y se indujo la activación de las células Raw264.7 tratando las células con LPS 1, 10 o 100 ng/ml durante los periodos de tiempo indicados.

20 *Transfección:* Se transfectaron células Raw264.7 con el reactivo de transfección Lipofectamine 2000 según el protocolo del fabricante (Invitrogen) y se usaron los oligonucleótidos de LNA antimir a una concentración final 1 o 5 nM como se indica. Se llevaron a cabo las transfecciones y medidas de la actividad de luciferasa según las instrucciones del fabricante (kit de luciferasa dual Lipofectamine 2000/Promega de Invitrogen). Se expresaron los niveles de actividad relativa de luciferasa como relaciones de luciferasa de *Renilla*/luciérnaga.

25 *Plásmidos:* Se clonó la secuencia diana coincidente perfecta para miR-155 de murino en dirección 3' del gen de luciferasa de *Renilla* (sitios XhoI/NotI) en el vector psiCHECK2 (Promega) usando oligómeros 5' fosforilados: miR-155 de murino codificante 5'-tcgagccctatcacaattagcattaagc-3', e inverso 5'-ggccgctaatgctaatgtgataggggc-3'.

30 *PCR-TI cuantitativa a tiempo real:* Se extrajo el ARN total con reactivo Trizol según las instrucciones del fabricante (Invitrogen), excepto porque se lavó el sedimento de ARN precipitado con etanol al 80 % y no se mezcló. Se cuantificaron los niveles de miR-155 usando el kit de detección de PCR-TI a tiempo real mirVana (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante, excepto porque se usaron 200 ng de ARN total en la reacción de transcripción inversa (TI). Una serie de dilución doble de ARN total de ARN de bazo de ratón tratado con LPS o ARN de Raw264.7 tratado con LPS sirvió como patrón para asegurar un intervalo lineal (Ct frente a número relativo de copias) de la amplificación. Se diluyó la reacción de TI 10 veces en agua y se usaron posteriormente alícuotas de 10 µl para amplificación por PCR-TI según las instrucciones del fabricante (Ambion).

Se usó el instrumento de PCR a tiempo real Applied Biosystems 7500 para amplificación.

40 Ejemplo 2

Represión traduccional de las isoformas de c/ebp Beta por miR-155

45 La estimulación por LPS de células Raw264.7 de ratón cultivadas conduce a una respuesta inflamatoria en que miR-155 y más de 700 genes se regulan positivamente (Huang *et al.* (2006) Arch. Pharm. Res. 29: 890-897), incluyendo el gen de factor de transcripción c/ebp Beta (Gorgoni B *et al.* (2002) J. Immunol. 168: 4055-4062). Las secuencias de sitio diana de miR-155 están presentes en el transcrito de 3' UTR de c/ebp Beta, que está altamente conservado entre 5 especies vertebradas (Fig. 2A). El transcrito de c/ebp Beta codifica 3 isoformas, designadas como LAP*, LAP y LIP, que se generan por iniciación traduccional diferencial (Fig. 2A). La forma LIP corta carece del dominio de transactivación (TAD), pero sigue siendo capaz de unirse a ADN y formas homo- o heterodiméricas a través del dominio de cremallera de leucina de región básica (bZIP), y por lo tanto se comporta como un dominante negativo. La expresión de las tres isoformas se regula de manera compleja, e incluso se ha reseñado la activación diferencial de las isoformas tras estimulación con LPS (O'Connel *et al.* (2008) J. Exp. Med. 205: 585-594).

55 **Resultados:** Se encontró que un indicador de luciferasa que alberga la 3' UTR de c/ebp Beta mostraba una represión dependiente de miR-155 significativa ($p < 0,001$) respecto a un plásmido indicador de control (Fig. 2B), indicando fuertemente que c/ebp Beta es una diana directa de miR-155, consistentemente con dos informe recientes (19, 20). Para comprender mejor la regulación mediada por miR-155 de las diversas isoformas de c/ebp Beta, se investigaron en primer lugar los extractos de proteína de macrófagos de murino no tratados por análisis de transferencia Western usando un anticuerpo de c/ebp Beta específico C-terminal que reconoce las tres isoformas. La transfección transitoria del precursor de miR-155 (premiR-155) en células Raw264.7 de macrófago de ratón daba como resultado la represión de las tres isoformas de c/ebp Beta, mientras que la transfección concomitante de LNA antimir en las células antagonizaba eficazmente la represión mediada por miR-155 (Fig. 2C). Se observó también la represión de otra diana directa de miR-155, el factor de transcripción Pu.1 de la familia de Ets, en células Raw264.7 (Fig. 2C), 65 (10), implicando que tanto c/ebp Beta como Pu.1 son dianas de miR-155 en macrófagos Raw264.7.

A continuación, se investigó la represión mediada por miR-155 de las isoformas de *c/ebp* Beta tras la activación por LPS de macrófagos mediante la transfección de LNA antimir o el LNA de control respectivamente, en células Raw264.7 de ratón en combinación con un tratamiento de 6 horas con LPS, que se ha mostrado anteriormente que daba como resultado una fuerte respuesta de tipo inflamatorio en células Raw264.7 (18). El silenciamiento de miR-155 por LNA antimir condujo a una desrepresión dependiente de la dosis de la isoforma LIP corta, mostrando una desrepresión del 80 % a la máxima concentración de 5 nM como se determina por análisis de transferencia Western (Fig. 2D). En comparación, la desrepresión de los niveles de isoforma LAP era menos pronunciada (Fig. 2D). Se observaron resultados similares en las células THP-1 monocíticas humanas indiferenciadas, en que el tratamiento con LNA antimir daba como resultado la desrepresión de la isoforma LIP corta (Fig. 2E). Tomados en conjunto, estos datos demuestran que los niveles de las isoformas individuales de *c/ebp* Beta están estrechamente regulados por miR-155.

Conclusión: Antagonizar miR-155 con LNA antimir bloquea la represión traduccional de las isoformas de *c/ebp* Beta.

Materiales y procedimientos: Diseño y síntesis de oligonucleótidos de LNA: Se sintetizaron los oligonucleótidos de LNA antimir en forma de oligonucleótidos no conjugados y totalmente fosforotiolados. El oligonucleótido de LNA antimir coincidente perfecto 5'-TcAcAATtaG^mCAiTA-3' era complementario de los nucleótidos 2-16 en la secuencia de miR-155 de murino madura y el oligonucleótido hsa LNA antimir-155 5'-TcAcGATtaG^mCAiTA-3' era complementario de los nucleótidos 2-16 en la secuencia de miR-155 humana madura. Se sintetizó el oligonucleótido de LNA de control desaparejado con la siguiente secuencia: 5'-TcAa^mCATtaGA^mCtTA-3' (mayúsculas: LNA; minúsculas: ADN; ^mC designa el LNA metilcitosina).

Cultivo celular: Se hicieron crecer células Raw264.7 en medio de Eagles modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen) suplementado con 10 % de FBS, Glutamax I 4 mM y gentamicina 25 µg/ml (Invitrogen). Se adquirió lipopolisacárido (LPS) en Sigma y se indujo la activación de células Raw264.7 tratando las células con LPS 100 ng/ml. Se hicieron crecer células THP-1 en RPMI-1640 (Invitrogen) suplementado con 10 % de FBS, Glutamax I 4 mM y gentamicina 25 µg/ml (Invitrogen). Se transfectaron células Raw264.7 y THP-1 con el reactivo de transfección Lipofectamine 2000 según el protocolo del fabricante (Invitrogen) y se usaron los oligonucleótidos de LNA antimir a una concentración final de 5 nM a menos que se afirme otra cosa. Se cotransfectó el precursor de miR-155 humano (premiR-155, Ambion) a una concentración final 5 nM. Se cultivaron células HeLa en medio MEM Eagles (Invitrogen) con 10 % de FBS, Glutamax I 2 mM, aminoácidos no esenciales y gentamicina 25 µg/ml (Invitrogen). Se cotransfectaron células HeLa con premiR-155 humano (Ambion) a una concentración final de 50 nM y 0,1 µg de plásmido indicador de luciferasa usando Lipofectamine 2000. Se llevaron a cabo las transfecciones y medidas de la actividad de luciferasa según las instrucciones del fabricante (kit de luciferasa dual Lipofectamine 2000/Promega de Invitrogen). Se expresaron los niveles de actividad relativa de luciferasa como relaciones de luciferasa de *Renilla*/luciferina.

Plásmidos: Se clonó la secuencia diana coincidente perfecta para miR-155 humano en dirección 3' del gen de luciferasa de *Renilla* (sitios XhoI/NotI) en el vector psiCHECK2 (Promega) usando oligómeros 5' fosforilados: miR-155 humano de codificación 5'-tcgagcccctatcaccgattagcattaagc-3' e inverso 5'-ggccgcttaatgctaactcgtagggg-3'. Se clonó la 3' UTR de *c/ebp* Beta humano en dirección 3' del gen de luciferasa de *Renilla* (sitios XhoI/NotI) en el vector psiCHECK2. Los cebadores de PCR usados para la amplificación de la 3' UTR de *c/EBP*Beta humano (pares de bases 1328-1837, nº de acceso NM_005194) eran: codificación 5'-aaaaaactcgagaaaactttggcactggggca-3' (incl. un sitio XhoI), inverso 5'-aaaaaagcggccgctgttaaccattctcaaa-3' (incl. un sitio NotI).

Análisis de transferencia Western: Se extrajeron proteínas Raw264.7 usando el tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1 % de Triton X-100, 0,1 % de SDS, 1% de desoxicolato de sodio) y se sometió a electroforesis en geles NuPAGE Bis Tris al 4-12 % (Invitrogen) usado 100 µg de proteína por muestra. Se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa usando iBlot (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Se usó el kit de Western avanzado ECL (GE Healthcare Life Sciences) para bloqueo, dilución y detección de anticuerpos según el fabricante. Se usaron un anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-*c/ebp* Beta (SC-7962, Santa Cruz Biotechnology), un anticuerpo primario de conejo anti-PU.1 (nº 2258, Cell signaling Technology), un anticuerpo primario de ratón anti-tubulina α Ab-2 (MS-581-P, Neomarkers) y un anticuerpo secundario de conejo anti-ratón conjugado con HRP (P0447, DAKO) o anticuerpos de cerdo anti-ratón (P0399, DAKO) según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 3

miR-155 regula *c/ebp* Beta en los esplenocitos de ratones tratados con LPS

Se induce la expresión de *c/ebp* Beta durante la activación de macrófagos, mientras que Pu.1 se expresa tanto en linfocitos B y macrófagos en reposo como en linfocitos B en el centro germinal del bazo (Gorgoni B *et al.* (2002) J. Immunol. 168: 4055-4062; Schebesta M *et al.* (2002) Curr. Opin. Immunol. 14: 216-223). Puesto que el bazo contiene poblaciones de monocitos y macrófagos junto con linfocitos B y T, se investigó la regulación mediada por

miR-155 de c/ebp Beta en los esplenocitos de ratones tratados con LPS en combinación con silenciamiento de miR-155 basado en LNA antimir.

Resultados: En primer lugar, se hizo la pregunta de si estas células podrían volverse dianas mediante oligonucleótidos de LNA administrados por vía sistémica *in vivo* aislando poblaciones celulares de linfocitos B y monocitos de bazo de murino después de dosificación intravenosa con un oligonucleótido de LNA marcado con 6-carboxifluoresceína (FAM). La microscopia confocal de los linfocitos B y monocitos/macrófagos de murino mostró que el control de LNA marcado con FAM se captaba fácilmente por estas células, indicando que miR-155 podría orientarse a ambos tipos celulares mediante un LNA antimir (Fig. 3A). La administración intraperitoneal de LPS inducía significativamente la expresión de miR-155 en esplenocitos 2 horas después del tratamiento, corroborando así los resultados obtenidos con macrófagos de murino estimulados con LPS (Fig. 3B). Los esplenocitos de ratones no tratados mostraron bajos niveles de proteínas c/ebp Beta, mientras que los niveles de ambas isoformas LAP y LIP de c/ebp Beta aumentaban significativamente 24 horas después del tratamiento con LPS (Fig. 3C), de acuerdo con un informe anterior (Gorgoni B *et al.* (2002) J. Immunol. 168: 4055-4062). La administración sistémica de LNA antimir en ratones tratados con LPS antagonizaba eficazmente miR-155 en comparación con los ratones tratados con vehículo y LNA de control desaparejado, respectivamente (Fig. 3B). Esto dio como resultado una marcada desrepresión de ambas isoformas LAP y LIP en comparación con los ratones de control (Fig. 3C), lo que es consistente con la noción de que miR-155 regula negativamente c/ebp Beta *in vivo* en esplenocitos de ratón durante la respuesta inflamatoria aguda.

Conclusión: Los oligonucleótidos de LNA están localizados en linfocitos B (CD19) y monocitos/macrófagos (CD11b) aislados de bazo de murino después de administración intravenosa y miR-155 regula c/ebp Beta en los esplenocitos de ratones tratados con LPS.

Materiales y procedimientos: *Diseño y síntesis de oligonucleótidos de LNA*: Se sintetizaron los oligonucleótidos de LNA antimir en forma de oligonucleótidos no conjugados y totalmente fosforotilados. El oligonucleótido de LNA antimir perfectamente coincidente 5'-TcAcAATtaG^mCAtTA-3' era complementario de los nucleótidos 2-16 en la secuencia de miR-155 madura de murino. Se sintetizó el oligonucleótido de LNA de control desaparejado con la siguiente secuencia: 5'-TcAa^mCATtaGA^mCtTA-3' (mayúsculas: LNA; minúsculas: ADN; ^mC designa el LNA metilcitosina).

Aislamiento de fracciones celulares de linfocitos B y monocitos/macrófagos a partir de esplenocitos de ratón:

Se inyectó en ratones C57BL/6J hembra (Taconic M&B Laboratory Animals) por vía intravenosa un LNA de control marcado con FAM durante 3 días consecutivos, recibiendo dosis diarias de 25 mg/kg, y se sacrificaron los animales 24 horas después de la última dosis. Se extirparon quirúrgicamente los bazos y se llevó a cabo una selección positiva de monocitos/macrófagos mediante los sistemas de separación MACS® Cell (Miltenyi Biotec) usando perlas magnéticas conjugadas con anticuerpos CD11 b y columnas de separación MACS® Cell según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Se aislaron los linfocitos B usando perlas magnéticas conjugadas con anticuerpos CD19 (Miltenyi Biotec). Se añadieron anticuerpos CD11b y CD19 conjugados con PE a fracciones aisladas para verificar la identidad de las células aisladas por análisis FACS. Se tiñeron con DAPI las células aisladas fijadas y se transfirieron a portaobjetos de microscopio. Se investigó la captación celular del oligonucleótido de LNA marcado con FAM mediante microscopia confocal.

Experimentos in vivo: Se usaron ratones C57BL/6J hembra (Taconic M&B Laboratory Animals) de 27 g de peso corporal medio en la primera dosificación en todos los experimentos y recibieron una dieta estándar (Altromin nº 1324, Brogaarden). Se formularon los compuestos de LNA en solución salina fisiológica (NaCl al 0,9 %) a una concentración final que permite a los ratones recibir un volumen de inyección en la vena de cola de 10 ml/kg. Se dosificaron a los animales durante 3 días consecutivos LNA antimir, LNA de control desaparejado o solución salina (vehículo de control), recibiendo dosis diarias de 25 mg/kg, y se sacrificaron 24 horas después de la última dosis. Se administró LPS bacteriano formulado con solución salina mediante inyecciones intraperitoneales a 0,5 mg/kg y se sacrificaron los ratones 2 o 24 horas después del tratamiento con LPS. Inmediatamente después de sacrificar los animales, se diseccionaron las muestras de bazo. Todos los experimentos se efectuaron según los principios establecidos en las leyes danesas sobre experimentos animales y se aprobaron por la Inspección de experimentos con animales danesa, Ministerio de justicia, Dinamarca.

PCR-TI cuantitativa a tiempo real: Se almacenaron inmediatamente los bazos de ratón diseccionados en ARN después (Ambion). Se extrajo el ARN de los bazos con reactivo Trizol según las instrucciones del fabricante (Invitrogen), excepto porque se lavó el sedimento de ADN precipitado con etanol al 80 % y no se mezcló. Se cuantificaron los niveles de miR-155 usando el kit de detección de PCR-TI a tiempo real mirVana (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante, excepto porque se usaron 200 ng de ARN total en la reacción de transcripción inversa (TI). Una serie de dilución doble de ARN total de ARN de bazo de ratón tratado con LPS o ARN de Raw264.7 tratado con LPS sirvió como patrón para asegurar un intervalo lineal (Ct frente al número relativo de copias) de la amplificación. Se diluyó la reacción de TI 10 veces en agua y se usaron posteriormente alícuotas de 10 µl para amplificación por PCR-TI según las instrucciones del fabricante (Ambion). Se usó el instrumento de PCR a tiempo real Applied Biosystems 7500 para amplificación.

Análisis de transferencia Western: Se extrajeron las proteínas de bazo usando el tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1 % de Triton X-100, 0,1 % de SDS, 1 % de desoxicolato de sodio) y se sometieron a electroforesis en geles NuPAGE Bis Tris al 4-12 % (Invitrogen) usando 100 µg de proteína por muestra. Se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa usando iBlot (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Se usó el kit de Western avanzado de ECL (GE Healthcare Life Sciences) para bloqueo, dilución y detección de anticuerpo según el fabricante. Se usaron un anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-c/ebp Beta (SC-7962, Santa Cruz Biotechnology), un anticuerpo primario de conejo anti-PU.1 (n° 2258, Cell signaling Technology), un anticuerpo primario de ratón anti-tubulina α Ab-2 (MS-581-P, Neomarkers) y anticuerpos secundarios conjugados con HRP de conejo anti-ratón (P0447, DAKO) o de cerdo anti-conejo (P0399, DAKO) según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 4

miR-155 media la regulación del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)

Para identificar los genes de respuesta inmunitaria cuya expresión podría estar mediada por miR-155 en macrófagos activados, se llevó a cabo la medida del perfil de expresión de muestras de ARN extraídas de células Raw264.7 de macrófago de ratón estimuladas con lipopolisacárido (LPS) bacteriano usando matrices inmunitarias de PCR-TI a tiempo real de ratón. Para establecer un vínculo entre miR-155 y la expresión de genes de respuesta inmunitaria, se transfectaron las células Raw264.7 estimuladas con LPS con LNA antimir-155 y mimético de miR-155, adquiridos en Ambion, y como se describe anteriormente, o LNA de control desaparejado como se describe también anteriormente. Los hallazgos se extendieron a una línea celular monocítica humana y a un entorno *in vivo*. Se estableció un vínculo directo entre la isoforma LIP de c/ebp Beta y G-CSF.

Resultados: La medida del perfil de expresión demostró que, entre los genes de respuesta inmunitaria inducidos por el tratamiento con LPS, el gen *Csf3* que codifica el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) estaba significativamente regulado negativamente en células tratadas con LNA antimir en comparación con controles no tratados y de LNA desaparejado ($p=0,014$ y $p=0,008$, respectivamente, prueba de t de Student bilateral), implicando que la regulación de la expresión de G-CSF está mediada por miR-155 (Tabla 1 en las Fig. 6 y Fig. 4A). Para validar esta conclusión, se valoró el efecto de miR-155 sobre la expresión de G-CSF en células THP-1 monocíticas humanas. La transfección transitoria de premiR-155 en células THP-1 estimuladas con LPS dio como resultado una regulación positiva significativa del ARNm de G-CSF ($p<0,01$, prueba de t de Student bilateral), que revirtió a niveles de control tras el antagonismo de miR-155 por LNA antimir (Fig. 4B). Consistentemente con los datos sobre macrófagos de ratón y monocitos humanos, se observó que el ARNm de G-CSF estaba significativamente regulado negativamente en los esplenocitos de ratones tratados con LPS antagonizados por miR-155 ($p=0,0007$ y $p=0,02$, prueba de t de Student bilateral), en comparación con los animales tratados con solución salina y LNA de control (Fig. 4C). Puesto que se encontró que miR-155 ejerce un efecto regulador pronunciado sobre la isoforma LIP de c/ebp Beta, se hizo a continuación la pregunta de si la sobreexpresión de LIP en células Raw264.7 conduciría a una regulación negativa de G-CSF. Es más, la transfección de un constructo de expresión para la isoforma LIP corta en células Raw264.7 estimuladas con LPS dio como resultado la sobreexpresión de LIP como se muestra por los análisis de transferencia Western, lo que coincidía con una marcada regulación negativa del transcrito de G-CSF en macrófagos Raw264.7 de ratón (Fig. 4D).

Conclusión: Durante la estimulación con LPS de células Raw264.7 de macrófago de ratón, el antagonismo con miR-155 conduce a una reducción de los niveles de ARNm de G-CSF. *In vivo*, el antagonismo con miR-155 durante la estimulación de LPS conduce a niveles reducidos de ARNm de G-CSF en esplenocitos. Considerados en conjunto, los datos proporcionan evidencias de que miR-155 media la regulación de múltiples genes de expresión de CSF, probablemente a través de su diana directa c/ebp Beta, durante la respuesta inflamatoria aguda.

Materiales y procedimientos: *Diseño y síntesis de oligonucleótidos de LNA.* Se sintetizaron los oligonucleótidos LNA antimir como oligonucleótidos no conjugados y totalmente fosforotiolados. El oligonucleótido LNA antimir coincidente perfecto 5'-TcAcAATtaG^mCA^mtTA-3' era complementario de los nucleótidos 2-16 en la secuencia de miR-155 de murino maduro y 5'-TcAcGATtaG^mCA^mtTA-3' era complementario de los nucleótidos 2-16 en la secuencia de miR-155 humano maduro. Se sintetizó el oligonucleótido de control de LNA desaparejado con la siguiente secuencia: 5'-TcAa^mCATtaGA^mCtTA-3' (mayúsculas: LNA; minúsculas: ADN; ^mC designa el LNA metilcitosina).

Cultivo celular: Se hicieron crecer células Raw264.7 en medio Eagles modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen) suplementado con 10 % de FBS, Glutamax I 4 mM y gentamicina 25 µg/ml (Invitrogen). Se adquirió lipopolisacárido (LPS) en Sigma y se indujo la activación de células Raw264.7 tratando las células con LPS 100 ng/ml durante los periodos de tiempo indicados. Se hicieron crecer células THP-1 en RPMI-1640 (Invitrogen) suplementado con 10 % de FBS, Glutamax I 4 mM y gentamicina 25 µg/ml (Invitrogen). Se transfectaron células Raw264.7 y THP-1 con el reactivo de transfección Lipofectamine 2000 según el protocolo del fabricante (Invitrogen) y se usaron oligonucleótidos de LNA antimir a una concentración final 5 nM a menos que se afirme otra cosa. Se cotransfectó precursor de miR-155 humano (premiR-155, Ambion) a una concentración final 5 nM. Se llevaron a cabo las transfecciones y medidas de la actividad de luciferasa según las instrucciones del fabricante (kit de luciferasa dual

Lipofectamine 2000/Promega de Invitrogen). Se expresaron los niveles de actividad relativa de luciferasa como relaciones de luciferasa de *Renilla*/luciérnaga.

5 *Plásmidos*: El constructo de expresión pCDNA3.1 para la isoforma LIP de c/ebp Beta de rata truncada (aminoácidos 153-297) se proporcionó amablemente por el Dr. M.A.Chidgey y se ha descrito en otro lugar (Smith C *et al.* (2004) Biochem. J. 380: 757-765).

10 *Análisis de transferencia Western*: Se extrajeron las proteínas de Raw264.7 usando el tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1 % de Triton X-100, 0,1% de SDS, 1 % de desoxicolato de sodio) y se sometieron a electroforesis en geles NuPAGE Bis Tris al 4-12 % (Invitrogen) usando 100 µg de proteína por muestra. Se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa usando iBlot (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Se usó el kit Western avanzado de ECL (GE Healthcare Life Sciences) para bloqueo, dilución y detección de anticuerpo según el fabricante. Se usaron un anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-c/ebp Beta (SC-7962, Santa Cruz Biotechnology) y anticuerpo secundario de conejo anti-ratón conjugado con HRP (P0447, DAKO) según las instrucciones del fabricante.

20 *PCR-TI cuantitativa a tiempo real*: Se almacenaron inmediatamente los bazos de ratón diseccionados en ARN después (Ambion). Se extrajo el ARN total de bazos o células Raw264.7 con reactivo Trizol según las instrucciones del fabricante (Invitrogen), excepto porque se lavó el sedimento de ARN precipitado con etanol al 80 % y no se mezcló. Se realizó la cuantificación de ARNm de G-CSF usando ensayos TaqMan estándares (Applied Biosystems). Se llevó a cabo la reacción de transcripción inversa con decámeros aleatorios, 0,5 µg de ARN total y la enzima TI de M-MLV de Ambion según el protocolo. Se diluyó posteriormente ADNc de primera hebra 10 veces en agua exenta de nucleasa antes de la adición a la mezcla de reacción de PCR-TI. Se usó el instrumento de PCR a tiempo real Applied Biosystems 7500 para amplificación.

25 *Experimentos in vivo*: Se usaron ratones C57BL/6J hembra (Taconic M&B Laboratory Animals) de 27 g de peso corporal medio en la primera dosificación en todos los experimentos y recibieron una dieta estándar (Altromin nº 1324, Brogaarden). Se formularon los compuestos de LNA en solución salina fisiológica (NaCl al 0,9 %) a una concentración final que permite a los ratones recibir un volumen de inyección en vena de cola de 10 ml/kg. Se dosificaron los animales durante 3 días consecutivos con LNA antimir, LNA de control desaparejado o solución salina (vehículo de control), recibiendo dosis diarias de 25 mg/kg, y se sacrificaron 24 horas después de la última dosis. Se administró LPS bacteriano formulado en solución salina por inyecciones intraperitoneales a 0,5 mg/kg y se sacrificaron los ratones 2 o 24 horas después del tratamiento con LPS. Inmediatamente después de sacrificar los animales, se diseccionaron muestras de bazo. Todos los experimentos se efectuaron según los principios establecidos en las leyes danesas sobre experimentos animales y se aprobaron por la Inspección de experimentos con animales danesa, Ministerio de justicia, Dinamarca.

Ejemplo 5

40 Identificación de CCL2 (Mcp-1), IL-6, M-CSF (Csf1) y G-CSF (Csf3) como transcritos regulados por miR-155

45 *Expresión de transcritos de CCL2 (Mcp-1), IL-6, M-CSF (Csf1) y G-CSF (Csf3) extraídos de células Raw264.7 de ratón estimuladas con LPS 100 ng/ml durante 6 h (LPS +) o células Raw264.7 pretransfectadas con LNA antimir-155 5 nM (SPC3989) antes de la estimulación con LPS 100 ng/ml durante 6 h (LPS + antimir)*. Basándose en los datos mostrados en la Tabla 1 de la Fig. 6, se muestran los niveles de expresión de los transcritos de CCL2 (MCP-1), IL-6 y M-CSF (Csf1) y G-CSF(Csf3) en la Figura 5. Todos los transcritos se normalizan a transcritos de microglobulina β2. Se reducen los niveles de expresión de los transcritos CCL2 (MCP-1), IL-6 y M-CSF (Csf1) y G-CSF (Csf3) cuando se tratan con LNA antimir.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Santaris Pharma
 <120> MODULACIÓN MEDIADA POR MICRO-ARN DE FACTORES ESTIMULANTES DE COLONIAS
 <130> 1075WO
 55 <140> US 61/085644 y US 61/121204
 <141> 22-07-2009
 <150> US 61/085644
 <151> 01-08-2008
 <150> US 61/121204
 60 <151> 10-12-2008
 <160> 25
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 65
 65 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 541 442 T3

<400> 1
 cuguuaaugc uaaucgugau agggguuuuu gccuccaacu gacuccuaca uauuagcauu 60

aacag 65

<210> 2
 <211> 23
 5 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2
 uuaaugcuaa ucgugauagg ggu 23

<210> 3
 10 <211> 65
 <212> ARN
 <213> Murino
 <400> 3
 cuguuaaugc uaaauugugau agggguuuug gccucugacu gacuccuacc uguuagcauu 60

aacag 65

<210> 4
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Murino
 <400> 4
 20 uuaaugcuaa uugugauagg ggu 23

<210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (22)
 30 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (4)
 <223> LNA
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19) .. (22)
 <223> LNA
 <400> 5
 40 cccctatcac gattagcatt aa 22

<210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (22)
 50 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7) .. (14)
 <223> LNA
 55 <400> 6
 cccctatcac gattagcatt aa 22

<210> 7
 <211> 22
 <212> ADN

ES 2 541 442 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (22)
 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (2)
 <223> LNA
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (5)
 <223> LNA
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> LNA
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (11) .. (11)
 <223> LNA
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> LNA
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20) .. (20)
 <223> LNA
 <400> 7
 cccctatcac gattagcatt aa 22
 <210> 8
 <211> 15
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (15)
 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223> LNA
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (3) .. (3)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6) .. (7)
 <223> LNA
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (10)
 <223> LNA
 <220>
 65 <221> misc_feature

<222> (12) .. (12)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (14) .. (15)
 <223> LNA
 <400> 8
tcacgattag catta 15
 <210> 9
 10 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (15)
 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (3) .. (3)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (7)
 30 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (12)
 <223> LNA
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14) .. (15)
 <223> LNA
 <400> 9
 40 **tcacgattag catta 15**
 <210> 10
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (13)
 50 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (5)
 <223> LNA
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7) .. (10)
 <223> LNA
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (12) .. (13)
 <223> LNA
 <400> 10
acgattagca tta 13

<210> 11
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (11)
 10 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (3)
 <223> LNA
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (7)
 <223> LNA
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (11)
 <223> LNA
 <400> 11
gattagcatt a 11
 25 <210> 12
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (15)
 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223> LNA
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'OME
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (3) .. (3)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4) .. (5)
 50 <223> 2'OME
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6) .. (8)
 <223> LNA
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (9)
 <223> 2'OME
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (10)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (11) .. (11)

<223> 2'OME
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12) .. (12)
 5 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'OME
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> LNA
 <400> 12
 15 **tcacgattag catta** 15
 <210> 13
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (15)
 25 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223> LNA
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (2)
 <223> 2'Fluoro-ADN
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (3) .. (3)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (4) .. (5)
 <223> 2'Fluoro-ADN
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6) .. (7)
 45 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8) .. (9)
 <223> 2'Fluoro-ADN
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (10)
 <223> LNA
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (11) .. (11)
 <223> 2'Fluoro-ADN
 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (12) .. (12)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13) .. (13)
 65 <223> 2'Fluoro-ADN
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (14) .. (15)
 <223> LNA
 <400> 13
 5 **tcacgattag catta** 15
 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (2)
 15 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (2)
 <223> LNA
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4) .. (4)
 <223> LNA
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (6) .. (6)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (8) .. (8)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (10)
 35 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12) .. (12)
 <223> LNA
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> LNA
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (16) .. (16)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (18)..(18)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20) .. (20)
 55 <223> LNA
 <400> 14
cccctatcac gattagcatt aa 22
 <210> 15
 <211> 16
 60 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 <220>
 65 <221> misc_feature

<222> (1) .. (16)
 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (3) .. (3)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (6) .. (6)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (9)
 15 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> LNA
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (15) .. (15)
 <223> LNA
 <400> 15
tcacgattag cattaa 16
 25 <210> 16
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (15)
 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> LNA
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (4) .. (4)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (6) .. (6)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 50 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (10)
 <223> LNA
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> LNA
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (14) .. (14)
 <223> LNA
 <400> 16
tcacgattag catta 15
 65 <210> 17

<211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (15)
 <223> enlaces internucleosídicos fosforotioato
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(15)
 <223> enlaces internucleotídicos fosforotioato
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (3) .. (3)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (7)
 25 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (12)
 <223> LNA
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14) .. (14)
 <223> LNA
 <400> 17
 35 **tcacaattag catta** 15
 <210> 18
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (15)
 45 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> LNA
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3) .. (3)
 <223> LNA
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (7)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (10) .. (12)
 <223> LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14) .. (15)
 65 <223> LNA

<400> 18
tcaacattag actta 15
 <210> 19
 <211> 10
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (10)
 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (10)
 <223> LNA
 <400> 19
attagcatta 10
 <210> 20
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (9)
 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (9)
 <223> LNA
 <400> 20
ttagcatta 9
 35 <210> 21
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (8)
 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (8)
 <223> LNA
 <400> 21
 50 **tagcatta** 8
 <210> 22
 <211> 7
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (7)
 60 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (7)
 <223> LNA

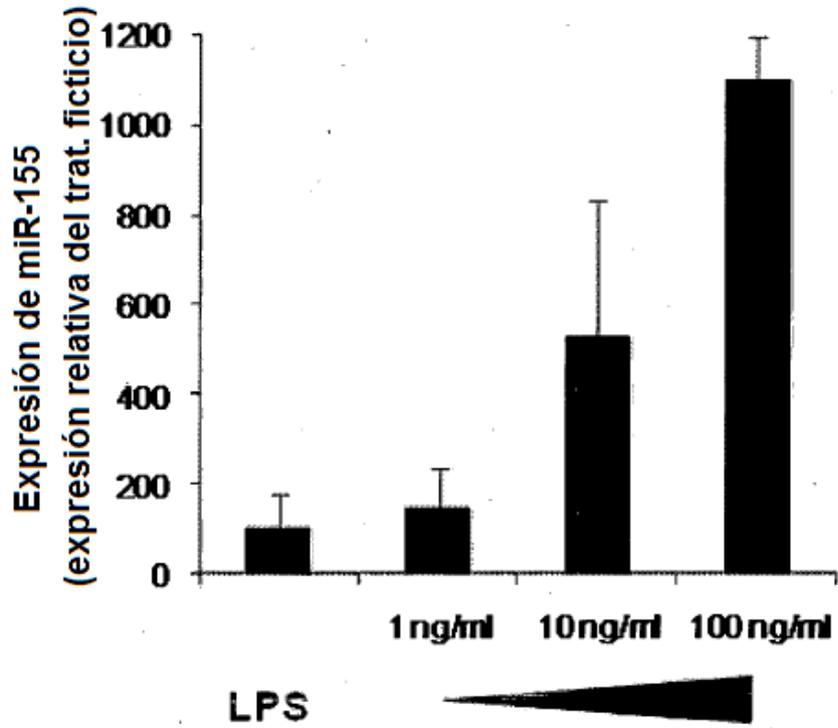
<400> 22
agcatta 7
 <210> 23
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (9)
 <223> enlaces internucleosídicos de fosforotioato
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (1) .. (9)
 <223> LNA
 <400> 23
tatgtagga 9
 <210> 24
 20 <211> 8
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (8)
 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (1)..(8)
 <223> LNA
 <400> 24
atgtagga 8
 35 <210> 25
 <211> 7
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> secuencia de motivo nucleotídico, p.ej. secuencias de oligómero de ADN/LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(7)
 <223> enlaces internucleotídicos de fosforotioato
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (7)
 <223> LNA
 <400> 25
 50 **tgtagga** 7

REIVINDICACIONES

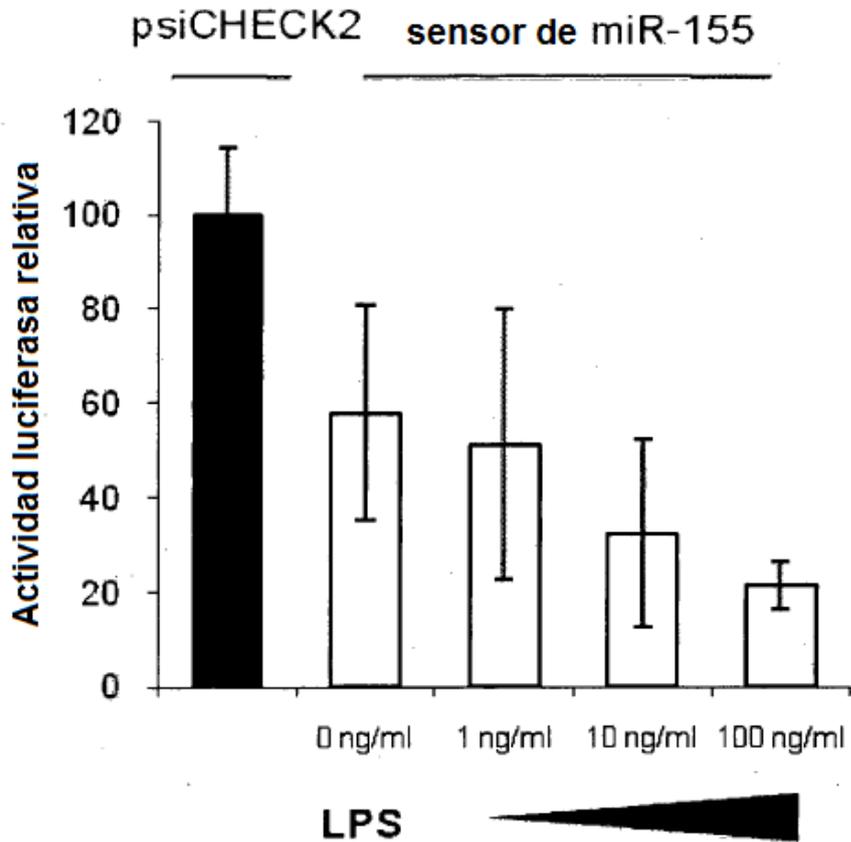
- 5 1. Un inhibidor de microARN-155 para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria mediante la inhibición de la expresión de uno o más factores estimulantes de colonias (CSF) en una célula, en el que dicho inhibidor comprende un oligómero de LNA antimir monocatenario de 7-23 nucleótidos de longitud, en el que dicho oligómero comprende una secuencia nucleotídica contigua que comprende una o más unidades de LNA, en el que dicha secuencia nucleotídica contigua es totalmente complementaria de al menos 6 nucleótidos contiguos presentes en microARN-155.
- 10 2. El inhibidor de microARN-155 para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor es para la inhibición simultánea de la expresión de G-CSF, M-CSF, CCL-2 e IL-6 en una célula.
- 15 3. El inhibidor de microARN-155 para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha célula se selecciona del grupo consistente en monocitos/macrófagos, granulocitos, neutrófilos, eosinófilos, citoblastos hematopoyéticos pluripotentes y unidades formadoras de colonias (UFC).
- 20 4. El inhibidor de microARN-155 para su uso según la reivindicación 3, en el que dicha célula es una célula precursora de leucocito.
- 25 5. El inhibidor de microARN-155 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha célula sobreexpresa dicho CSF.
6. El inhibidor de microARN-155 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho oligómero consiste en o comprende una secuencia nucleotídica contigua que es totalmente complementaria de la región de semilla de microARN-155.
- 30 7. El inhibidor de microARN-155 para su uso según la reivindicación 6, en el que la secuencia nucleotídica contigua del oligómero es complementaria de la correspondiente región de una SEQ ID NO 2.
- 35 8. El inhibidor de microARN-155 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en el que la secuencia nucleotídica del oligómero consiste en 7, 8, 9 o 10 nucleótidos contiguos que son complementarios de la correspondiente región de microARN-155.
9. El inhibidor de microARN-155 para su uso según la reivindicación 8, en el que la secuencia nucleotídica contigua es totalmente complementaria de una secuencia encontrada en la SEQ ID NO 2.
- 40 10. El inhibidor de microARN-155 para su uso según la reivindicación 7, en el que la secuencia nucleotídica contigua consiste en 7-16 nucleótidos.
- 45 11. El inhibidor de microARN-155 para su uso según la reivindicación 10, en el que la secuencia nucleotídica contigua del oligómero consiste en 8-11 nucleótidos.
12. El inhibidor de microARN-155 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6-11, en el que dicho oligómero comprende al menos un 50% de nucleótidos de LNA.
- 50 13. El inhibidor de microARN-155 para su uso según las reivindicaciones 6-12, en el que la secuencia nucleotídica contigua del oligómero consiste en 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de LNA contiguos.
- 55 14. El inhibidor de microARN-155 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que los ligamientos internucleosídicos entre las unidades nucleobásicas de la secuencia nucleotídica contigua son ligamientos internucleosídicos de fosforotioato.
15. El inhibidor de microARN-155 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el oligómero se selecciona del grupo consistente en las SEQ ID NO: 5-25.

FIGURA 1

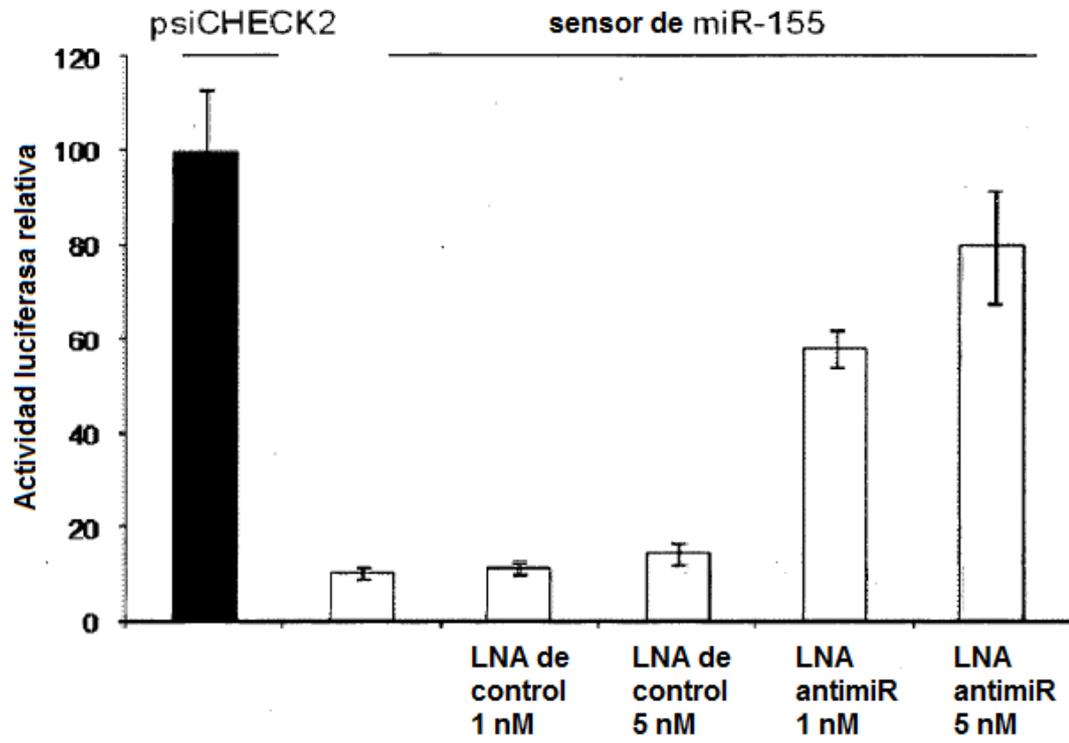
A



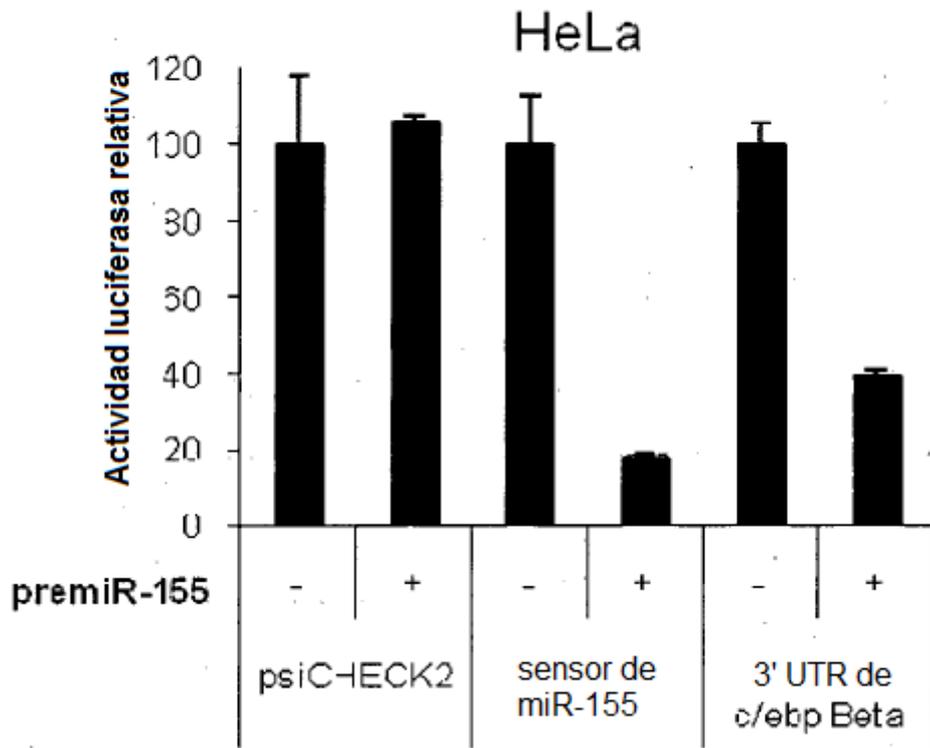
B



C

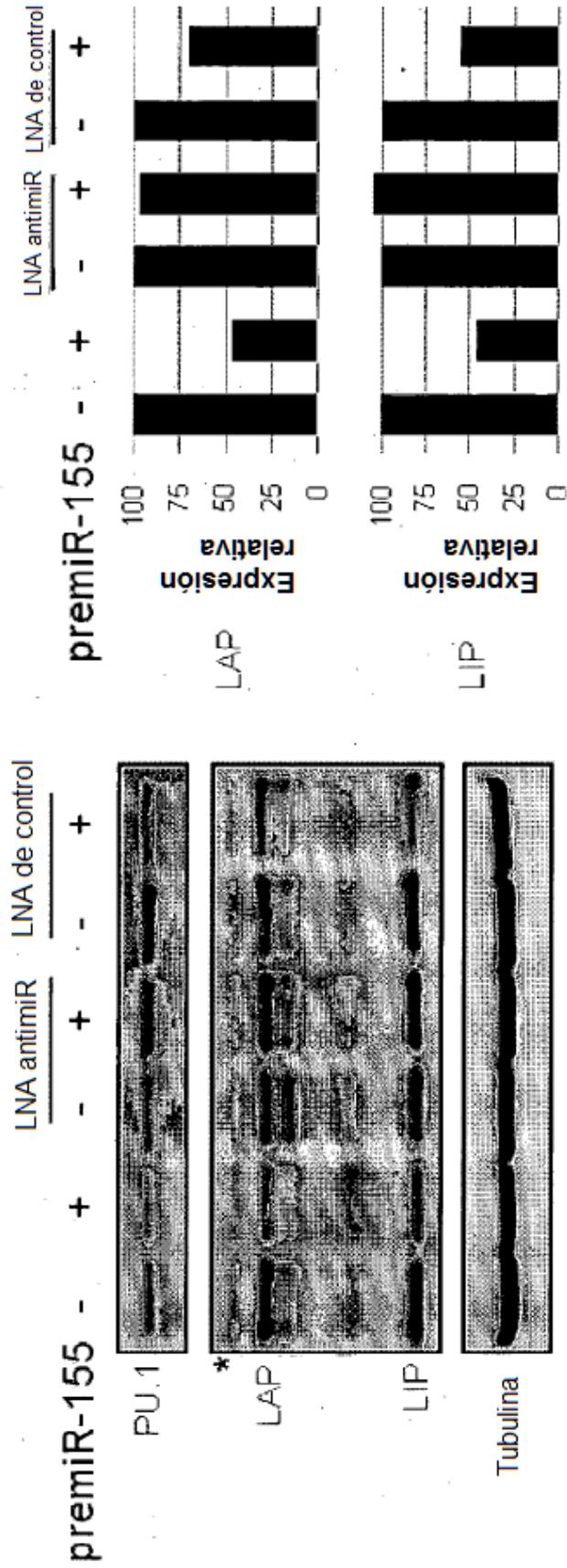


B



C

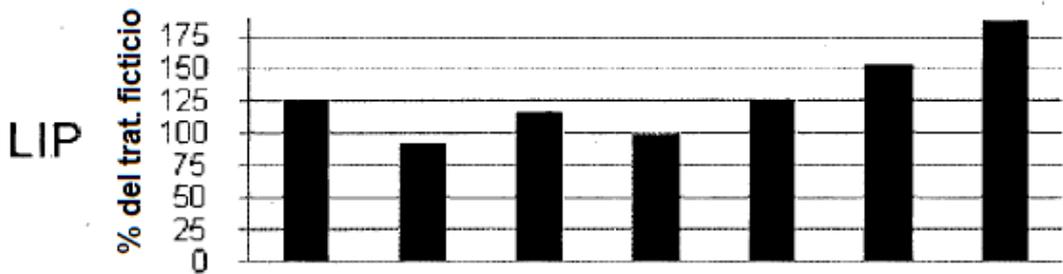
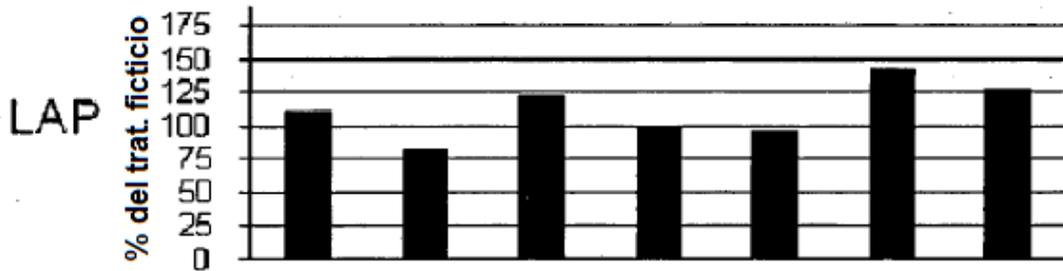
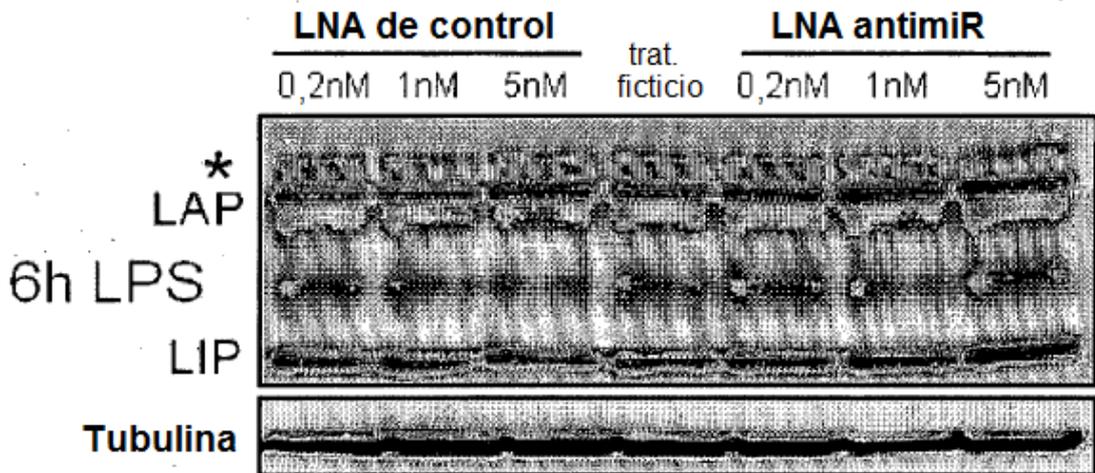
Raw264.7



D

Raw264.7

6h LPS



E

THP-1

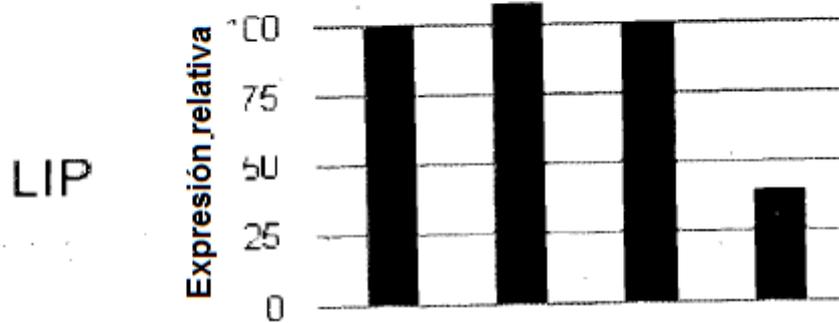
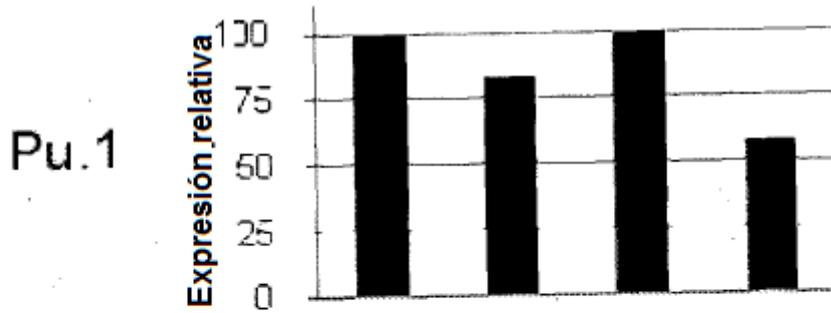
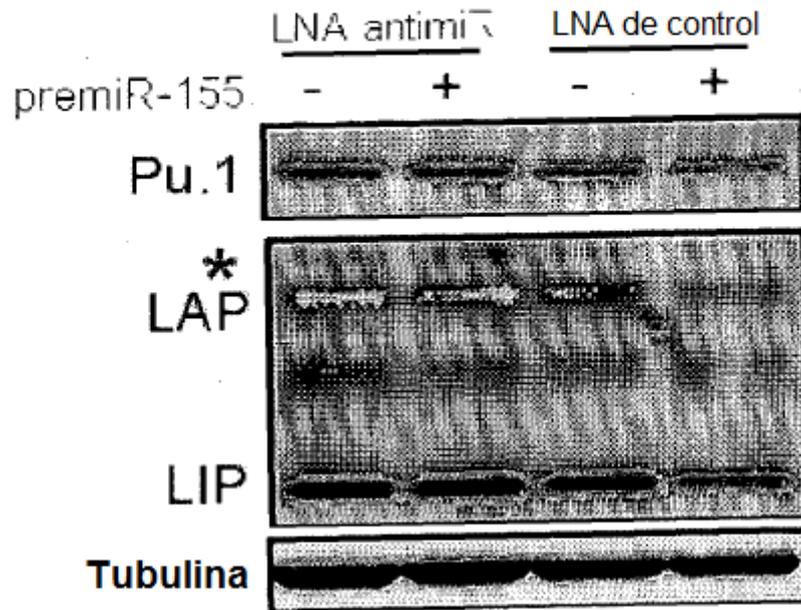
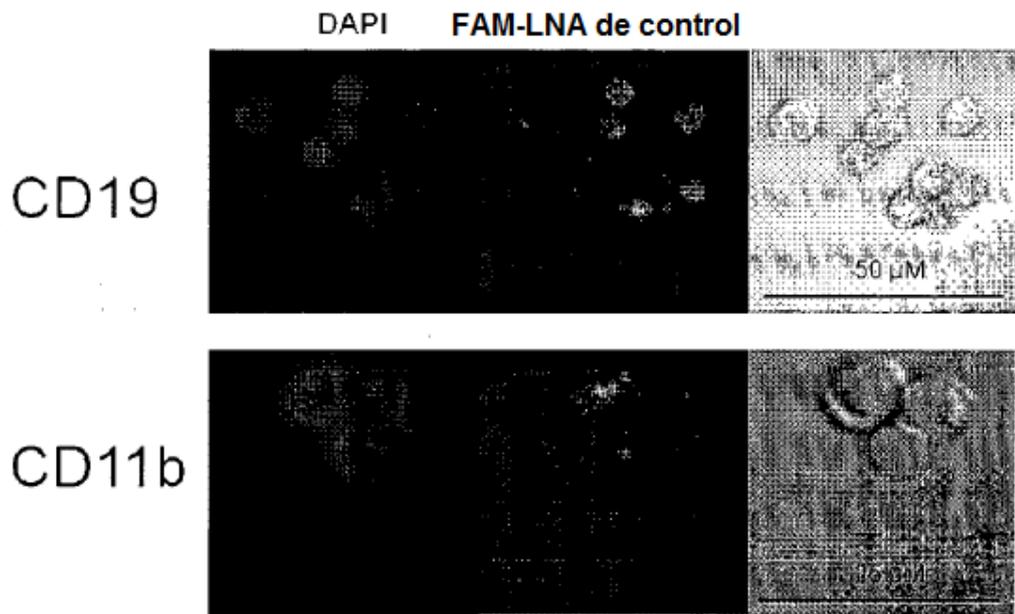
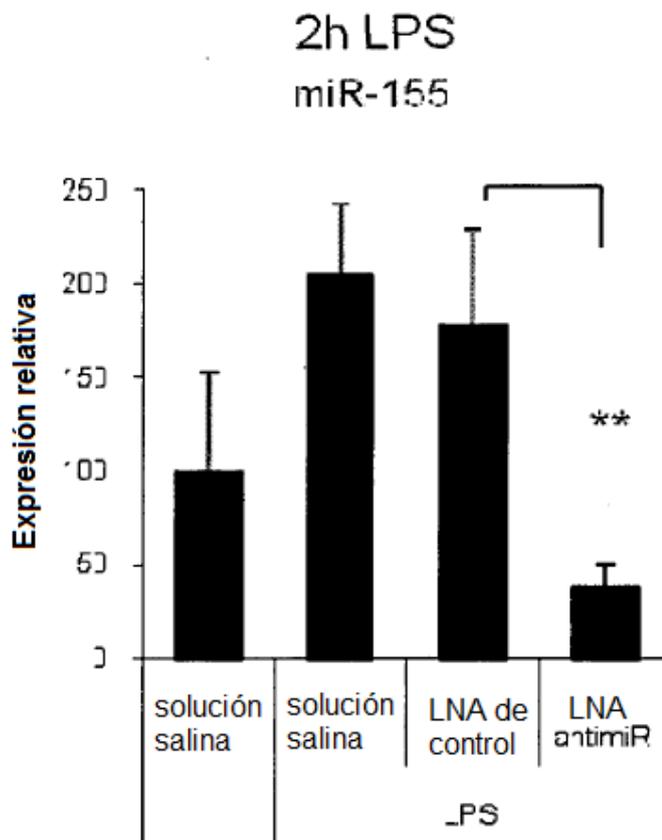


FIGURA 3

A



B



C

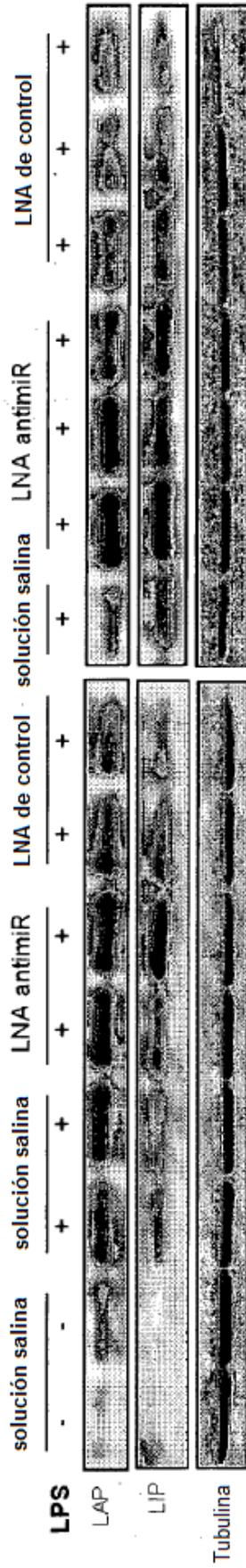
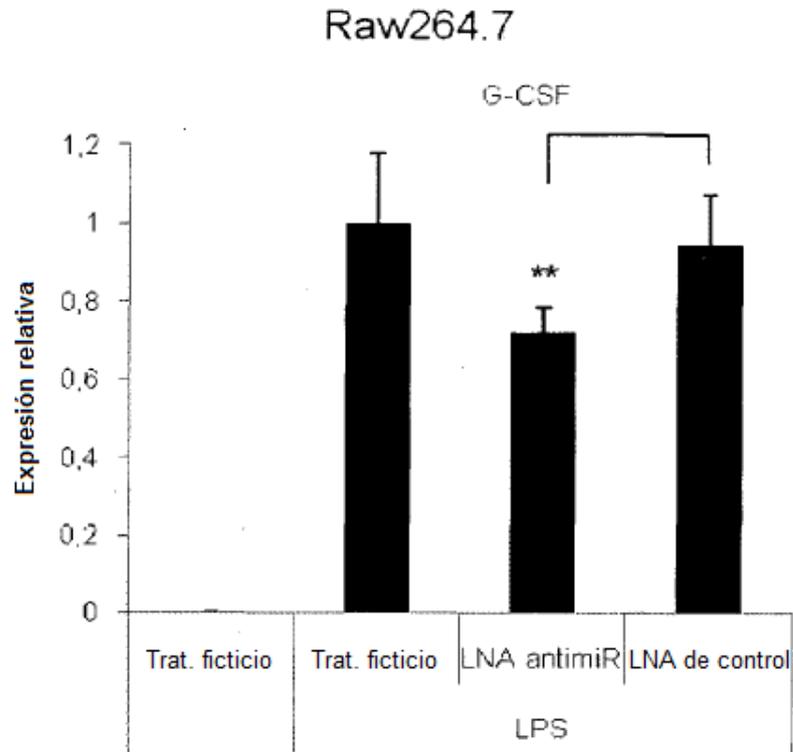
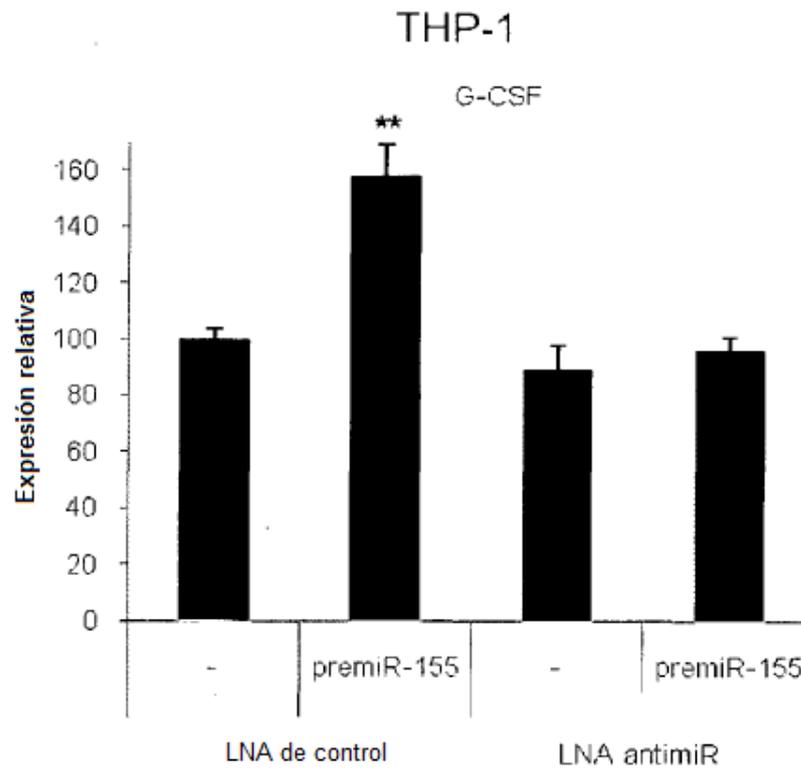


FIGURA 4

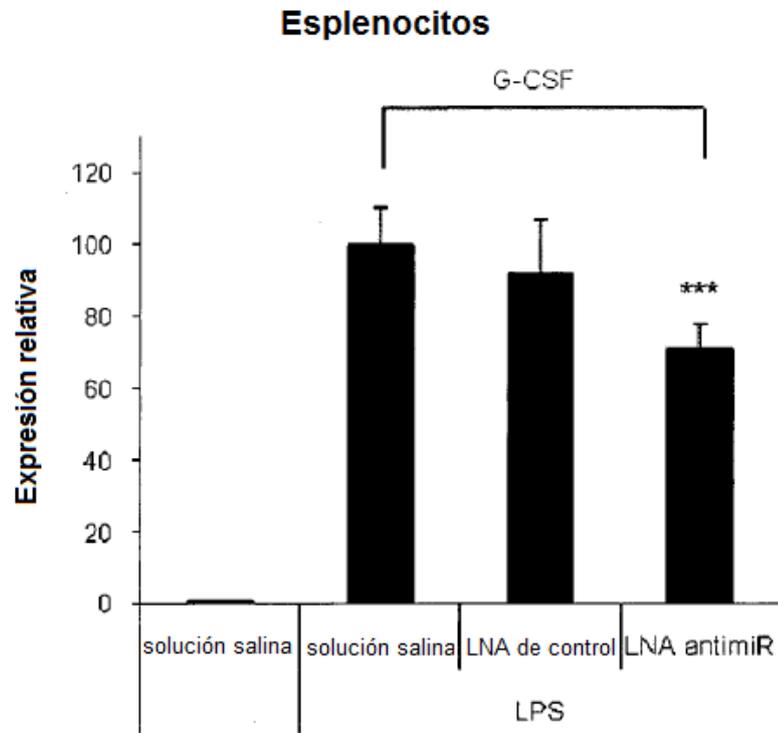
A



B



C



D

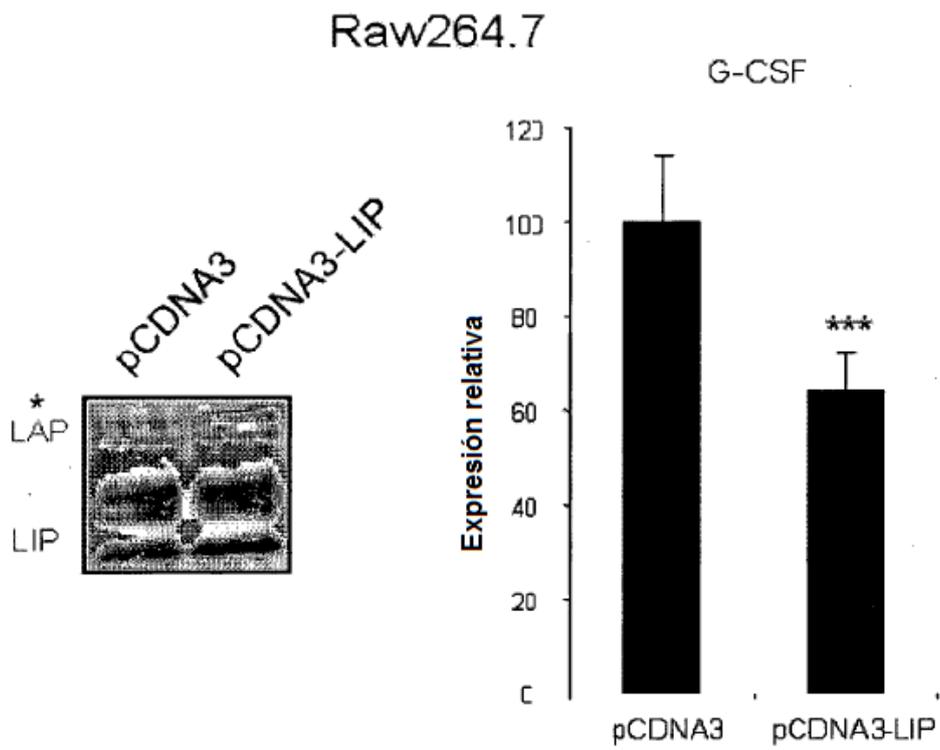


FIGURA 5

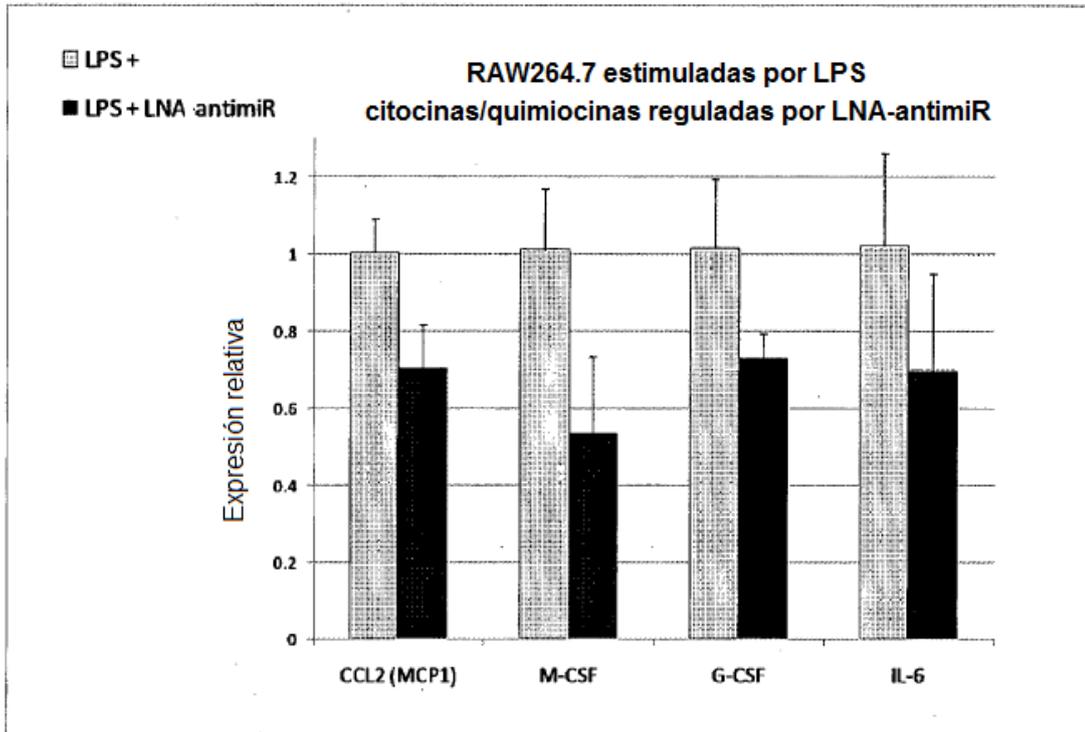


FIGURA 6

Tabla 1 (continúa en la página siguiente)

Ensayo	sin LPS		LPS + trat. fict.		LPS + LNA antimir		LPS + LNA de control		DE
	DE	DE	DE	DE	DE	DE	DE	DE	
18S-Hs9999901_s1	0.9375	0.0004	1.0279	0.2677	0.8610	0.1219	0.7599	0.1857	
Actb-Mm00607939_s1	0.7388	0.2016	1.0096	0.1530	0.7417	0.0901	0.8452	0.1471	
B2m-Mm00437762_m1	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	
Bax-Mm00432050_m1	1.2480	0.3010	1.0064	0.1300	0.9081	0.2158	0.8668	0.1006	
Bcl2-Mm0047763_1_m1	2.2519	0.2083	1.0223	0.2355	1.1066	0.3723	1.1092	0.3027	
Bcl2l1-Mm00437783_m1	0.1991	0.0384	1.0024	0.0792	0.7747	0.0464	0.8049	0.0819	
Ccl2-Mm00441242_m1	0.0253	0.0078	1.0031	0.0879	0.7080	0.1112	0.8733	0.1057	
Ccl5-Mm01302428_m1	0.0097	0.0002	1.0311	0.2767	0.7837	0.2088	0.6619	0.2531	
Ccr2-Mm99999051_gH	0.3607	0.0768	1.0173	0.2206	0.9392	0.3163	1.0573	0.3798	
Cd40-Mm00441895_m1	0.0245	0.0069	1.0333	0.3095	0.5908	0.1918	0.5971	0.1193	
Cd68-Mm00839636_g1	1.3071	0.0866	1.0140	0.1842	1.1925	0.5203	1.1315	0.2784	
Col4a5-Mm00801606_m1	1.5525	0.0868	1.0150	0.1930	0.8615	0.2284	0.9067	0.2539	
Csf1-Mm00432688_m1	0.0820	0.0113	1.0098	0.1583	0.5355	0.1996	0.6288	0.2083	
Csf2-Mm00438328_m1	0.0054	0.0010	1.0057	0.1193	0.8158	0.3177	0.8675	0.1253	
Csf3-Mm00438334_m1	0.0006	0.0006	1.0140	0.1819	0.7346	0.0606	0.9587	0.1288	
Cxcl10-Mm00445235_m1	0.0619	0.0083	1.0128	0.1801	0.5590	0.3970	0.4628	0.2324	
Cxcl11-Mm00444662_m1	0.0721	0.0042	1.0201	0.2329	0.6205	0.3733	0.3965	0.2425	
Cxcr3-Mm00438259_m1	0.6879	0.1250	1.0141	0.1913	1.6589	1.2262	1.3932	0.7609	
Edn1-Mm00438656_m1	0.0057	0.0046	1.0012	0.0561	0.6144	0.3441	0.5755	0.2039	
Fas-Mm00433237_m1	0.0240	0.0057	1.0221	0.2453	1.1592	0.3020	1.1681	0.5521	
Gapdh-Mm9999915_g1	1.3360	0.2801	1.0268	0.2593	1.0652	0.1755	1.0717	0.0859	
Gusb-Mm00446953_m1	1.4499	0.1742	1.0096	0.1570	0.9847	0.3647	1.0177	0.1633	
Hmox1-Mm00516004_m1	0.2595	0.0679	1.0166	0.2106	1.0389	0.3518	1.1968	0.3125	
Hprt1-Mm00446968_m1	1.2865	0.2521	1.0126	0.1761	1.0330	0.1590	0.9580	0.0894	
Ikbkb-Mm00833995_m1	1.2613	0.1259	1.0185	0.2196	0.8985	0.0924	0.9720	0.2798	

FIGURA 6

Tabla 1 (continúa de la página anterior)

Ensayo	sin LPS		LPS + trat. fict.		LPS + LNA antimir		LPS + LNA de control		DE
	DE	DE	DE	DE	DE	DE	DE	DE	
Il10-Mm00439616_m1	0.0142	0.0087	1.0169	0.2038	0.6034	0.2930	0.4887	0.2002	
Il15-Mm00434210_m1	0.1162	0.0235	1.0128	0.1855	0.5932	0.1028	0.5971	0.1610	
Il18-Mm00434225_m1	0.3446	0.0047	1.0082	0.1449	0.5391	0.2131	0.5093	0.1543	
Il1a-Mm00439620_m1	0.0006	0.0005	1.0243	0.2393	0.9922	0.3170	1.0616	0.4361	
Il1b-Mm00434228_m1	0.0008	0.0007	1.0084	0.1451	1.2679	0.4510	1.2943	0.4952	
Il6-Mm00446190_m1	0.0092	0.0070	1.0212	0.2408	0.6995	0.2504	0.8726	0.0873	
Nfkb1-Mm00476361_m1	0.2822	0.0703	1.0450	0.3146	1.0648	0.2674	1.0596	0.1769	
Nfkb2-Mm00479807_m1	0.4927	0.0378	1.0262	0.2531	1.0900	0.5365	0.9908	0.2922	
Nos2-Mm00440485_m1	0.0058	0.0005	1.0166	0.2104	0.6834	0.3175	0.7239	0.2233	
Pgk1-Mm00435617_m1	1.1348	0.4384	1.0202	0.2212	1.0281	0.1465	1.0367	0.1242	
Ptgs2-Mm00478374_m1	0.0185	0.0078	1.0148	0.1869	0.8186	0.0984	0.8933	0.2053	
Ptprc-Mm00448463_m1	0.7932	0.1191	1.0135	0.1956	1.0371	0.3183	0.9987	0.1665	
Ski-Mm00448744_m1	1.7935	0.4346	1.0146	0.1999	0.9487	0.2828	1.1385	0.1931	
Smad3-Mm00489637_m1	16.1292	1.1624	1.0609	0.3625	1.9802	1.2987	1.9752	0.6622	
Smad7-Mm00484741_m1	0.4462	0.2992	1.0073	0.1386	1.1874	0.5784	1.2480	0.3949	
Socs1-Mm00782550_s1	0.1742	0.0039	1.0138	0.1922	0.5360	0.0675	0.6564	0.0521	
Stat1-Mm00439518_m1	0.4881	0.0600	1.0116	0.1763	0.6385	0.1285	0.8379	0.1344	
Stat3-Mm00456961_m1	0.3762	0.0992	1.0109	0.1704	0.6836	0.0788	0.7288	0.0564	
Stat6-Mm00447411_m1	22.2184	28.9697	9.9266	17.5966	2.7782	3.0628	0.3388	0.2099	
Tfrc-Mm00441941_m1	0.9249	0.1226	1.0095	0.1560	0.9890	0.3955	0.9834	0.1973	
Tgfb1-Mm00441724_m1	0.5160	0.0577	1.0136	0.1894	1.1053	0.4592	0.9811	0.3000	
Tnf-Mm00443258_m1	0.1424	0.0465	1.0124	0.1901	0.8968	0.2159	0.9019	0.1719	
Vegfa-Mm00437304_m1	0.4666	0.0576	1.0184	0.2105	1.7543	1.2141	1.4760	0.5834	