

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 625**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2010 E 10788176 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2547769**

54 Título: **Antagonistas de miARN de oligonucleótido conjugado con aglutinante del surco menor (MGB)**

30 Prioridad:

25.11.2009 US 264380 P

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

21.06.2016

73 Titular/es:

**ELITECHGROUP B.V. (50.0%)
Van Rensselaerweg 4
6956 AV Spankeren, NL y
DHARMACON, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KHVOROVA, ANASTASIA;
VERMEULEN, ANNALEEN;
KAISER, ROB;
KARPILOW, JON;
VERMEULEN, NICOLAAS y
MAHONEY, WALT**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 574 625 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Antagonistas de miARN de oligonucleótido conjugado con aglutinante del surco menor (MGB)

Antecedentes

5 La presente invención se refiere a composiciones y a procedimientos de inhibición de las acciones de ARN no codificantes tales como miARN y ARNpi.

10 La interferencia del ARN es una vía casi omnipresente implicada en la modulación génica posterior a la transcripción. La molécula efectora clave de la interferencia del ARN es el microARN ("miARN" o "miR"). Estos ARN pequeños, no codificantes, se transcriben como miARN primarios, mostrados en la Figura 1, y son procesados en el núcleo por Drosha (una ribonucleasa de tipo III) para generar estructuras de horquilla cortas denominadas miARN
 15 precursores. Estas moléculas se transportan luego al citoplasma y son procesadas por una segunda nucleasa (Dicer) para generar la forma dúplex, madura, del miARN que luego se puede incorporar al complejo de silenciamiento inducido por ARN ("RISC"). Las interacciones entre el miARN maduro-complejo RISC y el ARN mensajero diana ("ARNm") están mediadas (en parte) por la región semilla de la cadena guía del miARN (nucleótidos 2-7), y conducen a la desactivación génica mediante la escisión de transcripciones y/o atenuación de la traducción.

20 Las herramientas que permiten a los investigadores comprender los papeles que los miARN y las dianas de miARN desempeñan en la enfermedad, la diferenciación celular y la homeostasis tienen un valor incalculable. Dichas herramientas incluyen, pero sin limitación, los inhibidores de miARN. Las clases de inhibidores de miARN se han descrito anteriormente (véase Meister, 2004 y Hutvagner, 2004). Estas moléculas son monocatenarias, varían en
 25 tamaño de 21 a 31 nucleótidos ("nts") de longitud y contienen sustituciones de O-metilo en la posición 2' del anillo de ribosa. Desde el descubrimiento original de los inhibidores de miARN, se han identificado múltiples elementos de diseño, que se han incorporado para mejorar la eficacia de estas moléculas en un entorno biológico. Por ejemplo, se ha demostrado que los inhibidores que tienen mayores longitudes o que llevan incorporadas estructuras secundarias (por ejemplo, inhibidores bicatenarios) muestran un rendimiento superior frente a un diseño monocatenario más
 corto, de 21 a 31 nucleótidos (Vermeulen y col., 2007). Otros diseños incluyen la incorporación de ácidos nucleicos bloqueados ("LNA") (Orom y col., 2006).

30 Gracias al artículo "Investment Firm Accelerator Launches miRNA Drug Developer, Licenses Nanogen MGB Tech" de Doug Macron, publicado en la página Web www.genomeweb.com/print/67776, y al artículo "Nanogen Spins Out Firm and Plans to Merge with the Elitech Group", que se puede descargar en www.genengnews.com/keywordsandtools/print/4/693C, se conocen agentes terapéuticos dirigidos a microARN que se basan en aglutinantes del surco menor. El documento WO2006/020768 describe composiciones que comprenden agentes oligonucleotídicos modificados químicamente para su uso en la inhibición de la expresión génica.

Sumario

35 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición inhibidora de acuerdo con la reivindicación 1. La presente invención proporciona composiciones y procedimientos de inhibición de las acciones de los ARN no codificantes tales como miRNA y ARNpi. Las composiciones comprenden oligonucleótidos monocatenarios o bicatenarios conjugados con aglutinantes del surco menor ("MGB"). La longitud de la parte oligonucleotídica de la
 40 composición puede variar considerablemente. Además, el oligonucleótido puede tener incorporadas estructuras secundarias que incluyen, pero sin limitación, las procedentes de horquillas, protuberancias y/o desapareamientos. Preferentemente, los oligonucleótidos contienen una secuencia que es (al menos) esencialmente complementaria (aproximadamente en un 70 %) a una o varias secuencias de miARN o ARNpi maduras endógenas.

45 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la mejora del rendimiento de los inhibidores de miARN probablemente se debe a una mayor afinidad de unión entre el inhibidor y la molécula diana. Por lo tanto, las estrategias alternativas para mejorar la estabilidad del dúplex o bloquear el complejo de inhibidor-miARN-RISC en una configuración más deseable serían mejorar aún más la funcionalidad de los diseños actuales de los inhibidores de miARN.

50 Los oligonucleótidos conjugados con aglutinantes del surco menor ("MGB") pueden formar dúplex estables con secuencias complementarias (Kutyavin, 1. V., y col., 2000). Aunque todavía no se comprende del todo el mecanismo de las acciones de los MGB, se ha sugerido que los MGB provocan cambios conformacionales que mejoran la estabilidad de los dúplex. Del mismo modo, se espera que la conjugación de los MGB a moléculas inhibidoras cortas mejore significativamente su potencia frente a los inhibidores no MGB de tamaño similar.

El componente de aglutinante del surco menor también puede variar en gran medida e incluir cualquier número de estructuras. En la patente de EE.UU. n.º 5.801.155 y en la patente de EE.UU. n.º 7.582.739, se pueden encontrar ejemplos no limitantes de las estructuras de los MGB. Estos MGB pueden conjugarse con el extremo 5' y/o 3' de uno o más oligonucleótidos, o se pueden asociar con uno o más nucleótidos en el interior de un oligonucleótido.

55 Las composiciones desveladas en el presente documento son útiles en diversos procedimientos *in vivo* o *in vitro* de inhibición de las acciones del miARN. Por ejemplo, las composiciones se pueden usar en el tratamiento de una

enfermedad o afección caracterizada por la sobreexpresión de un miARN mediante la administración de una cantidad óptima de un antagonista de MGB de la invención contra dicho miARN.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un esquema general de la vía de interferencia del ARN.

5 La Figura 2(a) muestra un esquema de dos configuraciones de MGB (fracciones de DPI₃ y CDPI₃) conjugadas con oligonucleótidos. La Figura 2(b) muestra un esquema de las posiciones ilustrativas en las que los MGB se pueden sustituir.

La Figura 3 muestra un esquema del ensayo de la luciferasa doble.

10 La Figura 4a muestra el rendimiento de múltiples diseños de inhibidores de miARN en la construcción indicadora de la luciferasa doble let-7c. La Figura 4b muestra el rendimiento de múltiples diseños de inhibidores de miARN en la construcción indicadora de la luciferasa doble miR-21.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. General

15 La presente invención se dirige a composiciones y a procedimientos de inhibición de la interferencia del ARN, incluyendo ARNip, ARNpi y el silenciamiento génico inducido por miARN.

20 La presente invención proporciona composiciones y procedimientos de inhibición de las acciones de los ARN no codificantes tales como miARN y ARNpi. Las composiciones comprenden oligonucleótidos monocatenarios o bicatenarios conjugados con aglutinantes del surco menor ("MGB") a través de un engarce. La parte oligonucleotídica de la molécula se puede componer de ARN, ADN o híbridos de ARN-ADN con cualquiera de los nucleótidos de los anteriores modificados o sin modificar. La longitud de la parte oligonucleotídica de la composición puede variar considerablemente, y varía de tan corta como de 6 nucleótidos o pares de bases (por ejemplo, la longitud mínima de la región semilla) hasta tan larga como de 100 nucleótidos o pares de bases. Además, el oligonucleótido puede llevar incorporadas estructuras secundarias entre las que se incluyen, pero sin limitación, las procedentes de horquillas, protuberancias y/o desapareamientos. Preferentemente, los oligonucleótidos contienen una secuencia que es (al menos) esencialmente complementaria (aproximadamente en un 70 %) a una o varias secuencias de miARN o ARNpi maduras endógenas.

30 La Figura 1 es un esquema que describe los detalles más básicos de la vía de interferencia del ARN. Primero se transcriben miARN endógenos como miARN primarios, que consisten, como mínimo, en una estructura de horquilla con regiones flanqueantes 5' y 3'. Los miARN primarios son procesados por Drosha, proporcionando miARN precursores, que consisten en estructuras de horquilla simplificadas. Los miARN precursores son transportados fuera del núcleo al citoplasma, donde vuelven a ser procesados por Dicer en las formas dúplex maduras de miARN, que son capaces de entrar en RISC y silenciar la expresión génica mediante cualquier escisión de ARNm o atenuación de la traducción.

II. Definiciones

35 A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y expresiones tienen los significados indicados a continuación:

El término "indicador" o la expresión "gen indicador" se refieren a un gen cuya expresión se puede controlar. Por ejemplo, los niveles de expresión de un indicador se pueden analizar para evaluar el éxito del silenciamiento de genes por sustratos de la vía de interferencia del ARN.

40 La expresión "complejo de silenciamiento inducido por el ARN" y sus siglas "RISC" se refieren al conjunto de proteínas que forman complejos con polinucleótidos monocatenarios tales como el miARN maduro o el ARNip, para dirigirse a moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) para la escisión, la atenuación de la traducción, la metilación y/u otras alteraciones. Los componentes conocidos de RISC incluyen, sin limitación, Dicer, R2D2 y la familia de proteínas Argonaute, así como cadenas de ARNip y miARN.

45 La expresión "interferencia del ARN" se refiere al procedimiento mediante el cual un polinucleótido (a miARN o ARNip) que comprende al menos una unidad de polirribonucleótido ejerce un efecto sobre un proceso biológico. El procedimiento incluye, pero sin limitación, el silenciamiento de genes mediante la degradación de ARNm, la atenuación de la traducción, las interacciones con los ARNt, ARNr, ARNnh, ADNc y ADN genómico, así como la metilación de ADN con proteínas auxiliares.

50 La expresión "silenciamiento génico" se refiere a un procedimiento mediante el cual la expresión de un determinado producto génico se reduce o se atenúa por interferencia del ARN. El nivel de silenciamiento génico (también denominado a veces grado de "desactivación") se puede medir mediante una variedad de medios, incluyendo, pero sin limitación, la medición de los niveles de transcripción por análisis de transferencia Northern, las técnicas de B-

ADN, construcciones indicadoras sensibles a la transcripción, perfiles de expresión (por ejemplo, chips de ADN), qRT-PCR y tecnologías relacionadas. Como alternativa, el nivel de silenciamiento se puede medir mediante la evaluación del nivel de la proteína codificada por un gen específico. Esto se puede lograr mediante la realización de una serie de estudios que incluyen análisis Western, la medición de los niveles de expresión de una proteína indicadora que tenga, por ejemplo, propiedades fluorescentes (por ejemplo, GFP) o actividad enzimática (por ejemplo, fosfatasa alcalina) u otros varios procedimientos.

Todos los términos "microARN", "miARN" o "miR" se refieren a ARN no codificantes (y también, según lo indique el contexto, a secuencias de ADN que codifican dichos ARN) que son capaces de entrar en la vía de interferencia del ARN y regular la expresión génica. El "miARN primario" representa la transcripción no codificante previa al procesamiento por parte de Drosha, e incluye la/s estructura/s de tallo-bucle, así como las secuencias 5' y 3' flanqueantes. Los "miARN precursores" representan la transcripción no codificante posterior al procesamiento por parte de Drosha del miARN primario. La expresión "miARN maduro" puede referirse al producto bicatenario procedente del procesamiento por parte de Dicer del miARN precursor o el producto monocatenario que se introduce en RISC tras el procesamiento por parte de Dicer. En algunos casos, solo entra una sola cadena de un miARN en la ruta de interferencia del ARN. En otros casos, dos cadenas de un miARN son capaces de entrar en la vía de interferencia del ARN.

La expresión "cadena madura" se refiere a la secuencia de un miARN endógeno que es el complemento inverso total o parcial de (es decir, es total o parcialmente complementario a) un ARN diana de interés. Las expresiones "secuencia madura" o "cadena de dirección" y "secuencia de dirección" son sinónimos del término "cadena madura", y se usan indistintamente en el presente documento.

Las expresiones "inhibidor de MGB", "inhibidor de miARN de MGB", "antagonista de MGB" y "antagonista de miARN de oligonucleótido-MGB" se usan indistintamente, y se refieren a una molécula que tiene un componente oligonucleotídico conjugado con un aglutinante del surco menor ("MGB") y que es capaz de inhibir la acción de un miARN o ARNpi.

La expresión "secuencia diana" se refiere a una secuencia de un ARN o un ADN diana que es parcial o totalmente complementaria a la cadena madura. La secuencia diana se puede describir usando las cuatro bases de ADN (A, T, G y C) o las cuatro bases de ARN (A, U, G y C).

La expresión "ARN diana" se refiere a un ARN específico que se dirige por la vía de interferencia del ARN, generando una reducción de la actividad funcional del ARN. En algunos casos, el ARN diana es un ARNm cuya actividad funcional es su capacidad de ser traducido. En dichos casos, la vía de interferencia del ARN disminuirá la actividad funcional del ARNm mediante la atenuación de la traducción o por escisión. En la presente divulgación, los ARN diana son miARN, RNApi o moléculas relacionadas, cuya función puede inhibirse mediante la unión. El término "diana" también puede referirse a ADN.

El término "complementario" se refiere a la capacidad de los polinucleótidos para formar pares de bases entre sí. Los pares de bases normalmente se forman mediante enlaces de hidrógeno entre unidades de nucleótidos de cadenas de polinucleótidos antiparalelas. Las cadenas de polinucleótidos complementarias pueden formar pares de bases de la forma de Watson-Crick (por ejemplo, A con T, A con U, C con G), o en cualquier otra forma que permita la formación de dúplex, incluyendo el par de bases oscilante formado entre U y G. Como los expertos en la materia saben, al usar ARN en lugar de ADN, el uracilo en lugar de la timina es la base que se considera que es complementaria a la adenosina. Sin embargo, cuando, en el contexto de la presente invención, se indica un U, está implícita la capacidad de sustituir una T, a menos que se indique lo contrario.

El término "dúplex" se refiere a una estructura bicatenaria formada por dos polinucleótidos complementarios o esencialmente complementarios que forman pares de bases entre sí, incluyendo pares de bases de Watson-Crick y pares oscilantes de U-G que permiten una estructura bicatenaria estabilizada entre las cadenas de polinucleótidos que son al menos parcialmente complementarias. Las cadenas de un dúplex no necesitan ser perfectamente complementarias para que se forme un dúplex, es decir, un dúplex puede incluir uno o más desapareamientos de bases. Además, se pueden formar dúplex entre dos regiones complementarias dentro de una sola cadena (por ejemplo, una horquilla).

El término "nucleótido" se refiere a un ribonucleótido o a un desoxirribonucleótido o a una forma modificada de los mismos, así como a un análogo de los mismos. Los nucleótidos incluyen especies que comprenden purinas, por ejemplo, adenina, hipoxantina, guanina, y sus derivados y análogos, así como pirimidinas, por ejemplo, citosina, uracilo, timina, y sus derivados y análogos. Los análogos de nucleótidos incluyen nucleótidos que tienen modificaciones en la estructura química de la base, azúcar y/o fosfato, incluyendo, pero sin limitación, las modificaciones en la pirimidina de la posición 5, modificaciones en la purina de la posición 8, modificaciones en aminos exocíclicos de la citosina y la sustitución de 5-bromo-uracilo; y las modificaciones en el azúcar de la posición 2', incluyendo, pero sin limitación, ribonucleótidos de azúcar modificado en los que el OH de 2' se reemplaza por un grupo tal como un H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ o CN, en los que R es una fracción alquilo. Los análogos de nucleótidos también pretenden incluir nucleótidos con bases tales como inosina, queuosina, xantina, azúcares tales como 2'-metilribosa, enlaces fosfodiéster no naturales tales como en los etilfosfonatos, fosforotioatos y

péptidos.

Las bases modificadas se refieren a bases de nucleótido tales como, por ejemplo, adenina, guanina, citosina, timina, uracilo, xantina, inosina y queuosina que han sido modificadas mediante el reemplazo o la adición de uno o más átomos o grupos. Algunos ejemplos de los tipos de modificaciones que pueden comprender nucleótidos que están modificados con respecto a las fracciones de base incluyen, pero sin limitación, bases alquiladas, halogenadas, tioladas, aminadas, amidadas o acetiladas, individualmente o en combinación. Los ejemplos más concretos incluyen, por ejemplo, 5-propiniluridina, 5-propinilcitosina, 6-metiladenina, 6-metilguanina, *N,N*-dimetiladenina, 2-propiladenina, 2-propilguanina, 2-aminoadenina, 1-metilinosina, 3-metiluridina, 5-metilcitosina, 5-metiluridina y otros nucleótidos que tienen una modificación en la posición 5, 5-(2-amino)propil-uridina, 5-halocitosina, 5-halouridina, 4-acetilcitosina, 1-metiladenosina, 2-metiladenosina, 3-metilcitosina, 6-metiluridina, 2-metilguanosina, 7-metilguanosina, 2,2-dimetilguanosina, 5-metilaminoetiluridina, 5-metiloxiuridina, desazanucleótidos tales como 7-desaza-adenosina, 6-azouridina, 6-azocitosina, 6-azotimidina, 5-metil-2-tiouridina, otras bases tio tales como 2-tiouridina y 4-tiouridina y 2-tiocitosina, dihidouridina, pseudouridina, queuosina, arcaeosina, naftilo y grupos naftilo sustituidos, cualquier purina y pirimidina O- y N-alquilada tal como N6-metiladenosina, 5-metilcarbonilmetiluridina, ácido 5-oxiacético de uridina, piridin-4-ona, piridin-2-ona, fenilo y grupos fenilo modificados tales como aminofenol o 2,4,6-trimetoxi-benceno, citosinas modificadas que actúan como nucleótidos sujetos a G, adeninas y guaninas 8-sustituidas, uracilos y timinas 5-sustituidos, azapirimidinas, nucleótidos de carboxihidroalquilo, nucleótidos de carboxialquilamino y nucleótidos alquilcarbonilalquilados. Los nucleótidos modificados también incluyen aquellos nucleótidos que están modificados con respecto a la fracción de azúcar, tales como aquellos que contienen un puente de metileno 2'-O, 4'-C, así como nucleótidos que tienen azúcares o análogos de los mismos que no son ribosilo. Por ejemplo, las fracciones de azúcar pueden ser, o estar basadas en, manosas, arabinosas, glucopiranosas, galactopiranosas, 4'-tiouridina y otros azúcares, heterociclos o carbociclos.

El término nucleótido también pretende incluir lo que se conoce en la técnica como bases universales. A modo de ejemplo, las bases universales incluyen, pero sin limitación, 3-nitropirrol, 5-nitroindol o nebularina. El término "nucleótido" también pretende incluir el fosforamido N3' a P5', producido por la sustitución de un oxígeno 3' de ribosilo con un grupo amina. Además, el término nucleótido también incluye aquellas especies que tienen un marcador detectable tales como, por ejemplo, una fracción radioactiva o fluorescente, o un marcador de masa unido al nucleótido.

III. Descripción de las realizaciones

En una realización, un inhibidor de miARN de MGB comprende un componente oligonucleotídico y una combinación de engarce y MGB, teniendo el engarce de aproximadamente 3 a 100 átomos de cadena principal, seleccionados entre C, O, N, S, P y Si. El engarce puede ser un engarce trivalente, una cadena alifática ramificada, una cadena de heteroalquilo, una o más estructuras anulares sustituidas, o combinaciones de los mismos. En una realización preferida, el inhibidor comprende un oligonucleótido monocatenario que (1) puede variar entre 6 y 100 nucleótidos de longitud; (2) tiene regiones que son esencialmente complementarias a uno o más miARN o ARNpi maduros, o partes de miARN o ARNpi maduros; y (3) se conjuga con uno o más aglutinantes del surco menor (MGB) a través de un engarce. Preferentemente, la molécula comprende un MGB que es DPI₃ o CDPI₃.

Otra realización se refiere a un procedimiento de modulación de la expresión génica; procedimiento que comprende introducir en una célula, *in vitro*, un inhibidor de miARN de MGB a una concentración que inhiba la función de un ácido nucleico diana, preferentemente de un miARN o ARNpi.

Otro aspecto se refiere a un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o afección producida como consecuencia de la mala expresión de un gen o de la expresión de un gen que tiene una función no deseada. El procedimiento comprende la administración de cantidades suficientes de uno o más inhibidores de miARN de MGB desvelados en el presente documento, con o sin un vehículo farmacéutico adecuado, a un paciente sospechoso de tener dicha enfermedad o afección.

Preferentemente se modifican uno o más nucleótidos de la parte oligonucleotídica del inhibidor de MGB. La modificación preferida es una modificación O-alquilo del átomo de carbono 2' del anillo de ribosa de algunos o todos los nucleótidos. Dichas modificaciones mejoran en gran medida la afinidad de la molécula por el ácido nucleico diana. Dicho esto, los inhibidores de MGB de la invención presentan varias mejoras con respecto a los inhibidores monocatenarios modificados, simples, de longitud equivalente. Lo más importante es que los inhibidores de MGB presentan una mayor potencia de silenciamiento.

Cuando se desarrollan los inhibidores de MGB altamente funcionales descritos en el presente documento, se tienen en cuenta múltiples elementos de diseño. Estos incluyen (1) diseños de una sola cadena frente a los de múltiples cadenas; (2) la longitud del oligonucleótido; (3) el contenido de oligonucleótido (de la parte de dirección y/o de las partes de no dirección del oligonucleótido); (4) las modificaciones químicas de los oligonucleótidos; (5) el tipo de conjugado de MGB; (6) la posición del conjugado de MGB en el oligonucleótido; y (7) el tipo de engarce que se usa para asociar la fracción de MGB con el oligonucleótido. Las siguientes descripciones abordan cada uno de estos elementos con mayor detalle.

A. Diseño del inhibidor

Los diseños del inhibidor que son compatibles con las mejoras del MGB incluyen los diseños tanto de una sola cadena como de múltiples cadenas. Por ejemplo, la parte oligonucleotídica del inhibidor puede ser monocatenaria, completamente bicatenaria, o una combinación de regiones monocatenarias y bicatenarias (por ejemplo, la que contiene bucle/s de horquilla). En el documento WO2007/095387, se puede encontrar más información sobre los diseños de inhibidores compatibles con los MGB.

B. Longitud del oligonucleótido

La longitud del oligonucleótido que está asociado con un MGB puede variar dependiendo de una serie de factores entre los que se incluyen la longitud del miARN endógeno al que se dirige la molécula y los atributos de diseño deseados del inhibidor. Los miARN maduros pueden variar de aproximadamente 18 pb a 28 pares de bases de longitud. Como tal, en una realización, la longitud del oligonucleótido conjugado con el MGB es el complemento inverso a la cadena madura del miARN diana. Los complementos inversos de todos los miARN conocidos se pueden determinar a partir de secuencias de la cadena madura de miARN que se pueden encontrar en la miRBase (<http://microna.sanger.ac.uk/>), mantenida por el Instituto Sanger. Cabe señalar que se predice que la lista de las secuencias disponibles en la miRBase aumentará a medida que vaya aumentando el número de secuencias de miARN de todas las especies. Como tal, se espera que el número de posibles secuencias a las que dirigir los inhibidores de MGB crezca.

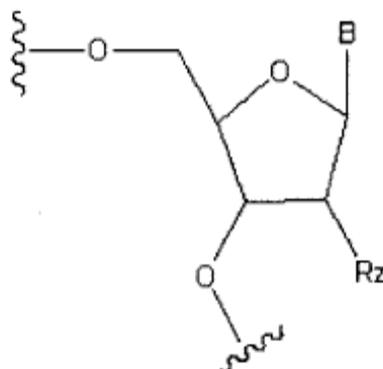
En otros casos, los estudios han demostrado que el rendimiento de los inhibidores no de MGB aumenta al aumentar la longitud (véase Vermeulen y col., 2007). Como tal, en otra realización, los inhibidores de MGB pueden incluir secuencias que flanqueen la secuencia que es el complemento inverso del miARN diana. La longitud de estas secuencias varía enormemente (de 5 a 100 nucleótidos en el extremo 5' y/o 3') y puede comprender: (1) el complemento inverso de las secuencias que flanquean la secuencia madura del miARN precursor o miARN primario; o (2) las secuencias parcialmente relacionadas o no relacionadas con el complemento inverso del miARN precursor o miARN primario.

C. Componente MGB de los inhibidores de miARN de MGB

En el diseño de inhibidor de MGB, se pueden incorporar múltiples MGB. En un ejemplo no limitante, los ligandos de aglutinante del surco menor DPI_3 y $CDPI_3$ se pueden unir al oligonucleótido en cualquier serie de orientaciones usando una amplia selección de químicas de engarces conocidas en la técnica. Preferentemente, los aglutinantes del surco menor se conjugan con el extremo bien 3' o 5' de la cadena del inhibidor que es el complemento inverso de, por ejemplo, la cadena de dirección del miARN diana.

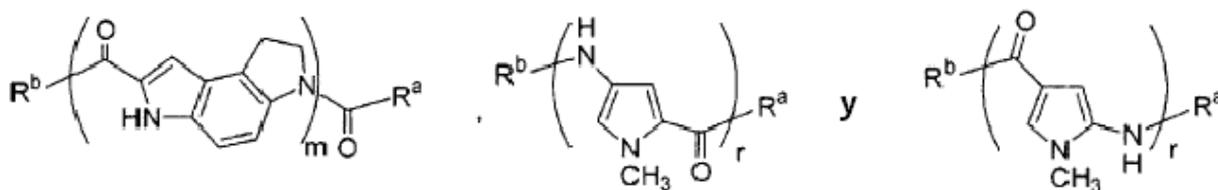
La Figura 2(a) es un esquema de dos configuraciones de MGB (fracciones DPI_3 y $CDPI_3$) conjugadas con oligonucleótidos. La Figura 2(b) es un esquema que muestra las posiciones en las que los MGB se pueden sustituir. En la Figura 2(b), W es un engarce que tiene de aproximadamente 3 a 100 átomos de cadena principal, seleccionados entre C, O, N, S, P y Si. En general, W representa un engarce trivalente, una cadena alifática ramificada, una cadena de heteroalquilo, una o más estructuras anulares sustituidas, o combinaciones de los mismos. $[A-B]_n$ representa un oligómero de ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN, PNA o cualquier combinación de los mismos, incluyendo aquellos con bases y azúcares modificados), en el que A representa una cadena principal de fosfato de azúcar, cadena principal de fosfato de azúcar modificada, cadena principal de ácido nucleico bloqueada, cadena principal peptídica o una variante de las mismas usada en la preparación de ácido nucleico; y B representa una base de ácido nucleico, una base modificada o un análogo de base como se describe en más detalle a continuación. El subíndice n es un número entero de aproximadamente 3 a aproximadamente 100, preferentemente de 6 a aproximadamente 50 y más preferentemente de 8 a aproximadamente 20. Los símbolos R_a , R_b , R_c , R_d , R_e y R_f representan sustituyentes seleccionados entre H, halógeno, alquilo (C_1-C_8), ORg, $N(Rg)_2$, $N^+(Rg)_3$, SR_g , COR_g , CO_2R_g , $CON(R_g)_2$, $(CH_2)_mSO_3^-$, $(CH_2)_mCO_2^-$, $(CH_2)_mOPO_3^{2-}$ y $NHC(O)(CH_2)_mCO_2^-$, y ésteres y sales de los mismos, en los que cada Rg es independientemente H o alquilo (C_1-C_8), y el subíndice m es un número entero de 0 a 6. El símbolo R_h y R_w representa H o un grupo (normalmente, el vestigio de un grupo de unión usado en la síntesis en fase sólida) que tiene de 1 a 30 átomos seleccionados entre C, N, O, P y S, que es bien cíclico, acíclico o una combinación de los mismos, y que tiene átomos de hidrógeno adicionales para llenar las valencias disponibles. En la publicación de solicitud de patente EE.UU. n.º 2005/0118623, se pueden encontrar ejemplos adicionales de sustituyentes.

Como se ha indicado anteriormente, el sustituyente A puede incluir una cadena principal de fosfato de desoxirribofuranosa o una cadena principal de fosfato de ribofuranosa. En realizaciones preferidas, la ribofuranosa está sustituida como se muestra a continuación:



en la que Rz es $-OR^{aa}$, donde R^{aa} es $-O$ -alquilo₁₋₁₂, $-(CH_2)_n$ -O-alquilo₁₋₁₂, donde n es de 1 a 6, halógeno o $-CF_3$; y B es una base normal o una base modificada como se ha definido anteriormente o en la patente de EE.UU. n.º 7.045.610. La cadena principal de fosfato de los oligonucleótidos modificados descritos anteriormente también se puede modificar de manera que los oligonucleótidos contengan enlaces de fosforotioato y/o metilfosfonatos y/o fosforamidatos (Chen y col., *Nucl. Acids Res.*, 23:2662-2668 (1995)). Las combinaciones de enlaces oligonucleotídicos en conjugados de MB-oligonucleótido también pertenecen al ámbito de la presente invención. Hay otras modificaciones más de la cadena principal que son conocidas por los expertos en la materia.

Algunos aglutinantes del surco menor contienen diferentes unidades de repetición. Los aglutinantes del surco menor preferidos son:



en los que el subíndice m es un número entero de 2 a 5; el subíndice r es un número entero de 2 a 10; y cada R^a y R^b es independientemente un grupo de unión al oligonucleótido (ya sea directa o indirectamente a través de un desactivador), H, $-OR^c$, $-NR^dR^e$, $-COOR^c$ o $-CONR^dR^e$, en los que cada R^c y R^d se selecciona entre H, heteroalquilo (C_2 - C_{12}), heteroalquenoilo (C_3 - C_{12}), heteroalquinoilo (C_3 - C_{12}), alquilo (C_1 - C_{12}), alquenoilo (C_2 - C_{12}), alquinoilo (C_2 - C_{12}), arilalquilo (C_1 - C_{12}) y arilo, con la condición de que uno de R^a y R^b representa una grupo de unión a un ODN o fluoróforo. En una realización adicional, cada uno de los anillos de cada estructura puede contener una o más sustituciones adicionales seleccionadas entre H, halógeno, alquilo (C_1 - C_8), OR_g , $N(R_g)_2$, $N^+(R_g)_3$, SR_g , COR_g , CO_2R_g , $CON(R_g)_2$, $(CH_2)_mSO_3^-$, $(CH_2)_mCO_2^-$, $(CH_2)_mOPO_3^{2-}$ y $NHC(O)(CH_2)_mCO_2^-$, AsO_3^{2-} , y ésteres y sales de los mismos, en los que cada R_g es independientemente H o alquilo (C_1 - C_8), y el subíndice m es un número entero de 0 a 6. En las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2004/32665 y 2006/0229441, se puede encontrar más información sobre estas estructuras.

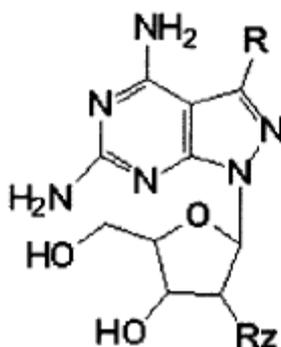
En la patente de EE.UU. n.º 6.312.894, se han desvelado otros aglutinantes del surco menor de interés. En un grupo de realizaciones, el MGB se selecciona del grupo que consiste en CC1065, lexitropsinas, distamicina, netropsina, berenil, duocarmicina, pentamidina, 4,6-diamino-2-fenilindol, estilbamidina, bis(guanilhidrazona) de 4,4'-diacetildifenilurea (DDUG) y pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepinas o cualquiera de sus análogos.

D. Contenido de oligonucleótido de un inhibidor de MGB

La parte oligonucleotídica de los inhibidores de MGB puede consistir en ARN, ADN, híbridos de ARN-ADN y modificaciones de los mismos. En general, la secuencia de la misma parte de cada inhibidor está diseñada para ser el complemento inverso de un miARN dado expresado por la célula de interés. Como alternativa, en los casos en los que un miARN no es más que un representante de una familia de secuencias relacionadas (por ejemplo, la familia let-7), la parte oligonucleotídica del inhibidor de MGB puede comprender el complemento inverso de, por ejemplo, un miembro de la familia, pero tienen una o más protuberancias o desapareamientos de pares de bases cuando se alinean con otros miembros de la familia de miARN. Como tal, preferentemente la parte oligonucleotídica del inhibidor de MGB tiene al menos del 70 al 80 % de complementariedad con un miARN diana. Más preferentemente, la parte oligonucleotídica del inhibidor de MGB tiene al menos del 80 al 99 % de complementariedad con un miARN diana. Y lo más preferentemente, la parte oligonucleotídica del inhibidor de MGB tiene el 100 % de complementariedad con un miARN diana.

Los nucleótidos de la parte oligonucleotídica de los inhibidores de MGB pueden contener una variedad de modificaciones químicas que mejoren la capacidad de resistencia contra la acción de nucleasas, la capacidad de administración de la molécula a las células, la especificidad o la estabilidad del dúplex (es decir, entre el miARN diana y la parte oligonucleotídica del inhibidor de MGB). Las modificaciones químicas que proporcionan estas características deseadas son bien conocidas en la técnica, e incluyen, pero sin limitación, las alteraciones/modificaciones de la base, el enlace internucleotídico, así como el residuo de azúcar del oligonucleótido. Algunas modificaciones preferidas se enumeran a continuación y se describen en la patente de EE.UU. n.º 7.045.610. Estas incluyen modificaciones de 2'-O-alquilo (por ejemplo, 2'-O-metilo), modificaciones de 2'-halógeno (por ejemplo, 2'F), modificaciones de colesterol 5' y/o 3', y más. Además, los inhibidores de MGB pueden incluir modificaciones adicionales que proporcionen atributos beneficiosos a la/s molécula/s. Así pues, por ejemplo, los inhibidores de MGB se pueden modificar adicionalmente con, por ejemplo, colorantes fluorescentes, así como, por ejemplo, modificaciones de colesterol para mejorar la visualización y la administración de los inhibidores de MGB, respectivamente.

A continuación, se muestra un ejemplo de una modificación que puede estar asociada con la cadena principal polimérica de los antagonistas de MGB:



en la que Rz es -H y R=-C≡C-CH₂CH₂OH. Esta estructura también se conoce como Súper A.

E. Procedimiento de introducción y detección de los efectos de los inhibidores de MGB

Los inhibidores de la presente invención se pueden usar *in vitro* o administrarse a una célula o a un animal, incluyendo los seres humanos, mediante cualquier procedimiento conocido para un experto en la materia. Por ejemplo, las moléculas de la invención se pueden administrar de forma pasiva a las células. La absorción pasiva de un inhibidor se puede modular, por ejemplo, mediante la presencia de un conjugado tal como una fracción de polietilenglicol o una fracción de colesterol, o cualquier otra fracción hidrófoba asociada con el extremo 5', el extremo 3', o regiones internas del oligonucleótido. Como alternativa, la administración pasiva se puede modular mediante la conjugación de un ligando que es absorbido por una célula a través de endocitosis mediada por receptor. Otros procedimientos de administración de inhibidores incluyen, pero sin limitación, técnicas de transfección (usando técnicas de transfección directa o inversa) empleando DEAE-dextrano, fosfato de calcio, lípidos/liposomas catiónicos, microinyección, electroporación, inmunoporación y el acoplamiento de los inhibidores a conjugados o ligandos específicos tales como anticuerpos, péptidos, antígenos o receptores.

El procedimiento de evaluación del nivel de inhibición no se limita a uno en particular. Por lo tanto, los efectos de cualquier inhibidor se pueden estudiar mediante uno de cualquier serie de procedimientos ensayados que incluyen, pero sin limitación, análisis Northern, RT-PCR, perfiles de expresión, y otros. En un procedimiento preferido, se modifica un indicador que codifica un vector o un plásmido cuyo producto proteico se ensaya fácilmente para que contenga el sitio diana (complemento inverso del miARN, ARNpi o ARNip maduro) en la UTR 5', el ORF o la UTR 3' de la secuencia. Dichos genes indicadores incluyen fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (LacZ), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína verde fluorescente (GFP), variantes de luciferasa (Luc) y sus derivados. En ausencia del inhibidor, los miARN endógenos (o añadidos exógenamente) se dirigen al ARNm indicador para el silenciamiento (bien por escisión de la transcripción o por atenuación de la traducción) lo que conduce a un bajo nivel global de expresión del indicador. Por el contrario, en presencia de los inhibidores de la invención, la dirección mediada por los miARN (ARNpi o ARNip) se suprime, dando así lugar a un mayor nivel de expresión del indicador. Las construcciones indicadoras preferidas incluyen el indicador de luciferasa doble psiCHECK-2 (Promega).

IV. Aplicaciones

Los inhibidores de la presente invención se pueden usar en un conjunto diverso de aplicaciones, incluyendo la investigación básica. Por ejemplo, la presente invención se puede usar para validar si un miARN o la diana de un miARN es una diana para el descubrimiento o el desarrollo de fármacos. Los inhibidores de la invención que inhiben un determinado miARN o grupo de miARN se introducen en una célula o en un organismo, y dicha célula o dicho

organismo se mantiene en condiciones que permitan la inhibición específica de la molécula diana. Luego se mide el grado de cualquier reducción de la expresión o la actividad de la diana, junto con el efecto de dicha reducción de la expresión o actividad, y se determina que si se reduce la expresión o la actividad, entonces la diana es un agente para el descubrimiento o el desarrollo de fármacos. De esta manera, los efectos fenotípicos pueden estar asociados con la inhibición de la diana particular de interés y, en los casos apropiados, se pueden realizar estudios de la toxicidad y farmacocinética, y desarrollarse preparados terapéuticos.

Las moléculas de la invención se pueden usar para inhibir una o varias dianas simultáneamente. La desactivación de varias dianas puede tener lugar mediante la introducción de combinaciones de inhibidores dirigidos a diferentes moléculas. Los diseños de inhibidores anteriores carecían de potencia y, como tales, requerían altas concentraciones para inhibir parcialmente, por ejemplo, un solo miARN. La introducción de combinaciones de inhibidores usando los diseños anteriores requeriría concentraciones excesivamente altas que podrían ser citotóxicas. Por el contrario, la potencia mejorada de las moléculas de la invención permite a los usuarios inhibir una o más dianas específicas a concentraciones que conservan la funcionalidad global de la vía de interferencia del ARN con los mínimos efectos inespecíficos.

Dado que los inhibidores de la invención actúan independiente del tipo de célula o especie en la que se introducen, la presente invención es aplicable en una amplia selección de organismos, incluyendo, pero sin limitación, plantas, animales, protozoos, bacterias, virus y hongos. La presente invención es particularmente ventajosa para su uso en mamíferos tales como ganado vacuno, caballos, cabras, cerdos, ovejas, perros, aves, roedores tales como hamsters, ratones y ratas, y primates tales como gorilas, chimpancés, y seres humanos.

La presente invención se puede usar ventajosamente con diversos tipos de células, incluyendo, pero sin limitación, células primarias y células somáticas. Por ejemplo, los tipos de células pueden ser adipocitos, fibroblastos, miocitos, cardiomiocitos, endotelio, neuronas, células gliales, células sanguíneas, megacariocitos, linfocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, leucocitos, granulocitos, queratinocitos, condrocitos, osteoblastos, osteoclastos, hepatocitos y células de las glándulas endocrinas o exocrinas. Es importante señalar que la presente invención se puede usar para inhibir una amplia selección de miARN, ARNpi, incluyendo, pero sin limitación: (1) miARN y ARNpi del genoma humano implicado en enfermedades tales como diabetes, enfermedad de Alzheimer y cáncer; y (2) los asociados con los genomas de patógenos (por ejemplo, virus patógenos).

Es más, la presente invención se puede usar en aplicaciones de interferencia del ARN tales como aplicaciones de diagnóstico, profilácticas y terapéuticas, incluyendo el uso de las composiciones en la fabricación de un medicamento en animales, preferentemente mamíferos, más preferentemente seres humanos en el tratamiento de enfermedades. En particular, los agentes de la invención se pueden usar para revertir la acción de los miARN o ARNpi que se están usando como agentes terapéuticos.

En el caso de tener fines terapéuticos o profilácticos, las dosis de los medicamentos fabricados de acuerdo con la presente invención pueden variar de microgramos por kilogramo a cientos de miligramos por kilogramo de un sujeto. Como se sabe en la técnica, la dosificación variará de acuerdo con la masa del mamífero que recibe la dosis, la naturaleza del mamífero que recibe la dosis, la gravedad de la enfermedad o del trastorno y la estabilidad del medicamento en el suero del sujeto, entre otros factores bien conocidos por los expertos en la materia. Para estas aplicaciones, un organismo sospechoso de tener una enfermedad o un trastorno que es susceptible a la modulación mediante la manipulación de un ácido nucleico diana de interés en particular se trata mediante la administración de los inhibidores de la invención. Los resultados del tratamiento pueden ser de mejora, paliativos, profilácticos y/o de diagnóstico de una enfermedad o un trastorno en particular.

Las aplicaciones terapéuticas o profilácticas de la presente invención se pueden realizar con una variedad de composiciones terapéuticas y procedimientos de administración. Los vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables son conocidos por los expertos en la materia. Los procedimientos de administración a células y organismos también son conocidos por los expertos en la materia. Las pautas posológicas, por ejemplo, se sabe que dependen de la gravedad y del grado de capacidad de respuesta de la enfermedad o del trastorno que se vaya a tratar, con un curso de tratamiento que abarca de días a meses, o hasta que se consigue el efecto deseado sobre el trastorno o el estado patológico. La administración crónica de inhibidores de la invención puede ser necesaria para obtener efectos deseados duraderos con algunas enfermedades o trastornos. Las pautas posológicas adecuadas se pueden determinar mediante, por ejemplo, la administración de cantidades variables de uno o más inhibidores en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, por una vía de administración farmacéuticamente aceptable, y la cantidad de fármaco acumulado en el cuerpo del organismo receptor se pueden determinar en diversos momentos tras la administración. Del mismo modo, el efecto deseado se puede medir en diversos momentos después de la administración del inhibidor, y estos datos se pueden correlacionar con otros datos farmacocinéticos, tales como la acumulación en el organismo o en un órgano. Los expertos pueden determinar las dosis óptimas, pautas posológicas y similares. Los expertos pueden emplear datos de CE₅₀ de modelos animales *in vivo* e *in vitro* como guías para los estudios en seres humanos.

Los inhibidores de la invención se pueden administrar en una crema o pomada tópica, un preparado oral tal como una cápsula o un comprimido, una suspensión o una solución, y similares. La vía de administración puede ser intravenosa, intramuscular, dérmica, subdérmica, cutánea, subcutánea, intranasal, oral, rectal, por colirio, por la

implantación en tejido de un dispositivo que libere el inhibidor en una ubicación ventajosa, tal como cerca de un órgano o de un tejido, o tipo de célula que alberga un ácido nucleico diana de interés.

Las realizaciones anteriores se presentan con el fin de ayudar a comprender la presente invención y, bajo ningún concepto, deben pretenden ser ni se deben interpretar como limitantes de la invención.

5 Ejemplos

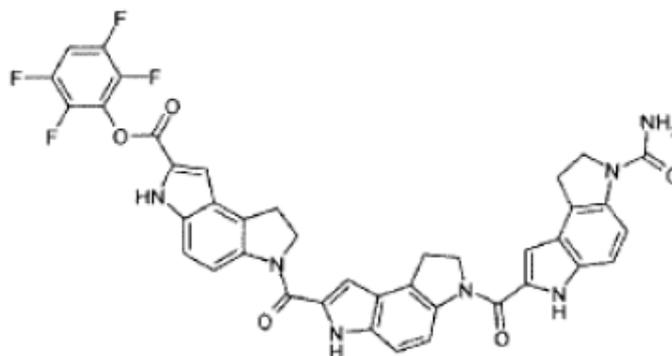
Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar, pero no limitar, la presente invención reivindicada.

Ejemplo 1. Preparación de inhibidores de MGB

Se prepararon oligonucleótidos modificados con DPl₃ usando el soporte sólido de síntesis de ADN de DPl₃ como se describe en la patente de EE.UU. n.º 7.381.818. En la preparación de los oligonucleótidos modificados con CDPl₃, se realizaron las siguientes etapas.

1. Purificación mediante HPLC e intercambio de sales de los oligos modificados con amina. Se disolvieron oligonucleótidos modificados con amina (escala de síntesis de 0,2-1 µl) en tampón de TEAB 0,1 M (bicarbonato de trietilamonio) hasta ~ 1 ml, y se cromatografiaron en una columna Luna C18 (10 µm) de 4,6 x 250 mm (Phenominex), eluyendo con un gradiente de CH₃CN en tampón de TEAB 0,1 M. Se recogió la fracción que contenía el producto y se secó en un concentrador SpeedVac hasta que se obtuvieron microgránulos secos.

2. Reacción de conjugación con CDPl₃. Se añadió a cada tubo que contenía un oligonucleótido modificado con amina (escala de síntesis de ADN inicial de 0,2-1 µl) una solución de 1 mg de CDPl₃ TFP éster mostrado a continuación (y también descrito además en la patente de EE.UU. n.º 5.801.155) y 2 ml de TEA en 80 µl de DMSO. Se agitaron suavemente los tubos con movimientos vorticiales para disolver los sólidos. Se dejó que las reacciones de conjugación se produjeran durante 5-18 h.



CDPl₃ TFP éster

3. Purificación del conjugado. Se diluyeron las reacciones con 2 ml de tampón de TEAB 0,1 M, se cargaron en una columna Luna C18 y se eluyeron con un gradiente (CH₃CN al 8-40 %) en tampón de TEAB 0,1 M. Se recogió la fracción que contenía el producto y se secó en un concentrador SpeedVac hasta que se obtuvieron microgránulos secos.

Ejemplo 2. Ensayo de evaluación de la función inhibidora del miARN

Para la mayoría de los experimentos publicados, la cuantificación del nivel de inhibición se realizó usando el sistema indicador de luciferasa doble, psiCheck 2 (Promega). La Figura 3 es un esquema del ensayo de luciferasa doble. El indicador de luciferasa doble contiene tanto (1) el indicador Fluc como (2) un indicador Rluc que contiene un sitio diana de miARN (sitio diana de miR-X) en la UTR 3'. En casos en los que (1) hay un control del inhibidor del miARN no diana presente; y (2) se expresa un miARN endógeno (miARN-X) capaz de dirigir la construcción Rluc, se suprime la proporción relativa de Rluc con respecto a Fluc. Por el contrario, cuando también hay presente un inhibidor de miARN capaz de dirigirse el miARN expresado de forma endógena (miARN-X), la capacidad del miARN para dirigirse a la construcción Rluc se suprime y, por lo tanto, se aumenta la proporción de Rluc con respecto a Fluc.

En resumen, el plásmido psiCheck codifica dos variantes de luciferasa, de *Renilla* y luciérnaga. Se insertaron las secuencias diana en el sitio de clonación múltiple de la UTR 3' del gen de la luciferasa de *Renilla*, permitiendo de este modo el uso de la secuencia de luciérnaga como un control interno. Para determinar la viabilidad de diferentes diseños de inhibidores, se transfectaron conjuntamente el/los oligonucleótido/s de la invención y el plásmido psiCheck 2 modificado a células (100 ng de ADN indicador por pocillo, inhibidor 25-100 nM, lípido = DharmaFECT Duo, Thermo Fisher Scientific). De veinticuatro a noventa y seis horas después, se lisaron las células y se

determinaron las cantidades relativas de cada luciferasa usando el ensayo Dual Glo (Promega). En ninguno de los experimentos, a menos que se especifique lo contrario, se observaron niveles significativos de toxicidad celular.

Se midieron las actividades de las luciferasas de luciérnaga y *Renilla* usando el sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo™ (Promega, n.º de cat. E2980) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con una ligera modificación.

5 Al lisar las células, se aspiró el medio de crecimiento de las células antes de la adición de 50 µl de sustrato de luciferasa de luciérnaga y 50 µl de sustrato de luciferasa de *Renilla*.

Todos los ensayos de luciferasa se leyeron con un contador de múltiples marcadores Victor² 1420 de Wallac (Perkin Elmer), usando los programas según las recomendaciones de los fabricantes.

10 Diseño experimental y análisis de datos: todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Además, cada tratamiento experimental con un plásmido indicador se duplicó con el plásmido de control psiCHEC™-2 (sin inserción). Para tener en cuenta los efectos inespecíficos sobre los plásmidos indicadores, los resultados experimentales se expresan como una proporción normalizada $(Rluc/Fluc)_{norma}$: la proporción de la expresión de la luciferasa de *Renilla* con respecto a la expresión de la luciferasa de luciérnaga para un plásmido indicador de miARN dado $(Rluc/Fluc)_{miARN}$ dividida entre la proporción $(Rluc/Fluc)_{control}$ para el plásmido indicador psiCHEC™-2 tratado de forma idéntica. Los valores máximos obtenidos a partir del plásmido indicador varían debido a la secuencia. Lo ideal es que los valores en torno a 1 indiquen una baja función de miARN, mientras que los valores cercanos a cero indiquen una alta función de miARN. Los datos se presentan como la media de los tres pocillos, y las barras de error son la desviación estándar de las tres proporciones $(Rluc/Fluc)_{miARN}$ del tratamiento experimental, a escala por el factor de normalización (la media de $(Rluc/Fluc)_{control}$). Aunque las proporciones no siguen una distribución normal, los valores de la desviación estándar dan una buena idea de la variabilidad de los datos.

En los casos en los que se compararon los valores entre los diferentes plásmidos indicadores de miARN, se usó la proporción $(Rluc/Fluc)_{norma}$ normalizada máxima como un factor de escala adicional para que todos los indicadores tuvieran un máximo de aproximadamente 1. La escala adicional se realizó para facilitar la comparación, y no afecta a los resultados.

25 Cultivo de células. Se cultivaron células HeLa en condiciones convencionales y se liberaron del soporte sólido mediante tratamiento con tripsina. Para la mayoría de los ensayos, las células se diluyeron a 1×10^5 células/ml, seguido de la adición de 100 µl de células/pocillo. Entonces, se incubaron las placas durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %.

Ejemplo 3. Ensayo de diferentes diseños de inhibidores de aglutinantes del surco menor

30 Usando el ensayo de luciferasa doble descrito anteriormente, se evaluó una serie de oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados y conjugados de MGB-oligonucleótido como inhibidores de la función de los miARN. Las secuencias diana insertadas en la UTR 3' de Rluc fueron Let7cTcomp de la Tabla 1 (para Let7c) y miR21Tcomp de la Tabla 2 (para miR-21). Las secuencias para los inhibidores de miARN de let-7c y miARN de miR-21 se muestran en la Tabla 1 y Tabla 2, respectivamente. En las Tablas 1 y 2, la presencia de un azúcar de 2'-O-Metilribofuranosa en un oligonucleótido se muestra en negrita y cursiva. La presencia de una base modificada Súper A se muestra con una letra "a" en minúscula.

Tabla 1. Secuencias de let7c e inhibidores de let7c

Abreviatura del inhibidor	Secuencia	Descripción
Let7c	5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU-3' (SEQ ID NO: 1)	Cadena madura de ARN
Let7cT	5'-TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT-3' (SEQ ID NO: 2)	Cadena madura equivalente de ADN
Let7cTcomp	5'-AACCATACAACCTACTACCTCA-3' (SEQ ID NO: 3)	Complemento de ADN
2'-OMet	5- <i>AACCATACAACCTACTACCTCA</i> -3' (SEQ ID NO: 4)	Es un ARN de 2'-OMe
ADN	5'-AACCATACAACCTACTACCTCA-3' (SEQ ID NO: 3)	Es un ADN equivalente
3MGB-ADN	5'-AACCATACAACCTACTACCTCA-MGB-3' (SEQ ID NO: 5)	MGB es ligando DPI ₃
ADN Súper A	5'-AaCCaTaCAaCCTaCTaCCTCA-3' (SEQ ID NO: 6)	"a" es Súper A
5MGB-ADN	5'-MGB-AACCATACAACCTACTACCTCA-3' (SEQ ID NO: 7)	
2'-OMet Súper A	5'- <i>AaCCaTaCAaCCTaCTaCCTCA</i> -3' (SEQ ID NO: 8)	"a" es ADN de Súper A; Otras bases 2'-OMe
5'MGB-2'-OMet	5-MGB- <i>AACCATACAACCTACTACCTCA</i> -3' (SEQ ID NO: 9)	5'-MGB-2'-ARN de OMe

(Continuación)

Abreviatura del inhibidor	Secuencia	Descripción
3'MGB-2'-OMet	5-AACCATACAACCTACTACCTCA-MGB-3' (SEQ ID NO: 10)	3'-MGB-2'-ARN de OMe

Tabla 2. Secuencias de mir21 e inhibidores de mir21

Abreviatura del inhibidor	Secuencia	Descripción
mir21	5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3' (SEQ ID NO: 11)	Cadena madura de ARN
mir21T	5'-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3' (SEQ ID NO: 12)	Cadena madura equivalente de ADN
mir21Tcomp	5'-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3' (SEQ ID NO: 13)	Complemento de ADN
2'-OMe	5'-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3' (SEQ ID NO: 14)	Es un ARN de 2'-OMe
ADN	5'-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3' (SEQ ID NO: 13)	Es un ADN equivalente
3MGB-ADN	5'-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-MGB-3' (SEQ ID NO: 15)	MGB es ligando DPI ₃
ADN Súper A	5'-TCaaCaTCaGTCTGaTAaGCTA-3' (SEQ ID NO: 16)	"a" es Súper A de un 2'-desoxirribonucleótido
5MGB-ADN	5'-MGB-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3' (SEQ ID NO: 17)	MGB es ligando DPI ₃
2'-OMet Súper A	5'-TCaaCaTCaGTCTGaTAaGCTA-3' (SEQ ID NO: 18)	"a" es ADN de Súper A; Otras bases 2'-OMe
5'MGB-2'-OMet	5' MGB-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3' (SEQ ID NO: 19)	5'-MGB-2'-OMe-ARN
3'MGB-2'-OMet	5-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3' (SEQ ID NO: 20)	3'-MGB-2'-OMe-ARN

5 La Figura 4 muestra el rendimiento de los múltiples diseños de inhibidores de miARN. Los inhibidores de diferentes diseños se introdujeron en células junto con la construcción de indicador de la luciferasa doble adecuada (let-7c o miR-21). Los controles consistían en células no tratadas (nada) o células tratadas con moléculas de inhibidores de complemento inverso modificadas con 2'-O-metilo, simples (2'-Omet).

10 En la Figura 4a, se muestra el rendimiento de los inhibidores de let-7c. Se obtuvo una proporción basal de Rluc/Fluc en ausencia de cualquier molécula de inhibidor (véase "nada"). En comparación con el control no tratado (nada) los inhibidores monocatenarios modificados con 2'-O-metilo mostraron un aumento en la proporción de Rluc/Fluc, lo que indica que este diseño es capaz de proporcionar un cierto nivel de inhibición de let-7c. El "ADN", "3'-MGB-ADN", "5'-MGB-ADN", "ADN sustituido con Súper A" (que se refiere a un 2'-desoxirribonucleósido desvelado en la patente de EE.UU. n.º 7.045.610) y la quimera "súper A-2'OMet" mostraron niveles basales de inhibición similares a los

15 controles no tratados, lo que sugiere que estas configuraciones de diseño no pudieron inhibir la función de let-7c. Sin embargo, mientras que el "3'-MGB-2'-OMet" indujo niveles similares de inhibición a los de 2'-OMet, el 22-mero "5'-MGB-2'-OMe" indujo niveles aproximadamente de inhibición 3,4 veces superiores a los del diseño de 2'-OMet. Los resultados de un experimento paralelo realizado en miR-21 muestran resultados muy similares (véase la Figura 4b). Las configuraciones de los inhibidores 5'-MGB-2'-OMet y 3'-MGB-2'-OMet presentaron mejoras en el rendimiento de

20 aproximadamente 10 veces y 3 veces frente al diseño de 2'-OMet, respectivamente.

Referencias

Documentos de patente de EE.UU.

- Patente de EE.UU. n.º 5.801.155;
- 25 Patente de EE.UU. n.º 6.312.894;
- Patente de EE.UU. n.º 7.045.610;
- Patente de EE.UU. n.º 7.381.818;
- Patente de EE.UU. n.º 7.582.739;
- Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2004/32665;

Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2005/0118623;

Publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2006/0229441.

Documentos de patentes internacionales

Publicación de solicitud PCT n.º WO2007/095387.

5 Otras publicaciones

Chen y col., *Nucl. Acids Res.*, 23:2662-2668 (1995);

Hutvagner, G. y col. (2004) "Sequence-specific inhibition of small RNA function". *PLoS Biol. Apr*, 2(4):E98;

Kutyavin, I. V., y col., (2000) "3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures". *NAR*, 28(2):655-661;

10 Meister, G. y col., (2004) "Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing". *RNA* 10(3):544-50;

Orom y col., (2006) "LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function", *Gene* 372:137-141;

Vermeulen y col., *RNA*, 2007 13(5):723-30.

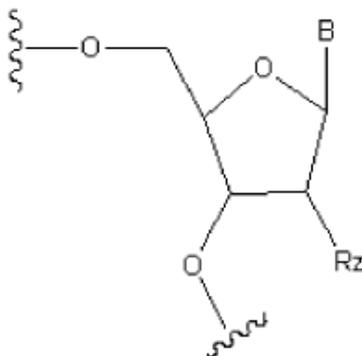
15

REIVINDICACIONES

1. Una composición inhibidora para inhibir ARN no codificantes que comprende:

un oligonucleótido; y
 un aglutinante del surco menor (MGB), en la que el oligonucleótido comprende nucleótidos,
 en la que todos los nucleótidos del oligonucleótido comprenden ribofuranosa que tiene la siguiente estructura:

5



en la que Rz es -OCH₃, en la que B es una base normal o una base modificada; y en la que el MGB está conjugado con el extremo 5' o con el extremo 3' del oligonucleótido; y en la que el oligonucleótido es esencialmente complementario a una secuencia de miARN o ARNpi madura endógena.

2. La composición inhibidora de la reivindicación 1, que comprende además un engarce mediante el cual el MGB se une al oligonucleótido.

10

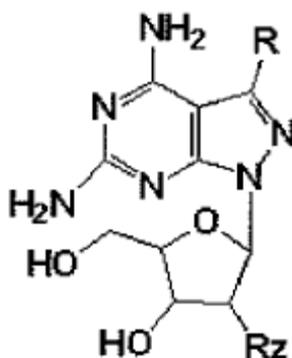
3. La composición inhibidora de la reivindicación 1, en la que el oligonucleótido es monocatenario, bicatenario o una combinación de los mismos.

4. La composición inhibidora de la reivindicación 1, en la que el oligonucleótido comprende ARN, ADN o una combinación de los mismos.

15

5. La composición inhibidora de la reivindicación 1, en la que el oligonucleótido comprende una o más bases modificadas o bases universales.

6. La composición inhibidora de la reivindicación 5, en la que una o más bases modificadas comprenden una o más bases que tienen la siguiente estructura:



20

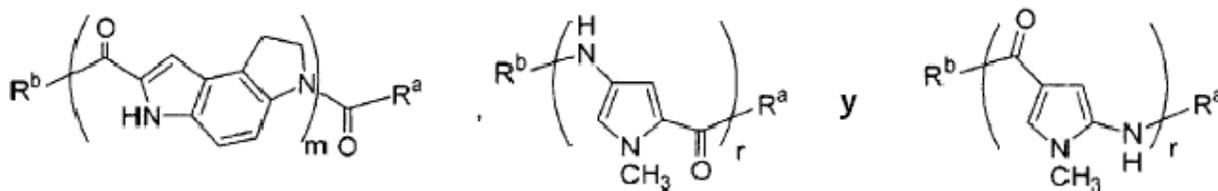
en la que Rz es -H y R=-C≡C-CH₂CH₂OH.

7. La composición inhibidora de la reivindicación 1, en la que el oligonucleótido comprende uno o más nucleótidos que tienen un marcador detectable.

8. La composición inhibidora de la reivindicación 1, en la que el oligonucleótido comprende una secuencia que es un complemento inverso a una cadena madura de una secuencia diana.

25

9. La composición inhibidora de la reivindicación 1, en la que el MGB comprende una estructura seleccionada del siguiente grupo:



en las que el subíndice m es un número entero de 2 a 5;

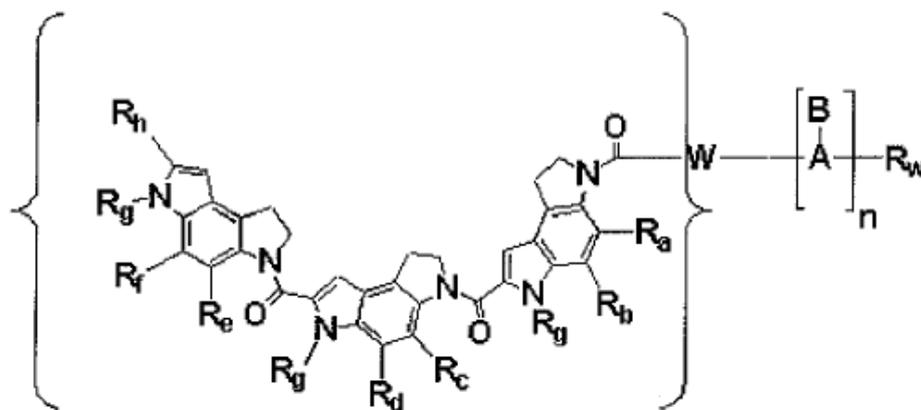
el subíndice r es un número entero de 2 a 10; y

5 cada R^a y R^b es independientemente un engarce al oligonucleótido, un engarce a un fluoróforo, H, $-OR^c$, $-NR^d$, $-COOR^c$ o $-CONR^d$, en los que cada R^c y R^d se selecciona entre H, heteroalquilo (C_2-C_{12}), heteroalquenilo (C_3-C_{12}), heteroalquinilo (C_3-C_{12}), alquilo (C_1-C_{12}), alquenilo (C_2-C_{12}), alquinilo (C_2-C_{12}), arilalquilo (C_1-C_{12}) y arilo, en las que uno de R^a y R^b es un engarce al oligonucleótido o a un fluoróforo.

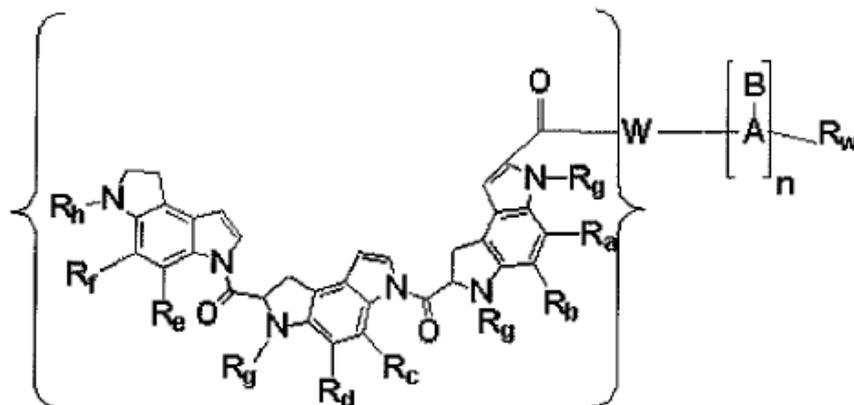
10 10. La composición inhibidora de la reivindicación 9, en la que los anillos de las estructuras contienen una o más sustituciones seleccionadas entre H, halógeno, alquilo (C_1-C_8), OR_g , $N(R_g)_2$, $N^+(R_g)_3$, SR_g , COR_g , CO_2R_g , $CON(R_g)_2$, $(CH_2)_mSO_3^-$, $(CH_2)_mCO_2^-$, $(CH_2)_mOPO_3^{2-}$ y $NHC(O)(CH_2)_mCO_2^-$, y ésteres y sales de los mismos, en las que cada R_g es independientemente H o alquilo (C_1-C_8), y el subíndice m es un número entero de 0 a 6.

15 11. La composición inhibidora de la reivindicación 1, en la que el MGB se selecciona del grupo que consiste en DPI₃, CDPI₃, CC1065, lexitropsinas, distamicina, netropsina, berenil, duocarmicina, pentamidina, 4,6-diamino-2-fenilindol, estilbamidina, bis(guanilhidrazona) de 4,4'-diacetildifenilurea (DDUG) y pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepinas o cualquiera de sus análogos.

12. La composición inhibidora de la reivindicación 1, en la que la composición inhibidora comprende una de las siguientes estructuras:



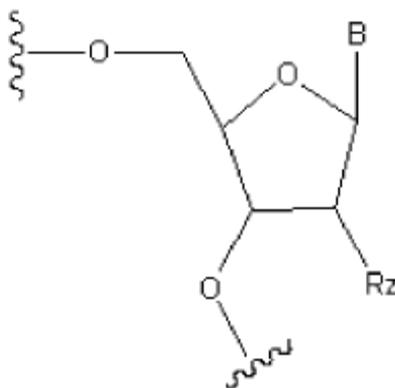
o



20

en las que W es un engarce que tiene de aproximadamente 3 a 100 átomos de cadena principal, seleccionados entre C, O, N, S, P y Si; [A-B]_n es un oligonucleótido, en el que A representa una cadena principal de fosfato de azúcar, cadena principal de fosfato de azúcar modificado, cadena principal de ácido nucleico bloqueado, cadena principal peptídica o una variante de las mismas, usada en la preparación de ácido nucleico; y en las que [A-B]_n comprende nucleótidos que comprenden ribofuranosa que tiene la siguiente estructura:

5



en la que Rz es -OCH₃, y B es una base;

n es un número entero de aproximadamente 3 a aproximadamente 100;

10 R_a, R_b, R_c, R_d, R_e y R_f son sustituyentes seleccionados entre H, halógeno, alquilo (C₁-C₈), OR_g, N(R_g)₂, N⁺(R_g)₃, SR_g, COR_g, CO₂R_g, CON(R_g)₂, (CH₂)_mSO₃⁻, (CH₂)_mCO₂⁻, (CH₂)_mOPO₃⁻² y NHC(O)(CH₂)_mCO₂⁻, y ésteres y sales de los mismos, en los que cada R_g es independientemente H o alquilo (C₁-C₈), y el subíndice m es un número entero de 0 a 6; R_h y R_w son H o un grupo que tiene de 1 a 30 átomos seleccionados entre C, N, O, P y S, y que es cíclico, acíclico o una combinación de los mismos.

15 13. Un procedimiento de inhibición de la actividad de miARN *in vitro* que comprende introducir la composición inhibidora de la reivindicación 1 en una ubicación *in vitro* en la que existe actividad de miRNA.

14. Una composición inhibidora de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso como un medicamento.

Figura 1

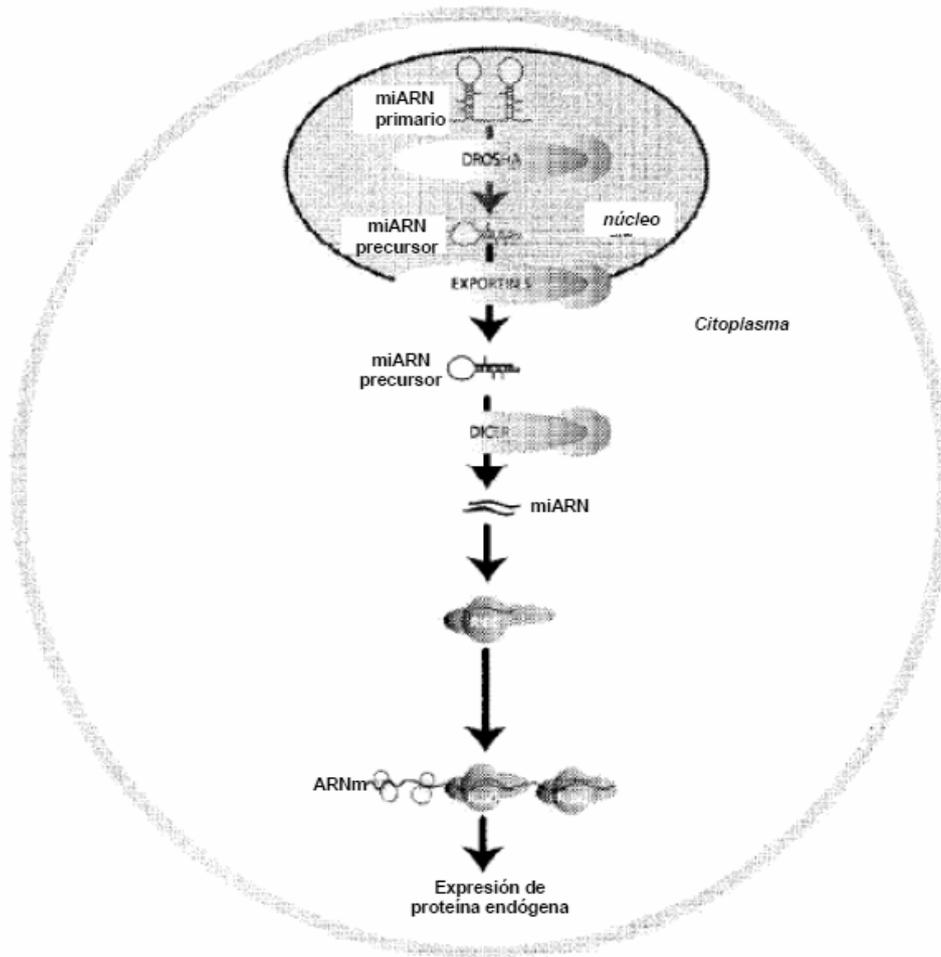


Figura 2a

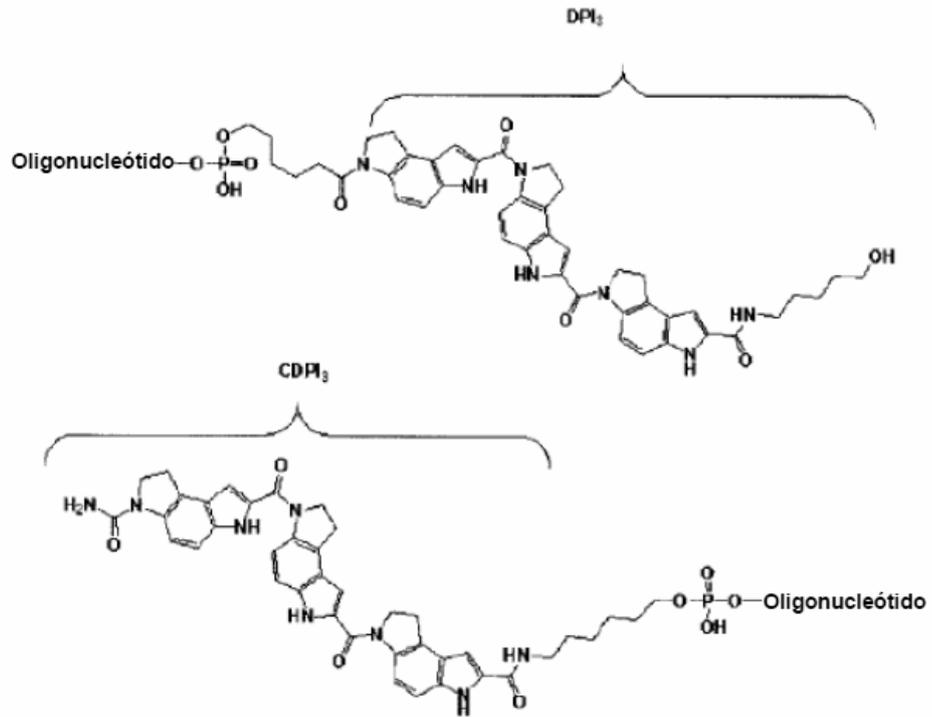


Figura 2b

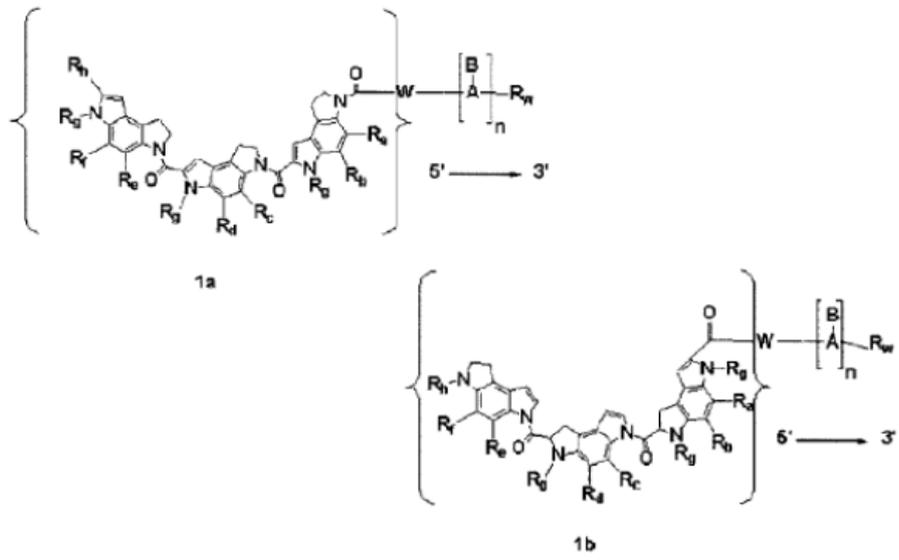


Figura 3

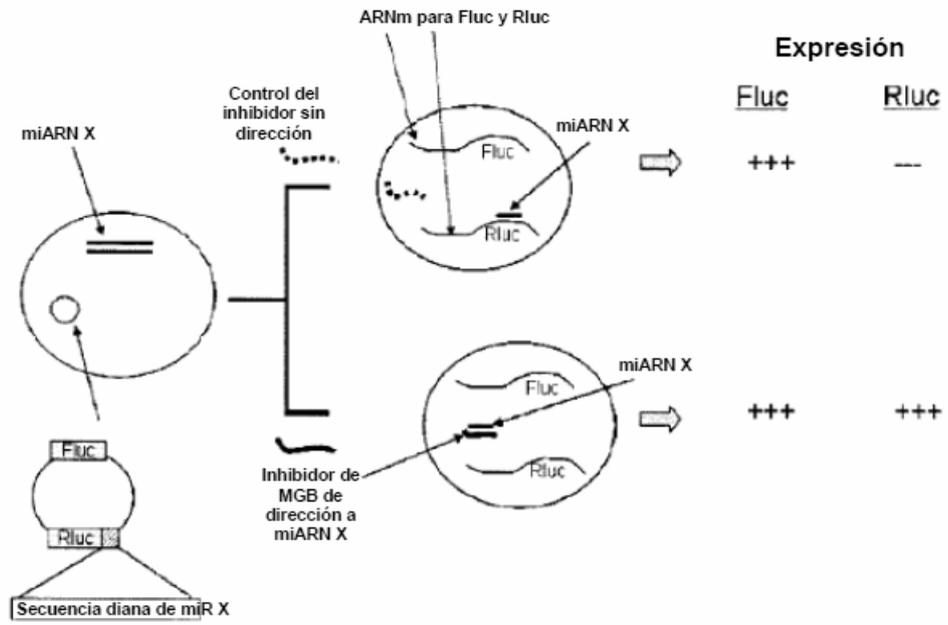


Figura 4a

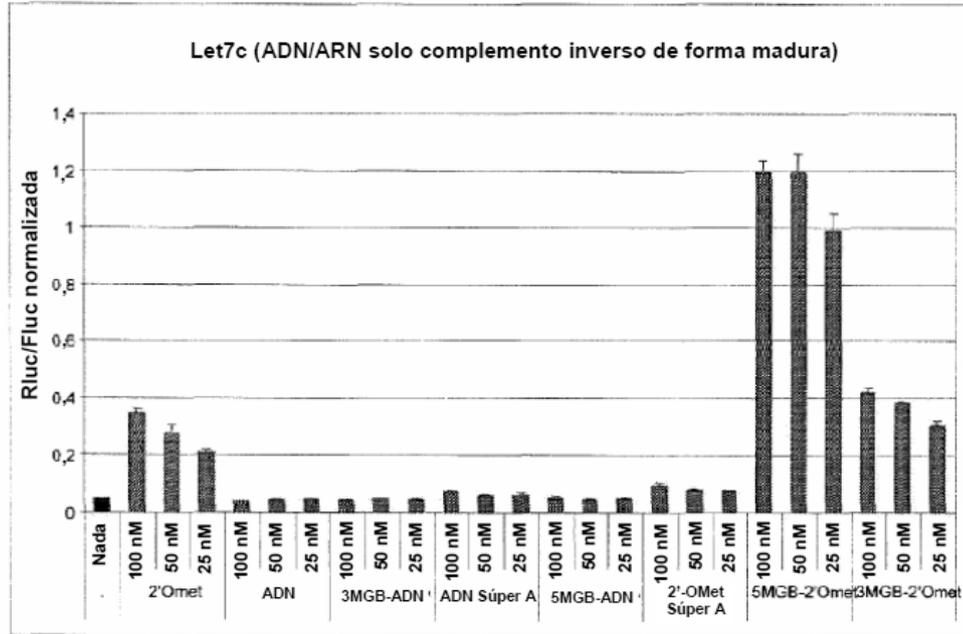


Figura 4b

