

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 681**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2012 PCT/EP2012/071933**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13068347**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2012 E 12784565 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2776590**

54 Título: **Método de pronóstico para comprobar la eficacia de inhibidores de micro ARN-122 en pacientes VHC+**

30 Prioridad:

07.11.2011 US 201161556313 P

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

03.04.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HAGEDORN, PETER;
PETRI, ANDREAS;
LINDOW, MORTEN y
KAUPPINEN, SAKARI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 607 681 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

Método de pronóstico para comprobar la eficacia de inhibidores de micro ARN-122 en pacientes VHC+

5 Campo de la invención

La invención se refiere al campo de los métodos de diagnóstico y pronóstico para la función hepática, tales como los métodos de diagnóstico y pronóstico para su uso en la selección de un tratamiento adecuado de la hepatitis C. También se divulgan métodos de tratamiento de sujetos infectados con VCH que se han identificado como probables respondedores a la terapia del VHC con un inhibidor de miR-122. La invención también proporciona métodos de pronóstico para determinar la idoneidad de un tratamiento de la infección por hepatitis C con un agente anti-VHC, tal como un inhibidor de miR-122.

15 Antecedentes

El virus de la hepatitis C (VHC) es la causa infecciosa más común de enfermedad hepática crónica en Europa y Estados Unidos. A nivel mundial, se estima que aproximadamente el 3 % de la población está infectada; esto corresponde a aproximadamente 200 millones de personas en riesgo de desarrollar morbilidad grave relacionada con el hígado.

El microARN-122 (miR-122) es un microARN específico del hígado. El miR-122, que está implicado en el metabolismo de los lípidos y el colesterol, y la inhibición de miR-122 *in vivo* en roedores da lugar a una reducción de los niveles de colesterol en suero. Aparentemente, en la actualidad se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales el miR-122 regula el metabolismo del colesterol.

El nivel de miR-122 en hígado se ha correlacionado inversamente con parámetros clínicos asociados con la infección crónica por el VHC (Marquez et al., 2010 Lab Invest December 2010). Los niveles de miR-122 en suero sanguíneo se han correlacionado de forma positiva con NAFLD y la infección por VHC y se ha sugerido como biomarcador para NAFLD (por ejemplo, Cermelli et al 2011 PLoS ONE August 2011). De acuerdo con Cermelli et al., hay una falta de correlación entre los niveles circulantes y hepáticos de miR-122. El miR-122 en suero es un biomarcador de necroinflamación en pacientes infectados por el VHC y se correlaciona moderadamente con los niveles séricos de ALT (Bihrer et al Am J Gastroenterol Sept. 2011). Su et al., "Serum MicroRNA-122 Level Correlates with Virologic Responses to Combination Therapy in Chronic Hepatitis C Patients" AASLD November 2011 informan que los niveles séricos de miR-122 se correlacionan con la capacidad de respuesta al tratamiento con interferón/ribavirina, siendo los niveles altos de miR-122 indicativos de la capacidad de respuesta al tratamiento.

Miravirsén es un primero de la clase de microARN terapéutico que ha demostrado eficacia para el tratamiento de la hepatitis C (VHC) tanto en chimpancés como en pacientes humanos. Miravirsén es un inhibidor del microARN-122. Los presentes inventores identificaron que la subpoblación de pacientes de VHC que no respondieron a la terapia del VHC se identificaron mediante ensayos de biomarcadores en la sangre discriminativos para la función hepática.

40 Sumario de la invención

La sorprendente observación de que una subpoblación de pacientes con VHC que no responden a la terapia del VHC se puede identificar mediante ensayos de biomarcadores en sangre discriminativos para la función hepática permite un método de pronóstico para la detección selectiva de pacientes infectados por el VHC para identificar su idoneidad para la terapia del VHC.

Como se describe en el presente documento, el inhibidor de microARN-122 (miR-122) puede ser un oligonucleótido antisentido complementario, tal como totalmente complementario, de miR-122 en toda la longitud del oligonucleótido, tal como miravirsén.

En algunas realizaciones, el sujeto es asintomático para la infección por VHC.

55 En algunas realizaciones, el sujeto tiene una infección de hepatitis C crónica, en la que la etapa de fibrosis asociada con VHC (o necroinflamación) es menor que el estadio 3 en el sistema de puntuación de IshaK o estadio F2 en la escala de Metavir. De forma adecuada, en algunas realizaciones, el sujeto no tiene cirrosis incompleta o cirrosis del hígado, o en algunas realizaciones, fibrosis en puente o fibrosis portal.

60 La invención proporciona un método de pronóstico para determinar la idoneidad del tratamiento de un sujeto humano con infección por VHC (por ejemplo, crónica) con un inhibidor de microARN-122, comprendiendo dicho método las etapas de

- i) obtenido del sujeto humano
- 65 ii) determinar el nivel de al menos un biomarcador obtenido del sujeto humano en la muestra de sangre

iii) comparar el nivel de la al menos una biomarcador con una o más muestras de referencia o valores de referencia;

para determinar si el sujeto es probable que sea o es adecuado para el tratamiento de la infección por VHC (por ejemplo, crónica) con un inhibidor de microARN-122. (es decir, un respondedor al inhibidor de miR-122), en el que el al menos un biomarcador es microARN-122.

De forma alternativa, el método de pronóstico anterior puede usarse para determinar si es probable que el sujeto responda (o sea respondedor) al tratamiento de la infección por VHC con un inhibidor de microARN-122, tal como miravirsén.

Por tanto, el método se puede utilizar para identificar sujetos individuales con infección por VHC (por ejemplo, crónica) que son propensos a ser tratados de forma eficaz (es decir, responden a) mediante la administración de una dosis eficaz del inhibidor de microARN-122, como miravirsén.

El método de pronóstico puede usarse para la identificación de los no respondedores (o, en consecuencia, respondedores parciales) al tratamiento con el inhibidor de microARN-122.

El método anterior también se puede emplear en un método de tratamiento del VHC (por ejemplo, crónica), comprendiendo dicho método el método anterior y la posterior etapa de administrar dicho inhibidor de miR-122 a dicho sujeto.

La invención proporciona un kit de pronóstico para su uso *in vitro* en los métodos de pronóstico a los que se hace referencia en el presente documento, comprendiendo dicho kit el ensayo de detección de miR-122 (tal como una o más sondas de detección de miR-122 (por ejemplo, una o más sondas o cebadores oligonucleotídicos específicos de miR-122), un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa en tiempo real específico de miR-122 humano o una sonda de detección para miR-122 humano y al menos un ensayo de detección más de al menos otro biomarcador (como se describe en el presente documento), tales como ensayos de detección para GGT, ALT, AST o combinaciones de los mismos.

La invención proporciona un método para determinar la dosis eficaz probable de un agente inhibidor de miR-122 (el inhibidor de microARN-122), tal como miravirsén, para la administración a un sujeto con infección por VHC (por ejemplo, crónica), comprendiendo dicho método

ii) determinar el nivel de al menos un biomarcador en la muestra de sangre

iii) comparar el nivel del al menos una biomarcador con una o más muestras de referencia o valores de referencia;

para determinar la dosis eficaz probable del inhibidor de microARN-122 para la administración al sujeto con el fin de aliviar la infección por VHC (por ejemplo crónica), en la que el al menos un biomarcador es microARN-122.

La invención proporciona una sonda de detección para un microARN, tal como un microARN específico del hígado, por ejemplo, miR-122, o un ensayo que comprende dicha sonda de detección, para su uso como un compañero de diagnóstico (pronóstico) para una terapéutica del VHC, tal como un inhibidor de microARN-122 (por ejemplo miravirsén). El compañero de diagnóstico es adecuado para su uso en un ensayo de pronóstico para determinar la idoneidad de un sujeto en necesidad de tratamiento del VHC (tal como, VHC crónica), tales como los descritos en el presente documento.

Otros aspectos de la invención que se divulgan en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. *Distribución del grado de respuesta como una función del número de semanas completadas en el estudio.* Las líneas gruesas horizontales indican la mediana. El recuadro incluye los cuartiles primero a tercero. Los bigotes indican el máximo y el mínimo.

Figura 2. *Distribución de los pacientes en cada nivel de dosis para cada grado de respuesta a miravirsén.* Se muestra como A. gráfico de barras, y B, tabla contingencia

Figura 3. *Asociaciones significativas entre los observables y los grados de respuesta a miravirsén.* En cada subfigura se muestra un gráfico de barras de los valores promedio de cada grupo con barras de error indicadas +/- 1 desviación estándar, y un diagrama de dispersión de todos los valores en cada grado. A. miR-122, B. GGT, C. ALAT y D. ASAT.

Figura 4. *Agrupación jerárquica de observables clínicos usando relación completa.* La correlación se calculó como el coeficiente de correlación de Spearman, r . Las distancias se calcularon como $1-r^2$.

Figura 5. *Árbol binario de dos decisiones que marca a los pacientes como respondedores o no respondedores a miravirsén.* Los valores de corte para cada uno de los cuatro observables en el árbol se presentan como valores relativos al límite superior de la normalidad.

Figura 6. *Datos de los pacientes con CHC tratados con miravirsén apoyan el árbol de decisión binario.* Diagramas de dispersión de los pacientes con CHC por A. ALAT frente a ASAT, y B. GGT frente a miR-122. Los valores de corte de la figura 5 se indican como líneas discontinuas.

5 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un método para el tratamiento del VHC, comprendiendo dicho método administrar una cantidad eficaz (es decir, una dosis terapéutica) de un inhibidor de miR-122, tal como miravirsén, a un sujeto infectado con el VHC, en el que el sujeto, antes del tratamiento, tiene un nivel de ALT en suero por debajo del límite superior de la normalidad.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene un nivel de AST en suero por debajo del límite superior de la normalidad.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene un nivel de GGT en suero por debajo del límite superior de la normalidad.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene un nivel de microRNA-122 en suero por debajo del límite superior de la normalidad.

En algunas realizaciones, el sujeto, tiene una relación AST/ALT en suero de 1 o menos de 1.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene un valor de PT de menos de 14 segundos.

El sujeto puede ser como se ha definido como respondedor, tal como se hace referencia en el presente documento.

25 *Determinación de la función hepática normal*

La función hepática puede determinarse como normal si, por ejemplo, los biomarcadores séricos se consideran por debajo del límite superior de la normalidad. Con referencia a los biomarcadores en suero sanguíneo, tales como miR-122, ALT, AST y GGT, normal, se refiere a la porción central (95 %) de la distribución normal (es decir en el intervalo normal"). El límite superior de corte para el nivel normal (95 %) se conoce como el "límite superior de la normalidad". Se debe reconocer que el límite superior exacto de la normalidad puede variar, por ejemplo, dependiendo de la población de referencia normal, el género, la edad y, en algunos casos, las condiciones de ensayo específicas usadas.

En el contexto de la presente invención, por lo tanto, debe reconocerse que "función hepática normal" puede determinarse mediante la comparación con muestras o valores de referencia de una población de sujetos con función hepática normal. Un sujeto cuyos niveles de biomarcadores séricos en sangre se determina que están por encima del límite superior de la normalidad puede, en algunas realizaciones, ser más probable que sea un no respondedor o un mal respondedor.

Como alternativa, la determinación de la función hepática normal puede determinarse mediante selección de valores de corte predeterminados adecuados para uno o más de los niveles de biomarcadores, como se describe en el presente documento. Los ensayos usados para determinar los valores de corte específicos se identifican en el presente documento como los protocolos de ALT, AST y GGT ADVIA Chemistry, aunque también se pueden utilizar protocolos similares (teniendo en cuenta, la sensibilidad/variabilidad entre protocolo/ensayo). Los ejemplos no limitantes de tales valores de corte se proporcionan en el presente documento. Como tal, el intervalo normal se puede considerar que está por debajo de los niveles que están asociados con una función hepática sana o los valores de corte proporcionados en el presente documento.

En algunas realizaciones, el sujeto puede tener un nivel de miR-122, ALT, AST y/o GGT séricos en sangre que están por debajo del límite superior de la normalidad.

En el contexto de la presente invención, por lo tanto, debe reconocerse que "función hepática normal" puede determinarse mediante la comparación con muestras o valores de referencia de uno o más sujetos (preferiblemente una población de tamaño adecuado) con función hepática normal. A este respecto, la determinación de la función hepática normal puede determinarse mediante selección de valores de corte predeterminados adecuados para uno o más de los niveles de biomarcadores, como se describe en el presente documento. Los ejemplos no limitantes de tales valores de corte se proporcionan en el presente documento. Como tal, el intervalo normal se puede considerar que está por debajo de los niveles que están asociados con no respondedores, como se ilustra y detalla en el presente documento. Por lo tanto, en algunas realizaciones, antes del tratamiento, tiene un nivel de ALAT, ASAT, GammaGT, microARN-122 que está dentro del intervalo normal. En algunas realizaciones, el sujeto, antes del tratamiento, tiene un nivel sérico de ALT de menos de 69 U/l, y un nivel de -microRNA-122 en suero < 3, determinado mediante deltaC_t, y, opcionalmente, un nivel de GGT en suero de menos de 158 U/l.

Como alternativa o en combinación, la función hepática normal se puede indicar, por ejemplo, por la presencia de biomarcadores en suero dentro de un intervalo normal alrededor de la media, por ejemplo, 95 % de una distribución

estándar del nivel medio de biomarcador en suero dentro de un grupo de población sana. Los biomarcadores séricos utilizados para establecer una función hepática normal en una población de referencia son, preferiblemente, como se divulga en el presente documento, por ejemplo, miR-122, ALT, AST, GGT y/o la relación AST/ALT. El grupo de la población sana no está infectado con el VHC y, por lo general, debe ser demográficamente similar, ya que, por ejemplo, los biomarcadores hepáticos normales pueden diferir entre grupos demográficos de mujeres y hombres sanos

En el análisis de los datos clínicos y como se ilustra en los ejemplos:

- 10 - Los sujetos que tienen niveles de ALT previos al tratamiento de por debajo del límite superior de la normalidad es más probable que sean respondedores al tratamiento con un inhibidor de miR-122 tal como miravirsén. En algunas realizaciones, los respondedores y no respondedores o respondedores parciales pueden discriminarse por sus niveles de ALT en suero, con un nivel de ALT por debajo del límite superior de la normalidad indicativo de un respondedor (probable) y un nivel de ALT por encima del límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 1,5 x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 2x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 3x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 4x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 5x el límite superior de la normalidad indicativo de un (probable) no respondedor o (probable) respondedor parcial.
- 15 - Los sujetos que tienen niveles de AST previos al tratamiento de por debajo del límite superior de la normalidad es más probable que sean respondedores al tratamiento con un inhibidor de miR-122 tal como miravirsén. En algunas realizaciones, los respondedores y no respondedores o respondedores parciales pueden discriminarse por sus niveles de AST en suero, con un nivel de AST por debajo del límite superior de la normalidad indicativo de un respondedor (probable) y un nivel de AST por encima del límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 1,5 x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 2x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 3x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 4x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 5x el límite superior de la normalidad indicativo de un (probable) no respondedor o (probable) respondedor parcial.
- 20 - Los sujetos que tienen niveles de GGT previos al tratamiento de por debajo del límite superior de la normalidad es más probable que sean respondedores al tratamiento con un inhibidor de miR-122 tal como miravirsén. En algunas realizaciones, los respondedores y no respondedores o respondedores parciales pueden discriminarse por sus niveles de GGT en suero, con un nivel de GGT por debajo del límite superior de la normalidad indicativo de un respondedor y un nivel de GGT por encima del límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 1,5 x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 2x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 3x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 4x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 5x el límite superior de la normalidad indicativo de un no respondedor o respondedor parcial.
- 25 - Los sujetos que tienen niveles de miR-122 previos al tratamiento de por debajo del límite superior de la normalidad es más probable que sean respondedores al tratamiento con un inhibidor de miR-122 tal como miravirsén. En algunas realizaciones, los respondedores y no respondedores o respondedores parciales pueden discriminarse por sus niveles de miR-122 en suero, con un nivel de miR-122 por debajo del límite superior de la normalidad indicativo de un respondedor (probable) y un nivel de miR-122 por encima del límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 1,5 x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 2x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 3x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 4x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 5x el límite superior de la normalidad indicativo de un (probable) no respondedor o (probable) respondedor parcial.
- 30 - Los sujetos que tienen niveles de miR-122 previos al tratamiento de por debajo del límite superior de la normalidad es más probable que sean respondedores al tratamiento con un inhibidor de miR-122 tal como miravirsén. En algunas realizaciones, los respondedores y no respondedores o respondedores parciales pueden discriminarse por sus niveles de miR-122 en suero, con un nivel de miR-122 por debajo del límite superior de la normalidad indicativo de un respondedor (probable) y un nivel de miR-122 por encima del límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 1,5 x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 2x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 3x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 4x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 5x el límite superior de la normalidad indicativo de un (probable) no respondedor o (probable) respondedor parcial.
- 35 - Los sujetos que tienen niveles de miR-122 previos al tratamiento de por debajo del límite superior de la normalidad es más probable que sean respondedores al tratamiento con un inhibidor de miR-122 tal como miravirsén. En algunas realizaciones, los respondedores y no respondedores o respondedores parciales pueden discriminarse por sus niveles de miR-122 en suero, con un nivel de miR-122 por debajo del límite superior de la normalidad indicativo de un respondedor (probable) y un nivel de miR-122 por encima del límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 1,5 x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 2x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 3x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 4x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 5x el límite superior de la normalidad indicativo de un (probable) no respondedor o (probable) respondedor parcial.
- 40 - Los sujetos que tienen niveles de miR-122 previos al tratamiento de por debajo del límite superior de la normalidad es más probable que sean respondedores al tratamiento con un inhibidor de miR-122 tal como miravirsén. En algunas realizaciones, los respondedores y no respondedores o respondedores parciales pueden discriminarse por sus niveles de miR-122 en suero, con un nivel de miR-122 por debajo del límite superior de la normalidad indicativo de un respondedor (probable) y un nivel de miR-122 por encima del límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 1,5 x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 2x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 3x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 4x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 5x el límite superior de la normalidad indicativo de un (probable) no respondedor o (probable) respondedor parcial.
- 45 - Los sujetos que tienen niveles de miR-122 previos al tratamiento de por debajo del límite superior de la normalidad es más probable que sean respondedores al tratamiento con un inhibidor de miR-122 tal como miravirsén. En algunas realizaciones, los respondedores y no respondedores o respondedores parciales pueden discriminarse por sus niveles de miR-122 en suero, con un nivel de miR-122 por debajo del límite superior de la normalidad indicativo de un respondedor (probable) y un nivel de miR-122 por encima del límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 1,5 x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 2x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 3x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 4x el límite superior de la normalidad, tal como por debajo de 5x el límite superior de la normalidad indicativo de un (probable) no respondedor o (probable) respondedor parcial.

Como se ilustra en el presente documento, mediante la combinación de los resultados del ensayo para múltiples, tales como dos, tres de los cuatro biomarcadores séricos, la exactitud de la predicción de respondedores frente a no respondedores o respondedores parciales se puede mejorar considerablemente y, como tal, el valor de pronóstico puede mejorarse. La siguiente tabla muestra algunos ejemplos de combinaciones de biomarcadores séricos que pueden usarse.

1 marcador	2 marcadores	3 marcadores	4 marcadores
			ALT, AST y GGT y miR-122
		ALT y AST y miR-122	
	ALT y miR-122	ALT y GGT y miR-122	
miR-122		AST y GGT y miR-122	
	AST y miR-122		
	GGT y miR-122		

Como se ilustra a continuación, cuando se usan combinaciones de biomarcadores suero, se pueden usar diferentes estructuras clasificadoras para optimizar el valor predictivo (pronóstico).

Clasificadores/árboles de decisión

En algunas formas de realización cuando se detectan los niveles de los biomarcadores séricos, tales como ALT, AST, miR-122, y/o GGT en una muestra de suero (de un sujeto), se pueden utilizar para clasificar a ese paciente como respondedor o no respondedor al tratamiento, a través del uso de un clasificador (o árbol de decisión). Tales clasificadores pueden basarse en una "diferencia significativa" entre los patrones de los niveles de ALT, AST, miR-122, y GGT en respondedores y no respondedores. Tal diferencia significativa entre los patrones se refiere, en diferentes realizaciones, a una diferencia estadísticamente significativa o, en otras realizaciones, a una diferencia significativa como reconocida por un experto en la materia. Ventajosamente, los métodos de la invención pueden emplear el uso de analizadores de aprendizaje y de reconocimiento de patrones, algoritmos de agrupamiento y similares, con el fin de discriminar entre patrones de las muestras obtenidas de pacientes que tienen una afección asociada con la falta de respuesta o la respuesta al tratamiento. La diferencia también se puede ver evaluando el patrón de la muestra de ensayo a una regla de clasificación predeterminada o umbral obtenido de tal manera. En una realización, la regla de clasificación puede estar en forma de un árbol de decisión, tal como se describe en el ejemplo 5.

Método de pronóstico

La presente invención proporciona un método para determinar la idoneidad del tratamiento de un sujeto humano infectado con el virus de la hepatitis C (VHC) con un inhibidor de microARN-122 (por ejemplo miravirsén). La invención se basa en la sorprendente observación de que los marcadores de la función hepática presentes en el suero de los sujetos infectados con el VHC se pueden usar para discriminar entre la subpoblación de sujetos que responden a dicho tratamiento anti-VHC y los que no responden a la terapia del VHC (o responden solo parcialmente a la terapia del VHC). Además de discriminar entre respondedores y no respondedores, los métodos de la presente invención se pueden utilizar para determinar la dosis [probable] eficaz de dicho tratamiento del VHC en un sujeto humano infectado con el VHC (y en necesidad de un tratamiento eficaz para dicha infección por VHC).

Biomarcadores séricos

Se conocen numerosos biomarcadores séricos de la función hepática, a modo de un ejemplo no limitante se ha implicado a los siguientes como marcadores o posibles marcadores de la función hepática: alfa fetoproteína reactiva a lectina (AFP-L3), des-gamma-carboxi-protrombina (DCP), ER6Q, vimentina, proteína del músculo esquelético actina alfa 1, hMFAP 4, tropomiosina, PTGES 2, componente P del amiloide, transgelina, calponina 1, proteína p20 del homo sapiens, cadena ligera de 17 kDa de la miosina, cadena H de H Igg B12, prolil 4 hidroxilasa, subunidad beta de la metilentetrahidrofolato deshidrogenasa 1, PRO2619, aldehído deshidrogenasa 1, cadena alfa de la preproteína del fibrinógeno, fructosa bifosfato aldolasa-B, argininosuccinato sintetasa, Eefla2, AT P 5 A1, alfa-2 actina, regucalcina, seroalbúmina, malato deshidrogenasa mitocondrial, acetoacetil-CoA tiolasa mitocondrial, ácido hialurónico (HA), Hepascore, protrombina, gamma glutamil transpeptidasa, índice de apolipoproteína A1 (PGA), índice Age de las plaquetas (AP), índice de Bonacini, puntuación de Pohl, índice de Forns, índice de la relación aspartato aminotransferasa/plaquetas (APRI), índice MP3 (MMP1, PIINP), FIB4, y FibroIndex.

Los biomarcadores séricos (en sangre) de la función hepática incluyen, por ejemplo, los niveles de microARN-122 (tal como SEQ ID NO 2), glutamiltransferasa gamma (GammaGT), tiempo de protrombina (PT), alanina aminotransferasa (ALAT) y aspartato aminotransferasa (ASAT). En el presente documento se proporcionan otros marcadores de la función hepática y los resultados ilustran que los niveles séricos de ALT, AST, GGT y microARN-122 son los biomarcadores de mayor valor pronóstico, en tanto que la mayoría de los biomarcadores evaluados son de poco o ningún valor predictivo. Los marcadores de la función hepática pueden, en algunas realizaciones, estar asociados con daño hepático. Aunque sin desear quedar ligada a teoría alguna en particular, la presente invención se basa en la observación de que los sujetos infectados por el VHC que no respondieron al tratamiento con miravirsén tratamiento o que no respondieron a una dosis baja de miravirsén (por ejemplo, 3 mg/kg/peso corporal o inferior) presentaban niveles muy elevados en sangre de biomarcadores asociados con daño hepático, en particular niveles elevados de microARN-122, ALT, AST y/o GGT.

Los niveles de los biomarcadores séricos se evalúan típicamente antes del tratamiento. Los biomarcadores pueden ser biomarcadores séricos que son indicativos de la función hepática o, de otro modo, están asociados con la misma. Típicamente, los biomarcadores séricos se evalúan en muestras de suero tomadas del sujeto. Los biomarcadores en sangre pueden ser biomarcadores que están presentes, por ejemplo, en suero o plasma.

Puntos de tiempo para la evaluación de los biomarcadores séricos

Adecuadamente, el nivel de biomarcador(es) séricos se evalúa antes del tratamiento con un inhibidor del microARN-122, por ejemplo, con miravirsén, tales como en un plazo de aproximadamente 6 meses, tal como en un plazo de aproximadamente 5 meses, tal como en un plazo de aproximadamente 4 meses, tal como en un plazo de aproximadamente 3 meses, tal como en un plazo de aproximadamente 2 meses, tal como en un plazo de aproximadamente 1 mes, tal como en un plazo de aproximadamente 4 semanas, tal como en un plazo de aproximadamente 3 semanas, tal como en un plazo de aproximadamente 2 semanas, tal como en un plazo de aproximadamente 1 semana, tal como en un plazo de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días, antes de la primera (o

en algunas realizaciones posteriores) administración con el inhibidor de microARN-122. En algunas realizaciones, la evaluación del nivel de biomarcadores séricos implica la etapa de determinar el nivel de al menos un biomarcador en la muestra de sangre.

5 Se reconocerá que si, durante el tratamiento con el inhibidor de microARN-122, un sujeto se vuelve menos respondedor al tratamiento, medido por un aumento en el título viral, los métodos de la invención se pueden emplear para determinar si puede ser necesaria una dosis mejorada del inhibidor de microARN-122 para restaurar la eficacia del tratamiento. Como tales, los métodos de la invención pueden usarse para asegurar que se administra una dosis eficaz del inhibidor de microARN-122 al sujeto ya sea antes o durante un período de tratamiento.

10 *Valor pronóstico de los microARN en suero*

En algún aspecto, la presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que los niveles en suero de microARN-122 son discriminatorios de la capacidad de respuesta al tratamiento con miravirsén. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para determinar la idoneidad del tratamiento de un sujeto que sufre una enfermedad asociada con la expresión, o la sobreexpresión de un microARN, comprende dicho método las etapas de

- 15 i) determinar el nivel de al menos un biomarcador de microARN en la muestra de suero obtenida de un sujeto humano
- 20 ii) comparar el nivel de la al menos una biomarcador de microARN con una o más muestras de referencia o valores de referencia,

para determinar si el sujeto sea probablemente, o es, adecuado para el tratamiento de la enfermedad.

25 *miR-122 como biomarcador sérico*

En la presente invención se ha descubierto que los niveles elevados o altos de microARN en suero, tales como miR-122, en general, se correlacionan con un menor grado de respuesta a miravirsén. Esto es lo opuesto a lo que se ha informado para el tratamiento con interferón, en el que la disminución de los niveles de miR-122 en hígado se correlaciona con una mala respuesta. Por lo tanto, miR-122 en suero es un biomarcador de la capacidad de respuesta al tratamiento con un inhibidor de miR-122, tal como miravirsén.

30 microARN-122 (miR-122) es un microARN que es muy abundante en el hígado (Lagos-Quintana et al 2002) Current Biol vol 12 pág. 735-739) y es un factor celular del huésped distinto que se ha notificado que es esencial para la abundancia del ARN del VHC en hepatocitos mediante la formación de un complejo oligomérico con la región no codificante en 5' del VHC (Jopling et al 2005, Machlin et al., PNAS 2011). miR-122 existe en numerosas formas, incluyendo el microARN maduro (SEQ ID NO 2) y precursores del mismo, tales como la secuencia mostrada en SEQ ID NO 1. Se sabe que el microARN maduro existe en dos formas, una secuencia de microARN de 22 nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 2 y una forma adicional en la que hay un residuo adicional de U en 3'.

40 La secuencia de semillas de miR-122 se refiere a nucleósidos de 2 a 8 desde el extremo 5' de la secuencia madura de miR-122, es decir 5'-GGAGUGU-3'.

Según miRBase, la secuencia de la secuencia de miR-122 humano, hsa miR-122, es la siguiente:

45 > hsa-mir-122 secuencia precursora (miRBase) MI0000442:

CCUAGCAGAGCUGUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGUGUCUAAACUAUCAAACGCC
AUUAUCACACUAAAUAGCUACUGCUAGGC (SEQ ID NO 1)

50 La secuencia de hsa-miR-122 maduro (miRBase) MIMAT0000421:

UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG(U) (SEQ ID NO 2)

55 Los niveles de microARN en suero, tales como los niveles de miR-122 maduro pueden, como ejemplo no limitante, cuantificarse mediante la extracción de ARN a partir de muestras de suero utilizando, pero sin limitaciones, los métodos establecidos por Asuragen's Pharmacogenomics Services Group (Asuragen, Austin, Texas, EE.UU.) y la cuantificación de los niveles de miR-122 en suero en tales muestras de ARN mediante RT-qPCR, tal como TaqMan® MicroARN Ensayos (Applied Biosystems, Foster City, CA,) específica de miR-122. Se prevé que otros ensayos también pueden ser aplicables, incluyendo posibles ensayos inmunológicos, tales como ELISA.

60 El nivel de miR-122 presente en el suero puede determinarse como un valor absoluto o como una relación con un patrón. Los biomarcadores de microARN que pueden usarse como patrón para la normalización de los valores de miR-122 incluyen microARN cuyos niveles en suero son invariables, tales como miR-17, miR-18a, miR-345 y/o una combinación de miR-17/18a (referencias de normalización estables).

Valor de corte de miR 122 de ejemplo e intervalos:

En algunas realizaciones, un deltaCt (miR-122) > 3, tal como > 4, tal como > 5, tal como > 6, tal como > 7, tal como > 8 es indicativo de un no respondedor o un mal respondedor.

Delta Ct se define como el ciclo umbral (Ct) para miR-122 restado de la media de los ciclos del umbral de un microARN de referencia, tal como miR-17 o miR-18a. El ciclo umbral (Ct) refleja el número de ciclo en el cual la fluorescencia generada dentro de una reacción de qPCR cruza el umbral. El valor de Ct asignado a un pocillo en particular, por lo tanto, refleja el punto durante la reacción en el que un número suficiente de amplicones se han acumulado en dicho pocillo, que está en un punto estadísticamente significativa por encima del basal.

En algunas realizaciones, el nivel de miR-122 en la sangre en un supuesto no respondedor o mal respondedor es mayor que 5x el límite superior de la normalidad, tal como mayor que 6x el límite superior de la normalidad, tal como mayor que 7x el límite superior de la normalidad, tal como mayor que 8x el límite superior de la normalidad, tal como mayor que 9x el límite superior de la normalidad, tal como mayor que 10x el límite superior de la normalidad, tal como mayor que 11 x el límite superior de la normalidad, tal como mayor que 12x el límite superior de la normalidad, tal como mayor que 13x el límite superior de la normalidad, tal como mayor que 14x el límite superior de la normalidad, tal como mayor que 15x el límite superior de la normalidad del nivel normal en suero sanguíneo de miR-122.

Los microARN pueden detectarse de varias formas, por ejemplo, mediante micromatrices, transferencias Northern, transferencias de puntos, ensayos de protección de ARNasa, espectroscopia de masas cuantitativa, secuenciación, o diversas técnicas basadas en PCR cuantitativa. Como tal, el microARN en suero, tales como los niveles de microARN-122 pueden cuantificarse de forma rutinaria, como un ejemplo no limitante, mediante la extracción de ARN de muestras de suero humano utilizando, pero sin limitaciones, los métodos establecidos por Asuragen's Pharmacogenomics Services Group (Asuragen, Austin, Texas, EE.UU.), seguido de cuantificación de los niveles en suero de miR-122 en suero en tales muestras de ARN mediante RT-qPCR, tal como ensayos TaqMan® MicroARN (Applied Biosystems, Foster City, CA,) específico para miR-122. Los biomarcadores en suero de microARN, que pueden usarse como patrón para la normalización de los valores de miR-122 incluyen microARN cuya expresión en el suero es invariable, tal como miR-17, miR-18a, miR-345 y/o combinación de miR-17/18a (referencias de normalización estables).

Gamma glutamiltransferasa (también denominada en el presente documento GGT)

La gammaglutamiltransferasa o gamma-glutamil transpeptidasa (también γ -glutamil transferasa, GGT, GGT, gamma-GT) (EC 2.3.2.2) es una enzima que transfiere grupos funcionales gamma-glutamilo. Se encuentra en muchos tejidos, siendo el más notable el hígado, y tiene un significado en medicina como marcador diagnóstico. En la infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) es frecuente observar aumento de los niveles de gammaglutamil transferasa (GGT) en suero y los niveles elevados de GGT son un marcador indirecto de enfermedad hepática más avanzada en la hepatitis C crónica.

Los resultados del análisis de sangre para GGT sugieren que el percentil 97,5 de la población (el llamado "límite superior de la normalidad") es de aproximadamente 45 UI/l para las mujeres y de 75 UI/l para los hombres, aunque dependerá de la población de referencia y del ensayo utilizado.

Valores de corte/intervalos de GammaGT de ejemplo

En algunas realizaciones, el nivel de GGT en el suero de un supuesto no respondedor/respondedor parcial es > 1,5 x el límite superior de la normalidad, tal como > 2x el límite superior de la normalidad, tal como > 3 x el límite superior de la normalidad, tal como > 4x el límite superior de la normalidad, tal como > 5x el límite superior de la normalidad.

En algunas realizaciones, el nivel de GGT para un supuesto no respondedor/respondedor parcial mujer es > 60 UI/l, por ejemplo, > 70 UI/l, por ejemplo, > 80 UI/l, por ejemplo, > 90 UI/l, tal como > 100 UI/l.

En algunas realizaciones, el nivel de GGT para un supuesto no respondedor/respondedor parcial varón es > 100 UI/l, tal como > 110 UI/l, tal como > 120 UI/l, tal como > 130 UI/l, tal como > 140 UI/l.

Tiempo de protrombina

El tiempo de protrombina (PT) es una medida de la vía extrínseca de la coagulación sanguínea. Se utiliza para determinar la tendencia a la coagulación de la sangre y se puede utilizar para determinar el grado de daño hepático (función hepática), así como otros factores. Utilizando un ensayo estándar, el intervalo de referencia para el tiempo de protrombina es, por lo general, de aproximadamente 10-13 segundos. Un PT elevado, por ejemplo 17 segundos, es indicativo de daño hepático grave. En algunas realizaciones, el nivel de PT de un supuesto no respondedor/respondedor parcial es mayor que > 1x el valor normal, tal como > 1,1x el valor normal, tal como > 1,2x el valor normal, tal como > 1,3x el valor normal, tal como > 1,4x el valor normal, tal como > 1,5x el valor normal.

Alanina aminotransferasa (también denominada ALT o ALAT en el presente documento)

Antecedentes: alanina amino transferasa (ALAT), también conocido como alanina transaminasa (ALT) o transaminasa glutámico pirúvica en suero (SGPT), es una enzima homodimérica citoplasmática dependiente de piridoxal fosfato implicada en el metabolismo celular del nitrógeno, el metabolismo de los aminoácidos y la gluconeogénesis hepática. La ALT participa en la conversión de los principales metabolitos intermedios, que catalizan la transaminación reversible entre alanina y α -cetoglutarato para formar piruvato y glutamato. La ALT está ampliamente distribuida en muchos tejidos, pero se encuentra con mayor abundancia en el hígado. El papel principal de la ALT en el hígado es la conversión de alanina en glucosa, que después se exporta al cuerpo para su uso en una multitud de procesos.

Determinación de ALT: La medición de la actividad de la ALT se lleva a cabo, generalmente, mediante el control de la tasa de oxidación de NADH en un sistema de reacción acoplada usando lactato deshidrogenasa (LDH). La oxidación de NADH en NAD⁺ se acompaña de una disminución de la absorbancia a 340 nm. En circunstancias en las que la actividad de la ALT es limitante de la velocidad, la disminución de la velocidad es directamente proporcional a la actividad de la ALT en la muestra. Un protocolo para la medición de la ALT puede ser el ensayo de Advia Chemistry Systems ALT (03815151 Rev. B 2007-05).

La ALT se mide habitualmente clínicamente como parte de una evaluación de diagnóstico de lesión hepatocelular, para determinar la función hepática. Cuando se utiliza en diagnóstico, casi siempre se mide en unidades internacionales/litro (U/l). Aunque las fuentes varían en los valores del intervalo normal específicos, la mayoría muestra entre 5-60 U/l como valor normal. Cuando se encuentran niveles elevados de ALT en la sangre, las posibles causas subyacentes se pueden reducir mediante la medición de otras enzimas. Por ejemplo, los niveles elevados de ALT debido a los daños en las células hepáticas se pueden distinguir de los problemas de los conductos biliares mediante la medición de la fosfatasa alcalina. Los niveles elevados de ALT a menudo se asocian con el avance de las enfermedades relacionadas con el VHC y el daño hepático, y antes de la introducción de las pruebas basadas en inmunología, se usaban los niveles elevados de ALT para la detección de la infección potencial de VHC.

En algunas realizaciones, el nivel de ALT en el suero sanguíneo de un supuesto no respondedor/respondedor parcial es (por ejemplo, cuando se utiliza el ensayo Advia Chemistry Systems) > 69 U/l, tal como > 70 U/l, tal como > 75 U/l, tal como > 80 U/l, tal como > 90 U/l, tal como > 100 U/l, tal como > 110 U/l, tal como > 120 U/l, tal como > 130 U/l, tal como > 150 U/l, tal como > 200 U/l.

En algunas realizaciones, el nivel de ALT en el suero de un supuesto no respondedor/respondedor parcial es > 1,3 x el valor normal, tal como > 1,4x el valor normal, tal como > 1,5x el valor normal, tal como > 2x el valor normal, tal como > 3x el valor normal, tal como > 4x el valor normal, tal como > 5x el valor normal.

Aspartato aminotransferasa (también denominada ASAT en el presente documento)

Antecedentes: La aspartato aminotransferasa (ASAT), también conocida como aspartato transaminasa (AST) o transaminasa glutámico oxalacética sérica (SGOT), es una enzima transaminasa dependiente de piridoxal fosfato (PLP). La AST cataliza la transferencia reversible de un grupo α -amino entre aspartato y glutamato y, como tal, es una enzima importante en el metabolismo de los aminoácidos. La AST se encuentra en el hígado, corazón, músculo esquelético, los riñones, el cerebro y los glóbulos rojos de la sangre, y habitualmente se mide clínicamente como marcador de la salud hepática.

Medición: En general, el ensayo de actividad de la AST se basa en la cuantificación de oxalacetato producido por AST. En este ensayo, el oxaloacetato y el NADH se convierte en malato y NAD por la enzima malato deshidrogenasa. La disminución de la absorbancia del NADH a 340 nm es proporcional a la actividad de la AST.

Metodología básica: Véase, por ejemplo, Bergmeyer H.U., Scheibe P. y Wahlefeld A.W. (1978). Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. Clin. Chem. 24(1): 58-73 o Bowers Jr G.N. and McComb R.B. (1984). A unifying reference system for clinical enzymology: aspartate aminotransferase and the International Clinical Enzyme Scale. Clin. Chem. 30(7): 1128-1136. Un protocolo para la medición de la ALT puede ser el ensayo de Advia Chemistry Systems ALT (03903166 Rev. B 2007-05).

En algunas realizaciones, el nivel de AST en el suero de un supuesto no respondedor/respondedor parcial es > 1,3 x el valor normal, tal como > 1,4x el valor normal, tal como > 1,5x el valor normal, tal como > 2x el valor normal, tal como > 3x el valor normal, tal como > 4x el valor normal, tal como > 5x el valor normal.

En algunas realizaciones, el nivel de AST en sangre (suero/plasma) indicativo de no respondedores o respondedores parciales (por ejemplo, cuando se utiliza el ensayo Advia Chemistry Systems) > 50 U/l, tal como > 55 U/l, tal como > 60 U/l, tal como > 65 U/l, tal como > 70 U/l, tal como > 75 U/l, tal como > 80 U/l, tal como > 85 U/l, tal como > 90 U/l, tal como > 95 U/l, tal como > 100 U/l.

Relación ALT/AST:

Se ha informado de que una relación AST: ALT ≥ 1 es altamente específica pero no diagnóstica de la presencia de cirrosis en pacientes con infección crónica por el VHC. La relación refleja el grado de fibrosis en estos pacientes. En algunas realizaciones la relación AST/ALT en el suero sanguíneo de un supuesto no respondedor/respondedor

parcial es de al menos 1, tal como > 1, tal como > 1,1, tal como > 1,2, tal como > 1,3, tal como > 1,4, tal como > 1,5.

Sondas de detección y ensayos para microARN:

5 La invención proporciona una sonda de detección (o un par de sondas de detección) para uno o más microARN, tales como uno o más microARN específicos del hígado, tales como (incluyendo) microARN-122 (por ejemplo, miR-122 maduro), para su uso para determinar la probable idoneidad o la idoneidad de un sujeto para el tratamiento con un agente terapéutico del VHC, tales como el inhibidor de microARN-122, por ejemplo miravirsén. Como se ejemplifica con el inhibidor de microARN-122 en el presente documento, el nivel de microARN específico del hígado en suero puede correlacionarse inversamente con la idoneidad del sujeto para el tratamiento.

15 Por lo tanto, la sonda de detección de la invención se puede utilizar como un compañero de diagnóstico. Las sondas de detección pueden estar en forma de un kit, al que también se hace referencia en el presente documento como kit de pronóstico. Por tanto, la sonda o sondas de detección pueden formar parte de un ensayo de cuantificación. Un kit puede comprender, además, ensayos de cuantificación, por ejemplo, para otros biomarcadores séricos a los que se hace referencia en el presente documento como, por ejemplo, ALT, AST y/o GGT, y/o uno o más microARN de referencia, por ejemplo, uno o más microARN cuyos niveles son invariables en el suero.

20 Los microARN, tales como microARN-122, se pueden detectar en una muestra usando técnicas basadas en la hibridación. Una sonda de detección de microARN-122 puede, por ejemplo, ser un oligonucleótido (oligómero) que comprende una secuencia de bases nucleotídicas contiguas que es complementaria de al menos 6, tal como 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 nucleótidos contiguos presentes en la secuencia de microARN-122 maduro. El oligómero puede ser como se define en el presente documento en lo que respecta al inhibidor de microARN-122, por ejemplo puede modificarse mediante el uso de análogos de nucleósidos, tales como LNA. La sonda de detección puede tener la misma longitud que la secuencia de bases nucleotídicas contigua o, en algunas realizaciones, más larga, por ejemplo, hasta 30, tal como hasta 40, tal como hasta 50 nucleótidos de longitud.

30 Las sondas de detección comprenden, típicamente, una secuencia de reconocimiento complementaria a una diana de nucleótidos, tal como una secuencia diana de ARN (o ADN). Las sondas de detección pueden marcarse, es decir, comprender uno o más marcadores. El término "marcador" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier átomo o molécula que se puede usar para proporcionar una señal detectable (preferiblemente cuantificable) y que se puede unir a un ácido nucleico o a una proteína. Los marcadores pueden proporcionar señales detectables por fluorescencia, radiactividad, colorimetría, difracción de rayos X o absorción, magnetismo, actividad enzimática, inmunorreactividad y similares. El elemento de detección de las sondas de acuerdo con la invención puede estar con marcaje único o doble (p. ej., comprendiendo un marcador en cada extremo de la sonda o una posición interna). En un aspecto, la sonda de detección comprende dos marcadores capaces de interaccionar entre sí para producir una señal o para modificar una señal. De modo que se puede detectar una señal o un cambio en una señal cuando la sonda hibrida con una secuencia diana. Un aspecto concreto es cuando los dos marcadores comprenden un inactivador y una molécula indicadora. Un aspecto de detección concreto de la invención, denominado "baliza molecular con una región troncal" es cuando el segmento de reconocimiento está flanqueado por una primera y una segunda secuencias formadoras de horquilla complementarias, que pueden hibridar para formar una horquilla. Un marcador indicador está unido al extremo de una secuencia complementaria y un resto inactivador está unido al extremo de la otra secuencia complementaria. El tronco formado cuando las secuencias complementarias primera y segunda hibridan (es decir, cuando el segmento de reconocimiento de la sonda no hibrida con su diana) mantiene en estrecha proximidad estos dos marcadores, lo que hace que una señal producida por el indicador se inactive mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). La proximidad de los dos marcadores se reduce cuando la sonda hibrida a una secuencia diana y el cambio en la proximidad produce un cambio en la interacción entre los marcadores. Por tanto, la hibridación de la sonda tiene como resultado una señal (p. ej., fluorescencia) producida por la molécula indicadora, que se puede detectar y/o cuantificar. En el presente contexto, el término "marcador" significa un grupo indicador que puede ser detectado por sí mismo o como parte de una serie de detección. Ejemplos de partes funcionales de grupos indicadores son biotina, digoxigenina, grupos fluorescentes (grupos que pueden absorber radiación electromagnética, por ejemplo luz o rayos X, de una determinada longitud de onda y que, después, reemite la energía absorbida como radiación de una longitud de onda mayor; ejemplos ilustrativos son DANSILO (5-dimetilamino)-1-naftalenosulfonilo), DOXILO (N-oxil-4,4-dimetiloxazolidina), PROXILO (N-oxil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina), TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina), dinitrofenilo, acridinas, coumarinas, Cy3 y Cy5 (marcas de Biological Detection Systems, Inc.), eritrosina, ácido cumárico, umbeliferona, rojo Texas, rodamina, tetrametil rodamina, Rox, 7-nitrobenzo-2-oxa-1-diazol (NBD), pireno, fluoresceína, Europio, Rutenio, Samario y otros metales térreos raros), marcadores radioisotópicos, marcadores quimioluminiscentes (marcadores que son detectables a través de la emisión de luz durante una reacción química), marcadores de espín (un radical libre (p. ej., nitróxidos orgánicos sustituidos) u otras sondas paramagnéticas (por ejemplo, Cu²⁺, Mg²⁺) unidos a una molécula biológica detectable mediante el uso de espectroscopia de resonancia de electroespín). Ejemplos especialmente interesantes son biotina, fluoresceína, rojo Texas, rodamina, dinitrofenilo, digoxigenina, Rutenio, Europio, Cy5, Cy3, etc.

65 MicroRNA Expression Detection Methods (Wang, Zhiguo, Yang, Baofeng) Springer ISBN 978-3-642-04927-9 proporciona una revisión de los métodos de detección de microARN que se pueden usar para detectar y cuantificar

microARN en una muestra, por ejemplo, miR-122. Los métodos incluyen matrices de miARN, transferencias Northern, RT-PCR, miR-Q RT-PCR, RT-PCR de tallo-bucle. Ejemplos de análisis basados en hibridación/PCR incluyen:

- 5 • Sondas de detección/matrices de microARN (miARN) MiRCURY LNA™ (Exiqon A/S)
- Sistema Qiagen miScript PCR
- Kit de detección de miARN Ambion mirVana™ qRT-PCR,
- Ensayo AB Taqman miRNA
- Mir-X miRNA qRT-PCR SYBR® Kits (Clontech)

10 Otros ensayos incluyen

- Enfoque ELISA, por ejemplo mediante HFH
- Signosis miRNA Plate Assay (y ensayos de quimioluminiscencia HRP con estreptavidina/biotina similares)

15 Cuando se utiliza qPCR (QRT-PCR), una medida del nivel de expresión de un microARN específico es el "valor de ciclo umbral", denominado Ct, obtenido mediante qRT-PCR en tiempo real, como se describe en los ejemplos. Otra medida del nivel de expresión de un microARN específico es el "valor del punto de cruce", denominado Cp, asimismo obtenido mediante qRT-PCR en tiempo real. Las medidas Ct y Cp de los niveles de expresión de microARN proporcionan medidas aproximadamente similares, véase Bustin SA (editor) A-Z de la PCR cuantitativa, IUL Biotechnology Series 5 (2004). El uso de Ct o Cp depende de la máquina en la que se realiza el ensayo. Si la amplificación se realiza en un sistema de PCR en tiempo real LightCycler 480, el nivel de expresión de un microARN específico es mediante el uso de Cp. Si la amplificación se realiza en un instrumento de Applied Biosystems ABI Prism 7900HT la expresión de un microARN específico es mediante el uso de Cp.

25 *Muestras o valores de referencia*

En algunas realizaciones, el nivel de al menos un biomarcador en la muestra de sangre obtenida del sujeto con infección por VHC se compara con el nivel de la al menos una biomarcador con una muestra o valor de referencia.

30 Para uso en el método de pronóstico, por lo general, la muestra o valor de referencia se obtiene a partir de al menos un sujeto (una población adecuada de sujetos) con un nivel conocido o predeterminado del biomarcador y una capacidad de respuesta conocida a dicho tratamiento (tal como, el inhibidor de microARN-122, por ejemplo miravirsén). En algunas realizaciones, el nivel de al menos un biomarcador se compara con una base de datos de valores de referencia obtenidos de una población de sujetos con un nivel conocido o predeterminado del biomarcador y una capacidad de respuesta conocida a dicho tratamiento. En algunas realizaciones, el valor de referencia puede ser el valor que representa el límite superior de la normalidad, tal como se describe en el presente documento, o valores numéricos (múltiplos) de los mismos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el valor de referencia puede ser un valor de corte predeterminado determinado a partir de una base de datos de valores de referencia. En el presente documento se proporcionan ejemplos de valores de corte adecuados. Se debe reconocer que a medida que la base de datos se hace más amplia, la precisión por la cual los valores de corte individuales pueden asignarse mejorará. Además, como se ilustra en el presente documento, el valor de corte real asignado a cualquier biomarcador en sangre dependerá del contexto en el que se está analizando dicho nivel de biomarcador en sangre, por ejemplo la selección de otros biomarcadores de sangre y la estructura clasificadora utilizada en la etapa de comparación.

45 En algunos aspectos, el valor de referencia es el nivel o intervalo normal de dicho al menos un biomarcador.

50 En los métodos de diagnóstico descritos en el presente documento, la muestra o valor de referencia se obtiene de al menos un sujeto (una población adecuada de sujetos) con un nivel conocido o predeterminado del biomarcador y una etapa conocida de progresión de la hepatitis C en un sujeto humano, tales como el nivel de necroinflamación en el hígado (por ejemplo, tal como se evaluó por histología biopsia de hígado como se describe en el presente documento).

55 En algunas realizaciones, la invención se refiere a un sistema de ordenador que comprende una base de datos de dichos valores de referencia y un programa para la comparación del valor o valores del biomarcador obtenidos de la muestra de sangre obtenida del sujeto con la base de datos de valores de referencia. El programa de ordenador puede, en algunas realizaciones, comprender uno o más algoritmos clasificadores.

60 *Ejemplos de valores de corte/clasificadores*

Un supuesto no respondedor/respondedor parcial es un sujeto cuyos niveles de biomarcadores en suero son indicativos de una probabilidad (o tendencia) de que el sujeto puede ser un no respondedor o respondedor parcial. Como se describe en el presente documento, mediante la combinación de los valores de biomarcadores en suero para varios, tal como 2, 3, 4, 5 o 6 biomarcadores, el nivel de confianza logrado en la designación de los no respondedores o respondedores parciales se puede mejorar considerablemente. A este respecto, mientras que los

biomarcadores, tales como el miR-122, ALT, AST, GammaGT y PT son excelentes indicadores de un supuesto no respondedor, la capacidad para discriminar con precisión entre no respondedores, respondedores parciales y respondedores se aumenta considerablemente mediante la integración de varios biomarcadores.

5 En algunas realizaciones, se determina el nivel de al menos 2 biomarcadores, tal como al menos 2 biomarcadores enumerados en el presente documento, tales como los seleccionados del grupo que consiste en miR-122, GammaGT, ASAT y ALA (o relación ASAT/ALAT).

10 En algunas realizaciones, se determina el nivel de al menos 3 biomarcadores, tal como al menos 3 biomarcadores enumerados en el presente documento, tales como los seleccionados del grupo que consiste en coagulación en sangre (por ejemplo, PT), miR-122, GammaGT, ASAT y ALA (o relación ASAT/ALAT).

15 En algunas realizaciones, se determina el nivel de al menos 4 biomarcadores, tal como al menos 4 biomarcadores enumerados en el presente documento, tales como los seleccionados del grupo que consiste en coagulación en sangre (por ejemplo, PT), miR-122, GammaGT, ASAT y ALA (o relación ASAT/ALAT).

20 Como se ejemplifica en el presente documento, las combinaciones específicas de biomarcadores que son discriminatorias de no respondedores o respondedores parciales se pueden agrupar en clasificadores que integran los resultados obtenidos en los diferentes ensayos de biomarcadores para permitir predicciones muy precisas de qué sujetos son respondedores, respondedores parciales o no respondedores. Mediante un ejemplo no limitante, en base a los resultados obtenidos, un clasificador particularmente útil se muestra en la figura 3, en la que un nivel normal de ALAT (por ejemplo, 69 UI/l o menos) es predictivo de un respondedor, mientras que un nivel de SGPT > 69 UI/l puede ser predictivo de un no respondedor, pero es totalmente predictivo de un no respondedor cuando hay un nivel elevado de miR 122 (tal como un $-\Delta C_T$ de > 3), o una GGT elevada (tal como > 158 UI/l). Por lo tanto, como se ilustra en los ejemplos, es posible predecir con una precisión notable qué sujetos eran no respondedores y cuáles son respondedores al tratamiento con el inhibidor de microARN-122.

Ensayos de infección del VHC/título viral

30 La presencia de ARN del VHC en el suero o en el hígado es la primera prueba de la infección por VHC. El ARN del VHC es detectable en el suero mediante PCR en un plazo de días a ocho semanas después de la exposición, dependiendo en parte del tamaño de los inóculos.

35 Las técnicas virológicas moleculares desempeñan un papel fundamental en el diagnóstico y monitorización del tratamiento. Debido a que es difícil de cultivar el virus, la infección por el virus de la hepatitis C se confirma mediante la detección de ARN viral a través de pruebas de ácido nucleico (NAT) y estas pruebas se utilizan para monitorizar la respuesta al tratamiento antiviral (Scott JD y Gretch DR. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection. J Am Med Assn. 2007;297:724–32.).

40 Las pruebas ELISA anti-VHC se convierten en positivas ya a las ocho semanas después de la exposición. Aproximadamente la mitad de los pacientes con infección aguda sintomática tienen anticuerpos detectables contra el VHC en el ELISA la primera vez que se presenta. Sin embargo, el desarrollo de anticuerpos frente al VHC puede retrasarse en pacientes que tienen una infección subclínica.

45 Las pruebas con ácido nucleico detectan directamente la presencia de ARN del VHC usando una combinación de técnicas de amplificación y detección. A excepción de ciertas situaciones clínicas poco frecuentes, las NAT han suplantado al ensayo de inmunotransferencia recombinante como la prueba preferida para confirmar la infección por VHC. Las pruebas de ácido nucleico se clasifican en pruebas cualitativas (reacción en cadena de la polimerasa cualitativa [PCR], amplificación mediada por transcripción [TMA]) y pruebas cuantitativas (amplificación de ADN de cadena ramificada [bDNA]), PCR cuantitativa/PCR en tiempo real).

50 En la terapia estándar contra el VHC, todos los candidatos a terapia antiviral deben analizarse para determinar el título viral usando ensayos de cuantificación de ARN del VHC. Tanto los ensayos basados en la amplificación de la diana como los ensayos ramificados basados en la amplificación de señal se utilizan de forma rutinaria, con intervalos de cuantificación entre 10^1 y 10^6 UI (ml). Para la documentación de una respuesta virológica al final del tratamiento (respuesta al final del tratamiento) o una RVS (respuesta viral sostenida) 6 meses después de completar la terapia, se recomienda un ensayo de ARN del VHC cuantitativa más sensible (tal como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real TaqMan, con un umbral de sensibilidad de ~ 50 UI/ml) o un ensayo de ARN del VHC cualitativo (basado en la reacción en cadena de la polimerasa o amplificación mediada por transcripción, con límites de cuantificación inferiores de 50 ~UI/ml). Los ensayos de cuantificación del VHC se utilizan de forma rutinaria para demostrar la respuesta virológica al tratamiento y, por lo general, se usa el mismo ensayo antes y después del tratamiento.

60 Típicamente, para las terapias basadas en interferón, el nivel de VHC es un indicador de pronóstico de la probabilidad de respuesta (Dienstag y McHutchinson, AGA Vol 130, pág. 231–264). En el presente estudio, se encontró que para el tratamiento miravirsén, el nivel de VHC tenía menor valor pronóstico en comparación con los biomarcadores séricos a los que se hace referencia en el presente documento.

El sujeto

El sujeto es típicamente un ser humano que está infectado con el VHC. En algunas realizaciones, el sujeto tiene infección crónica por VHC.

5 Normalmente, el sujeto tiene o se le ha diagnosticado la infección por hepatitis C. En este sentido, los biomarcadores sanguíneos a los que se hace referencia en el presente documento pueden llevarse a cabo al mismo tiempo que las pruebas de diagnóstico para la infección por VHC, o después del diagnóstico de la infección por VHC.

10 El sujeto puede estar infectado con el VHC de un genotipo seleccionado a partir del grupo que consiste en 1a, 1b, 2, 3, 4, 5 o 6. En algunas realizaciones, el genotipo del VHC es 1a. En algunas realizaciones, el genotipo del VHC es 1b.

15 El sujeto puede ser un ser humano en necesidad de tratamiento eficaz para la hepatitis C crónica.

El tratamiento eficaz se determina mediante al menos una reducción de un log (es decir, una reducción por 10 veces) de los títulos virales de VHC como se describe en el presente documento (véase más adelante en respondedores/no respondedores). En algunas realizaciones, el tratamiento eficaz es la reducción de al menos dos log (es decir, 100 veces). Los respondedores parciales típicamente ilustran una reducción de la reducción de entre uno y dos log.

20 En algunas realizaciones, el sujeto puede no haber recibido tratamiento previo, es decir no tiene antecedentes de intervención terapéutica para el tratamiento de la infección por VHC.

25 En algunas realizaciones, el sujeto ha sido recientemente diagnosticado, por ejemplo, en los años anteriores, o el año anterior, o en un plazo de meses, tal como en un plazo de 3 meses.

En algunas realizaciones, el sujeto puede ser asintomático o solo levemente sintomático.

30 En algunas realizaciones, el estadio de fibrosis asociado con VHC (o necroinflamación) exhibido por el sujeto es menor que el estadio 3 en el sistema de puntuación de Ishak o el estadio F2 en la etapa de Metavir. De forma adecuada, en algunas realizaciones, el sujeto no tiene cirrosis incompleta o cirrosis del hígado, o en algunas realizaciones, fibrosis en puente o fibrosis portal.

35 En algunas realizaciones, levemente sintomático puede hacer referencia a los sujetos que tienen síntomas que corresponden a (o sujetos que han sido diagnosticados con) un estadio menor que el estadio 3 o 4 en la escala de Ishak, o menor que el estadio 2 o 3 en la escala METAVIR.

No respondedores y respondedores

40 **Grado de respuesta:** La respuesta al tratamiento con el inhibidor de microARN-122, tal como miravirsén, en cada paciente se clasifica en una escala de 0 a 4. Este grado se asigna en base a la máxima reducción de log en base 10 del VHC en comparación con el valor basal.

45 Específicamente:

- (i) Grado 0: Disminución inferior a 1 de la carga viral del VHC,
- (ii) Grado 1: Disminución de más de 1 log y menos de 2 log en la carga viral,
- (iii) Grado 2: Disminución de más de 2 log y de menos de 3 log en la carga viral,
- (iv) Grado 3: Disminución de más de 3 log y menos de 4 log en la carga viral,
- (v) Grado 4: Disminución de más de 4 log de la carga viral del VHC. Un grado entre 1 y 2 se considera que es un respondedor parcial. Los respondedores parciales todavía pueden beneficiarse de la terapia del VHC, en particular si se administra una dosis elevada de la terapéutica del VHC, tales como el inhibidor de miR-122 (por ejemplo miravirsén).

55 Los niveles de VHC en suero se pueden determinar usando Roche Diagnostics Taqman assay (por ejemplo, COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Test).

Ensayos diagnósticos no invasivos

60 Tradicionalmente, el nivel de necroinflamación en un sujeto infectado por VHC se determina mediante biopsia hepática, un procedimiento invasivo y doloroso que es ampliamente utilizado en Estados Unidos para proporcionar información sobre el estado del hígado y la información pronóstica para la futura progresión de la enfermedad (Dienstag y McHutchinson, Vol AGA 130, pág. 231-264). Las terapias basadas en interferón se utilizan tradicionalmente solo cuando la biopsia hepática indica fibrosis moderada a grave (estadio 3 o superior en el sistema de puntuación de Ishak, o estadio F2 o superior en la etapa Metavir)

Tabla 2. Sistemas de puntuación histológica de la fibrosis

Fibrosis	METAVIR ¹⁰⁵	Ishak ¹⁰⁴
Ninguno	0	0
Fibrosis portal (algunos)	1	1
Fibrosis portal (la mayoría)	1	2
Fibrosis en puente (ocasional)	2	3
Fibrosis en puente (marcada)	3	4
Cirrosis incompleta	4	5
Cirrosis	4	6

Si la biopsia hepática indica una enfermedad histológica más leve, la progresión puede considerarse suficientemente lenta como para justificar el seguimiento sin tratamiento con interferón inminente. Sin embargo, como se indica en la presente invención, el tratamiento de miravirsén puede ser particularmente adecuado para estadios tempranos de la enfermedad, dado que tales sujetos son más propensos a tener biomarcadores séricos indicativos de respondedores. La biopsia hepática percutánea se asocia con complicaciones potenciales, incluyendo sangrado (1 % -3 %), dolor (20 % -30 %), peritonitis biliar (< 1 %), neumotórax (< 1 %), vísceras perforadas (< 1 %) y muerte.

El valor pronóstico notable de la presente invención ilustra que para el tratamiento con un inhibidor de microARN-122, tal como miravirsén, se puede evitar una biopsia hepática. Los datos clínicos presentados en el presente documento también indican que el tratamiento con éxito con miravirsén puede estar asociado con etapas más leves de la enfermedad del VHC y, como tal, la presente invención también puede tener un valor diagnóstico significativo en la determinación de la etapa de la progresión de la enfermedad del VHC y, por lo tanto, pueden ser una alternativa no invasiva a la biopsia hepática.

En otro aspecto, la invención proporciona un método diagnóstico para determinar la etapa de progresión de la hepatitis C en un sujeto humano, tal como el nivel de necroinflamación en el hígado, comprendiendo dicho método las etapas de

- i) obtener una muestra de sangre del sujeto humano infectado con VHC
- ii) determinar el nivel de mircoRNA-122 en la muestra de sangre y al menos otro biomarcador en la muestra de sangre
- iii) comparar el nivel de microARN y el al menos otro biomarcador, con una muestra de referencia o uno o más valores de referencia obtenidos a partir de uno o más sujetos con una etapa conocida de progresión de la hepatitis C (tal como el nivel de necroinflamación) para determinar el estadio de la progresión de la hepatitis C en el sujeto.

Adecuadamente, los valores de referencia están en forma de una base de datos de valores de referencia obtenidos a partir de una población de sujetos con estadio conocido de la progresión de la infección por hepatitis C.

A modo de ejemplo, al menos un biomarcador adicional se selecciona del grupo que consiste en ALT, AST, GGT, ALT y GGT, ALT y AST, AST y GGT, y ALT, AST y GGT.

La etapa de la progresión del VHC puede determinarse, por ejemplo, de acuerdo con la escala METAVIR o la escala de Ishak (Ishak K, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. J Hepatol 1995; 22:696–699; Bedossa P y Poynard T, French METAVIR Cooperative Study Group. An algorithm for grading activity in chronic hepatitis C. Hepatology 1994;24:289–293).

También se reconoce que el nivel de necroinflamación puede determinarse en sujetos mamíferos que no están infectados con el VHC y, como tal, la invención proporciona un método para determinar el nivel de la función hepática en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de

- i) obtener una muestra de sangre de un sujeto mamífero, tal como un ser humano
- ii) determinar el nivel de mircoRNA-122 en la muestra de sangre y al menos otro biomarcador en la muestra de sangre
- iii) comparar el nivel de microARN y el al menos otro biomarcador con una muestra de referencia o uno o más valores de referencia obtenidos de uno o más sujetos con un nivel conocido de la función hepática para determinar el nivel de la función hepática en dicho sujeto.

A modo de ejemplo, al menos un biomarcador adicional se selecciona del grupo que consiste en ALT, AST, GGT, ALT y GGT, ALT y AST, AST y GGT, y ALT, AST y GGT. Por tanto, la invención proporciona el uso de un ensayo de cuantificación de microARN-122 para determinar el grado de la función hepática en un sujeto mamífero, en el que el uso es en combinación con dicho al menos otro biomarcador en la muestra de sangre. En algunas realizaciones, el

sujeto puede estar infectado con el VHC. En algunas realizaciones, el sujeto puede no estar infectado con el VHC. En algunas realizaciones, se puede diagnosticar al sujeto con un trastorno seleccionado del grupo que consiste en hepatitis, tal como hepatitis B, C y D, enfermedad del hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica, infección por citomegalovirus, infección esquistosomiasis e infección Leptospirosis.

5

Método para determinar la dosis eficaz probable del inhibidor de microARN-122, tal como Miravirsen

Los datos obtenidos del ensayo clínico de fase 2a indica que algunos sujetos no responden al tratamiento con miravirsen, en particular a la dosis baja de miravirsen (por ejemplo, 3 mg/kg). La correlación entre la capacidad de respuesta a miravirsen y la dosis es indicativa de la heterogeneidad dentro de las poblaciones de pacientes infectados por el VHC para la capacidad de respuesta al tratamiento con miravirsen y, como tal, la presente invención proporciona un método para determinar la dosis eficaz probable de un agente inhibidor de miR-122 (inhibidor de microARN-122), tal como miravirsen, para la administración a un sujeto con infección crónica por el VHC, comprendiendo dicho método

15

- ii) determinar el nivel de al menos un biomarcador en la muestra de suero obtenida de un sujeto humano
- iii) comparar el nivel del al menos una biomarcador con una o más muestras de referencia o valores de referencia;

para determinar la dosis eficaz probable del inhibidor de microARN-122 para la administración al sujeto con el fin de aliviar la infección por VHC, en la que el al menos un biomarcador es microARN-122.

El método anterior se puede combinar con el método de pronóstico, por ejemplo, los sujetos con una o más puntuaciones de biomarcadores en sangre que están fuera del intervalo normal, pero no están por encima del valor de corte establecido para su designación como no respondedor, pueden ser tratados eficazmente utilizando una dosis más alta de miravirsen, por ejemplo, a la dosis de 5 mg/kg o de 7 mg/kg. Como alternativa, el período de tratamiento puede extenderse.

El término "cantidad [terapéuticamente] eficaz" en general se refiere a una cantidad requerida para reducir los síntomas de la enfermedad en un individuo. La dosis se ajustará a los requisitos individuales en cada caso particular. Esa dosificación puede variar dentro de amplios límites dependiendo de numerosos factores, tales como la gravedad de la enfermedad a tratar, la edad y el estado de salud general del paciente, otros medicamentos con los que se está tratando al paciente, la vía y la forma de administración y las preferencias y la experiencia del médico implicado. Generalmente, en algunas realizaciones, el tratamiento se inicia con dosis más pequeñas por debajo de la dosis óptima del compuesto. Después, la dosis se puede aumentar en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo para el paciente individual. Un experto en el tratamiento de las enfermedades que se describen en el presente documento será capaz, sin excesiva experimentación y sobre la base de su conocimiento personal, la experiencia y las divulgaciones de la presente solicitud, de determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de la presente invención para una enfermedad y un paciente dados.

40

Una (por ejemplo, dosis diaria/semanal/mensual) puede, por ejemplo, estar entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, tal como entre 0,1 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, tal como entre 0,1 y 1 mg/kg de peso corporal peso al día, o entre 1,0 y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal al día. Por lo tanto, para la administración a una persona de 70 kg, en algunas realizaciones, el intervalo de dosificación puede ser de aproximadamente 7 mg a 0,7 g al día. En algunas realizaciones, cada dosis del oligómero, tal como miravirsen puede, por ejemplo, ser de entre aproximadamente 0,1 mg/kg o 1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg de 20 mg/kg, (es decir, un intervalo de entre, por ejemplo, 0,1 y 20 mg/kg, tal como entre 1 mg/kg y 12 mg/kg). Por lo tanto, las dosis individuales pueden ser, por ejemplo, aproximadamente 0,5 mg/kg, tal como aproximadamente 0,6 mg/kg, tal como aproximadamente 0,7 mg/kg, tal como aproximadamente 0,8 mg/kg, tal como aproximadamente 0,9 mg/kg, tal como aproximadamente 1 mg/kg, tal como aproximadamente 2 mg/kg, tal como aproximadamente 3 mg/kg, tal como aproximadamente 4 mg/kg, tal como aproximadamente 5 mg/kg, tal como aproximadamente 6 mg/kg, tal como aproximadamente 7 mg/kg, tal como aproximadamente 8 mg/kg, tal como aproximadamente 9 mg/kg, tal como aproximadamente 10 mg/kg. En algunas realizaciones, la dosis del oligómero está por debajo de 7 mg/kg, tal como por debajo de 5 mg/kg o por debajo de 3 mg/kg. En algunas realizaciones, la dosis del oligómero está por encima de 0,5 mg/kg, tal como por encima de 1 mg/kg.

55

En algunas realizaciones, el intervalo de tiempo entre cada administración del inhibidor de miR-122, tal como miravirsen durante el periodo de tratamiento puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, cinco días, seis días y semanalmente. En algunas realizaciones, el intervalo de tiempo entre la administración es, por lo menos, cada dos días, tal como, al menos cada tres días, tal como al menos cada 4 días, tal como, al menos cada 5 días, tal como al menos cada 6 días, tal como semanalmente, tal como al menos cada dos semanas (bisemanalmente) o al menos cada 3 o 4 semanas, o al menos mensualmente.

El oligómero, por ejemplo, miravirsen, puede administrarse, por ejemplo, por vía parenteral. Para administración parenteral, subcutánea, intradérmica o transdérmica, la formulación puede incluir un diluyente estéril, tampones, reguladores de la tonicidad y antibacterianos. El oligómero puede ser, por ejemplo, administrarse i.v.i o s.c. en una

65

solución salina. Para administración intravenosa o subcutánea, los vehículos preferidos son solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato. Otros métodos de administración se pueden usar, por ejemplo, administración oral, nasal, rectal.

5 Composiciones

El oligómero se puede usar en formulaciones y composiciones farmacéuticas. Adecuadamente, tales composiciones comprenden un diluyente, vehículo, sal o adyuvante farmacéuticamente aceptable. PCT/DK2006/000512 proporciona diluyentes, vehículos y adyuvantes farmacéuticamente aceptables adecuados y preferidos. Las dosis, formulaciones, vías de administración, composiciones, formas de dosificación, combinaciones con otros agentes terapéuticos, formulaciones de profármacos adecuados también se proporcionan en el documento WO2007/031091. Miravirsén sódico es una composición farmacéutica preferida.

En algunas realizaciones, el inhibidor de microARN-122 se administra en agua o agua salina. En algunas realizaciones, el inhibidor de microARN-122 se administra a través de una vía de administración parenteral, tal como intravenosa o subcutánea. En algunas realizaciones, la vía de administración es mediante administración oral (véase el documento WO2011/048125).

El inhibidor de microARN-122 puede estar, en algunas realizaciones, en una formulación unitaria (es decir, unidad de dosis), tal como en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz sin causar graves efectos secundarios en el paciente tratado.

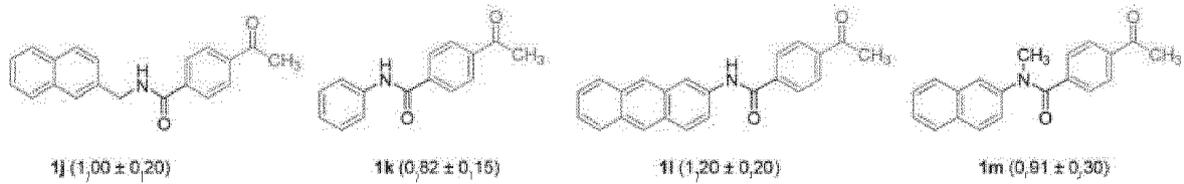
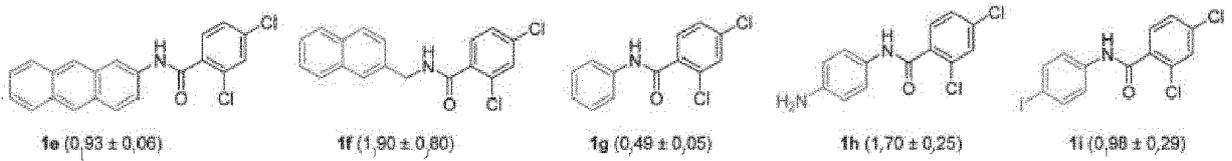
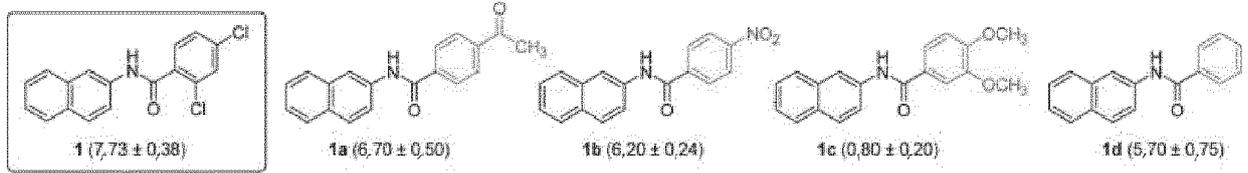
La dosificación de la composición farmacéutica depende de la gravedad y la capacidad de respuesta del estado de enfermedad que se va a tratar y el curso de tratamiento que dura de varios días a varios meses o hasta que se efectúa una cura y se consigue una disminución del estado de la enfermedad. Pautas de dosificación óptimas se pueden calcular a partir de mediciones de la acumulación del fármaco en el cuerpo del paciente. Las dosificaciones óptimas pueden variar en función de la potencia relativa de los oligonucleótidos individuales. En general, se puede estimar sobre la base de las CE_{50} que se ha encontrado que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, las dosificaciones varían de 0,01 μg a 1 g por kg de peso corporal y pueden administrarse una o más veces diariamente, semanalmente o mensualmente. Las tasas de repetición para la administración de la dosis se pueden estimar sobre la base de los tiempos de residencia medidos y las concentraciones del fármaco en los fluidos o tejidos corporales.

35 Agente anti-VHC

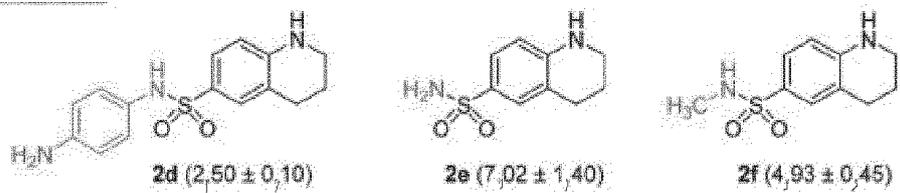
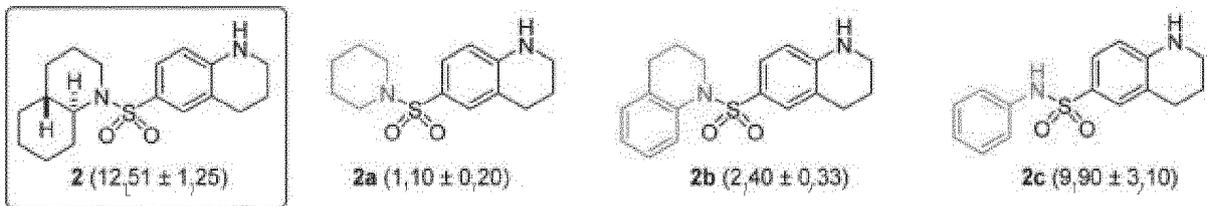
El agente anti-VHC puede ser un inhibidor de microARN-122 (un inhibidor de miR-122). La eficacia de un inhibidor de microARN, tal como un oligonucleótido antisentido, puede determinarse mediante la medición de los efectos aguas abajo de la inhibición de la actividad microARN-122 *in vivo*. Por ejemplo, la desrepresión de los ARNm diana de microARN-122 directos (indicios secundarios) o del colesterol en suero (índices terciarios) *in vivo*, por ejemplo en ratones o en primates (Elmén et al. Nature 2008). Sin embargo, el descubrimiento de que el mecanismo de interacción de miR-122 con el virus VHC es fundamentalmente distinto del mecanismo de represión de ARNm mediada por miR-122 proporciona una fuerte evidencia de que es probable que los ensayos basados en la inhibición *in vivo* de las dianas de ARNm de miR-122 sean inadecuados para la predicción de la inhibición clínicamente relevante de la replicación del VHC. A este respecto, los inhibidores de microARN-122 que pueden ser eficaces en el tratamiento del VHC *in vivo* típicamente son altamente eficaces en la desrepresión de las dianas de ARNm (por ejemplo, desrepresión de al menos 3 veces de ALDOA o Ndr3 *in vivo* en el ratón), y/o altamente eficaz en la reducción del colesterol en suero (por ejemplo, en aproximadamente al menos 30 – 40 % en ratones y primates no humanos, véase Elmén et al, Nature 2008). Agentes anti-VHC preferidos incluyen inhibidores de miR-122, tales como oligómeros antisentido: Además, se han descrito anteriormente inhibidores de molécula pequeña de microARN-122.

Inhibidor de miR-122 - inhibidores de molécula pequeña

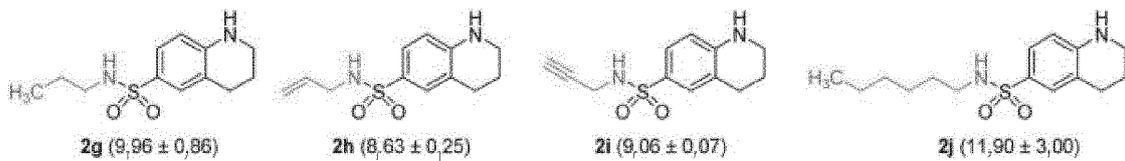
Como se ha comunicado en Young et al., JACS 2010, 132, 7976–7981), es posible analizar los inhibidores de molécula pequeña de miR122 y los inhibidores de molécula pequeña de miR-122 son conocidos, como los que se ilustran a continuación:



5



10



Los valores numéricos hacen referencia a la expresión de luciferasa debido a la desrepresión de miR-122 y los valores superiores a 1 indican inhibición de miR-122.

15

Inhibidor de miR-122 – Oligómero antisentido

El inhibidor de miR-122 puede ser un oligómero antisentido. En algunas realizaciones, el agente anti-VHC es un oligómero antisentido dirigido al hsa-microARN-122 maduro.

El oligómero antisentido puede comprender al menos 6, tal como al menos 7 bases nucleotídicas consecutivas que son complementarias a una parte de una secuencia de miR-122, tal como la secuencia de hsa-miR-122 maduro.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido antimir-122 puede diseñarse de manera que sea esencialmente incapaz de reclutar RNaseH, por ejemplo mediante el empleo de un diseño mezcla de mixmer o de totalmer. Los oligonucleótidos que son esencialmente incapaces de reclutar RNaseH son bien conocidos en la literatura, por ejemplo, véanse los documentos WO2007/112754, WO2007/112753o WO2009/043353. Se pueden diseñar Mixmers para comprender una mezcla de análogos de nucleótidos que potencian la afinidad, tales como en ejemplo no limitante, monómeros 2'-O-alquil-ARN, monómeros de 2'-amino-ADN, monómeros de 2'-fluoro-ADN, monómeros de LNA, monómeros de ácido arabino nucleico (ANA), monómeros de 2'-fluoro-ANA, monómeros de HNA, monómeros de 3 fluoro hexitol (3F HNA), monómeros de INA, 2'-MOE-ARN (2'-O-metoxietil-ARN), 2' fluoro-ADN y LNA. En una realización adicional, el oligonucleótido no incluye ningún nucleótido de ADN o de ARN, pero está exclusivamente compuesto por análogos de nucleótidos que potencian la afinidad, dicha molécula también se puede denominar totalmer. En algunas realizaciones, el mixmer solamente comprende un tipo de análogos de nucleótidos que potencian la afinidad, junto con ADN y/o ARN. En algunas realizaciones, el oligonucleótido está compuesto únicamente por uno o más tipos de análogos de nucleótidos, tal como, en el ejemplo no limitante, monómeros 2'-O-alquil-ARN, monómeros de 2'-amino-ADN, monómeros de 2'-fluoro-ADN, monómeros de LNA, monómeros de ácido arabino nucleico (ANA), monómeros de 2'-fluoro-ANA, monómeros de HNA, monómeros de INA, 2'-MOE-ARN (2'-O-metoxietil-ARN), 2'Fluoro-ADN y LNA.

Longitud

En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido tiene una longitud de 7 - 25 nucleótidos (contiguos), tal como 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 nucleótidos (contiguos). En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido tiene una longitud de 7-10 nucleótidos (contiguos) o, en algunos casos, 7 - 16 nucleótidos. En algunas formas de realización, el oligonucleótido antisentido de al menos 8 nucleótidos (contiguos) de longitud, entre 10-17 o 10 - 16 o 10-15 nucleótidos (contiguos), tal como entre 12 - 15 nucleótidos (contiguos).

Oligómeros que son esencialmente incapaces de reclutar RNasaH

En el documento EP 1 222 309 se proporcionan métodos *in vitro* para determinar actividad de RNasaH, que pueden usarse para determinar la capacidad de reclutar RNasaH. Un oligómero se considera capaz de reclutar RNasaH si, cuando se proporciona con el ARN diana complementario, que tiene una velocidad inicial, medida en pmol//min, de al menos 1 %, tal como al menos 5 %, tal como al menos 10 % o menos de 20 % del único oligonucleótido del ADN equivalente, sin sustituciones en 2', con grupos de enlace fosforotioato entre todos los nucleótidos en el oligonucleótido, usando la metodología proporcionada por los Ejemplos 91 - 95 del documento EP 1 222 309.

En algunas realizaciones, un oligómero se considera esencialmente incapaz de reclutar RNasaH si, cuando se proporciona con el ARN diana complementario y RNasaH, la velocidad inicial de RNasa, medida en pmol//min, de al menos 0,5 % es menor que 1 %, tal menor que 5 %, tal como menor que 10 % o menor que 20 % de la velocidad inicial determinada usando el único oligonucleótido del ADN equivalente, sin sustituciones en 2', con grupos de enlace fosforotioato entre todos los nucleótidos en el oligonucleótido, usando la metodología proporcionada por los Ejemplos 91 - 95 del documento EP 1 222 309.

Se debe reconocer que los oligonucleótidos que son mixmers o totalmers son, por lo general, esencialmente incapaces de reclutar RNasaH y, como tal, cuando se utiliza el término esencialmente incapaz de reclutar RNasaH en el presente documento, en algunas realizaciones, un término de este tipo puede reemplazarse con el término mixmer plazo o totalmer, como se ha definido en el presente documento, aunque, en algunos casos, tales oligómeros en realidad poseen una capacidad significativa para reclutar RNasa H, como cuando se utilizan mixmers de ADN con alfa-L-oxi-LNA.

Totalmers

En algunas realizaciones, el oligómero o la secuencia de nucleótidos contiguos del mismo consiste en una secuencia contigua de análogos de nucleótidos, tales como análogos de nucleótidos que potencian la afinidad, a los que en el presente documento se hace referencia como "totalmer".

Un totalmer es un único oligómero de cadena sencilla que solo comprende nucleótidos de origen no natural. El oligómero puede ser un totalmer, de hecho varios diseños de totalmers son altamente eficaces como oligómeros

terapéuticos, sobre todo cuando el objetivo es un microARN (antimiR) o como oligómeros de cambio de corte y empalme (SSO).

5 En algunas realizaciones, el totalmer comprende o consiste en al menos un motivo de la secuencia XYX o YXY , tal como una secuencia repetida XYX o YXY , en el que X es LNA e Y es un análogo de nucleótidos alternativo (es decir, no LNA), tal como una unidad de 2'-OMe ARN y una unidad de 2'-fluoro-ADN. El motivo de la secuencia anterior puede, en algunas realizaciones, ser XXY , XYX , YXY o YYX , por ejemplo.

10 En algunas realizaciones, el totalmer puede comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos contigua de entre 8 y 16 nucleótidos, tal como 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 nucleótidos, tal como entre 8 y 12 nucleótidos.

15 En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos contigua del totalmer comprende al menos 30 %, tal como al menos 40 %, tal como al menos 50 %, tal como al menos 60 %, tal como al menos 70 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 90 %, tal como 95 %, tal como 100 % de unidades de LNA. Las unidades restantes pueden seleccionarse a partir de los análogos de nucleótidos no LNA a los que se hace referencia en el presente documento, tales como los seleccionados del grupo que consiste en la unidad 2'-O-alkil-ARN, la unidad de 2'-OMe-ARN, la unidad de 2'-amino-ADN, la unidad 2'-fluoro-ADN, la unidad de LNA, la unidad de PNA, la unidad de HNA, la unidad de INA y una unidad de 2'MOE ARN, o la unidad del grupo 2'-OMe ARN y la unidad de 2'-fluoro ADN.

20 En algunas realizaciones, el totalmer consiste en o comprende una secuencia de nucleótidos contiguos que solo consiste en unidades de LNA.

25 En algunas realizaciones, el totalmer puede estar dirigido contra un micro ARN (es decir, ser antimiR), como se hace referencia en las solicitudes provisionales de Estados Unidos 60/979217 y 61/028062 y PCT/DK2008/000344.

Mixmer

30 El término 'mixmer' se refiere a oligómeros que comprenden nucleótidos de origen tanto natural como no natural, en los que, a diferencia de los gapmer, tailmer, headmer y blockmer, no hay una secuencia contigua de más de 5 nucleótidos de origen natural, tales como unidades de ADN.

35 El oligómero de acuerdo con la invención puede ser un mixmer, de hecho varios diseños de mixmers son altamente eficaces como oligómeros terapéuticos, sobre todo cuando el objetivo es un microARN (antimiR), sitios de unión a microARN en ARNm (Blockmirs) o como oligómeros de cambio de corte y empalme (SSO).

El oligómero puede ser, en algunas realizaciones, también un mixmer y, de hecho, debido a la capacidad de los mixmers para unirse de manera eficaz y específica a su diana, el uso de mixmers como oligómeros terapéuticos se considera que son particularmente eficaces en la disminución del ARN diana.

40 En algunas realizaciones, el mixmer comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos contiguos de patrón de repetición de análogo de nucleótidos y nucleótidos de origen natural, o un tipo de análogo de nucleótido y un segundo tipo de análogos de nucleótidos. El patrón de repetición puede, por ejemplo, ser cada segundo o cada tercer nucleótido es un análogo de nucleótido, tal como LNA, y los nucleótidos restantes son nucleótidos de origen natural, tales como ADN, o son un análogo de nucleótido sustituido en 2', tal como análogos 2'MOE o 2'fluoro análogos como se hace referencia en el presente documento, o, en algunas realizaciones, seleccionados de los grupos de análogos de nucleótidos a los que se hace referencia en el presente documento. Se reconoce que el patrón de repetición de los análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA, puede combinarse con análogos de nucleótidos en posiciones fijas, por ejemplo, en los extremos 5' o 3'.

50 En algunas realizaciones, el primer nucleótido del oligómero, contando desde el extremo 3', es un análogo de nucleótidos, tal como un nucleótido LNA.

En algunas realizaciones, que pueden ser iguales o diferentes, el segundo nucleótido del oligómero, contando desde el extremo 3', es un análogo de nucleótidos, tal como un nucleótido LNA.

55 En algunas realizaciones, que pueden ser iguales o diferentes, el séptimo y/u octavo nucleótido del oligómero, contando desde el extremo 3', son análogos de nucleótidos, tal como nucleótidos LNA.

En algunas realizaciones, que pueden ser iguales o diferentes, el noveno y/o décimo nucleótidos del oligómero, contando desde el extremo 3', son análogos de nucleótidos, tal como nucleótidos LNA.

60 En algunas realizaciones, que pueden ser iguales o diferentes, el extremo 5' del oligómero es un análogo nucleotídico, tal como un nucleótido LNA.

Las características del diseño anteriores pueden, en algunas realizaciones, incorporarse en el diseño de mixmer, tal como antimiR.

65 En algunas realizaciones, el mixmer no comprende una región de más de 4 unidades de nucleótidos de ADN

consecutivos o 3 unidades de nucleótidos de ADN consecutivos. En algunas realizaciones, el mixmer no comprende una región de más de 2 unidades de nucleótidos de ADN consecutivos.

5 En algunas realizaciones, el mixmer comprende una región que consiste en al menos dos unidades de análogos de nucleótidos consecutivos, tal como al menos dos unidades de LNA consecutivas.

En algunas realizaciones, el mixmer comprende una región que consiste en al menos tres unidades de análogos de nucleótidos consecutivos, tal como al menos tres unidades de LNA consecutivas.

10 En algunas realizaciones, el mixmer de la invención no comprende una región de más de 7 unidades de análogos de nucleótidos consecutivos, tales como unidades de LNA. En algunas realizaciones, el mixmer de la invención no comprende una región de más de 6 unidades de análogos de nucleótidos consecutivos, tales como unidades de LNA. En algunas realizaciones, el mixmer de la invención no comprende una región de más de 5 unidades de análogos de nucleótidos consecutivos, tales como unidades de LNA. En algunas realizaciones, el mixmer de la invención no comprende una región de más de 4 unidades de análogos de nucleótidos consecutivos, tales como unidades de LNA. En algunas realizaciones, el mixmer de la invención no comprende una región de más de 3 unidades de análogos de nucleótidos consecutivos, tales como unidades de LNA. En algunas realizaciones, el mixmer de la invención no comprende una región de más de 2 unidades de análogos de nucleótidos consecutivos, tales como unidades de LNA.

20 En las realizaciones del mixmer, que se refieren a la modificación de nucleótidos en las posiciones 3 a 8, contando desde el extremo 3', las unidades de LNA pueden reemplazarse por otros análogos nucleótidos, tales como los mencionados en el presente documento. Por tanto, "X" puede seleccionarse del grupo que consiste en unidad de 2'-O-alkil-ARN, unidad de 2'-OMe-ARN, unidad de 2'-amino-ADN, unidad de 2'-fluoro-ADN (2'fluoro), unidad 2'-MOE-ARN (2'MOE), unidad de LNA, unidad de PNA, unidad de HNA, unidad de INA. "X" es, preferiblemente, ADN o ARN, más preferiblemente ADN.

25 En algunas realizaciones, el mixmer, tal como un mixmer anti-miR, se modifica en las posiciones 3 a 8, es decir, comprende al menos un análogo de nucleótido en las posiciones 3 a 8, contando desde el extremo 3'. El diseño de esta secuencia se puede definir con el número de unidades no LNA presentes o con el número de unidades de LNA presentes. En algunas realizaciones del anterior, al menos uno, tal como uno, de los nucleótidos en las posiciones de tres a ocho, contando desde el extremo 3', es una unidad no LNA. En algunas realizaciones, al menos dos, tal como dos, de los nucleótidos en las posiciones de tres a ocho, contando desde el extremo 3', son unidades no LNA. En algunas realizaciones, al menos tres, tal como tres, de los nucleótidos en las posiciones de tres a ocho, contando desde el extremo 3', son unidades no LNA. En algunas realizaciones, al menos cuatro, tal como cuatro, de los nucleótidos en las posiciones de tres a ocho, contando desde el extremo 3', son unidades no LNA. En algunas realizaciones, al menos cinco, tal como cinco, de los nucleótidos en las posiciones de tres a ocho, contando desde el extremo 3', son unidades no LNA. En algunas realizaciones, los seis nucleótidos en las posiciones de tres a ocho, contando desde el extremo 3', son unidades no LNA.

40 El oligómero puede, en algunas realizaciones, ser o bien i) totalmente complementario de una subsecuencia de nucleótidos contiguos presentes en el miARN diana, o ii) comprende no más de una sola falta de coincidencia con la complementaria de una subsecuencia de nucleótidos contiguos presentes en dicho ARN diana. Como tal, el oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido, en cuanto a que es totalmente complementario a la región correspondiente de la secuencia diana, o comprende no más que una sola falta de coincidencia con la región correspondiente de la secuencia diana. El ARN diana se asocia típicamente con una afección médica o enfermedad y, en algunas realizaciones, puede ser un microARN o un ARNm, por ejemplo. Por consiguiente, el oligómero puede ser, por ejemplo, un anti-miR, un mimético de microARN, un blockmir de microARN, o un oligómero antisentido.

50 Por consiguiente, el oligómero puede ser un anti-miR que está dirigido (es decir, comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos contiguos que es totalmente complementaria de (a región correspondiente de) microARN-122 o comprende no más de una sola falta de coincidencia al mismo. Tales oligonucleótidos pueden denominarse oligonucleótidos anti-microARN.

55 Ejemplos de moduladores de microARN-122 útiles en la invención

Los compuestos especialmente preferidos para su uso en la presente invención son aquellos que están dirigidos a microARN-122. La secuencia de miR-122 se puede encontrar en la base de datos de microARN "mirbase" (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>). Se han descrito inhibidores de microARN-122 en numerosas patentes y artículos y son bien conocidos para el experto en la materia. En algunas realizaciones, los ejemplos de dichos documentos que describen moduladores útiles de microRNA-122 son WO2007/112754, WO2007/112753, o WO2009/043353. En algunas realizaciones, tales moduladores de microARN-122 son los descritos en los documentos WO2009/20771, WO2008/91703, WO2008/046911, WO2008/074328, WO2007/90073, WO2007/27775, WO2007/27894, WO2007/21896, WO2006/93526, WO2006/112872, WO2005/23986, o WO2005/13901, o WO2010/122538.

Miravirsen (SPC3649)

En una realización preferida, el oligómero antisentido es Miravirsén (SPC3649), que tiene la fórmula.



en la que una letra minúscula identifica una unidad de ADN y una letra mayúscula identifica una unidad de LNA, ^mC identifica un 5-metilcitosina LNA, el subíndice _s identifica un enlace entre nucleósidos fosforotioato, y en la que las unidades de LNA son beta-D-oxi, como identificado por un superíndice ^o después del residuo de LNA.

Miravirsén es el primer medicamento dirigido a microARN para entrar en ensayos clínicos. Miravirsén puede usarse como monoterapia o en combinación con agentes antivirales de acción directa, como un tratamiento libre de interferón para la infección crónica por VHC en múltiples genotipos.

El término "oligómero" en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula formada por la unión covalente de dos o más nucleótidos (es decir, un oligonucleótido). En el presente documento, un solo nucleótido (unidad) también puede denominarse monómero o unidad. En algunas realizaciones, los términos "nucleósido", "nucleótido", "unidad" y "monómero" se utilizan indistintamente. Se reconocerá que cuando se hace referencia a una secuencia de nucleótidos o monómeros, a lo que se hace referencia es a la secuencia de bases, tales como A, T, G, C o U.

El oligómero consiste normalmente en o comprende una secuencia de nucleótidos contiguos de 7 - 25 unidades.

En diversas realizaciones, el compuesto de la invención no comprende ARN (unidades). Se prefiere que el compuesto de acuerdo con la invención sea una molécula lineal o se sintetiza como una molécula lineal. El oligómero es una molécula de una sola hebra y, preferentemente, no comprende regiones cortas de, por ejemplo, al menos 3, 4 o 5 nucleótidos contiguos, que son complementarios a regiones equivalentes dentro del mismo oligómero (es decir, dúplex), a este respecto, el oligómero no es (esencialmente) de doble cadena. En algunas realizaciones, el oligómero esencialmente no tiene doble cadena, tal como no es un ARN_{ic}. En diversas realizaciones, el oligómero de la invención puede consistir enteramente en la región de nucleótidos contiguos. Por lo tanto, el oligómero no es sustancialmente autocomplementario.

Los términos y "análogo de nucleótido correspondiente" y "nucleótido correspondiente" tienen por objeto indicar que el nucleótido en el análogo de nucleotídico y el nucleótido de origen natural son idénticos. Por ejemplo, cuando la unidad de 2-desoxirribosa del nucleótido está unida a una adenina, el "análogo nucleótido correspondiente" contiene una unidad de pentosa (diferente de 2-desoxirribosa) unida a una adenina.

Los términos "complemento inverso", "complementaria inversa" y "complementariedad inversa", como se usa en el presente documento, son intercambiables con los términos "complemento" "complementaria/o" y "complementariedad".

Nucleósidos y análogos nucleosídicos

En algunas realizaciones, los términos "análogo nucleosídico" y "análogo de nucleótidos" se utilizan indistintamente.

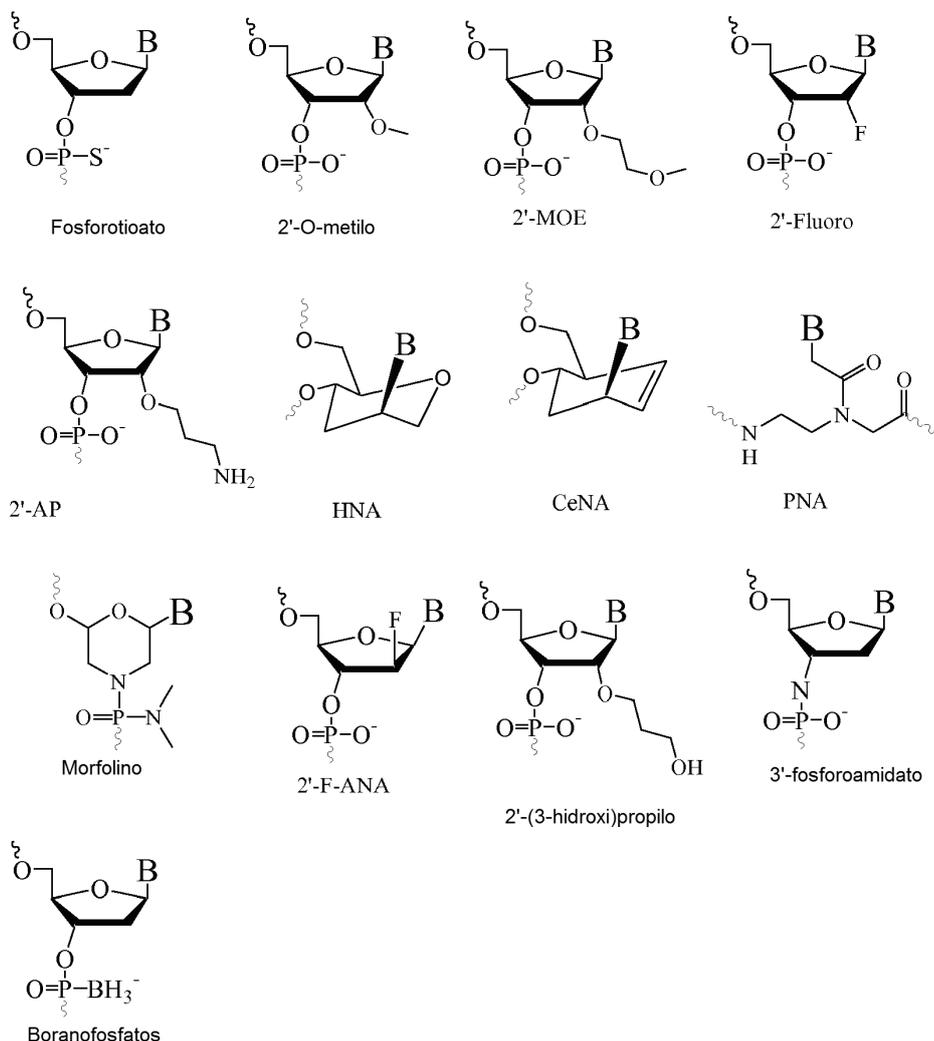
El término "nucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere a un glucósido que comprende un resto de azúcar, un resto de base y un grupo unido por enlace covalente (grupo de unión), tales como un grupo de enlace internucleotídico fosfato o fosforotioato, y abarca tanto los nucleótidos de origen natural, tales como ADN o ARN, como los nucleótidos no naturales que comprenden restos de azúcar y/o base modificados, a los que también se hace referencia como "análogos de nucleótidos" en el presente documento. En el presente documento, un solo nucleótido (unidad) también puede denominarse monómero o unidad de ácido nucleico.

En el campo de la bioquímica, el término "nucleósido" se usa habitualmente para hacer referencia a un glucósido que comprende un resto de azúcar y un resto de base, y, por lo tanto, se puede utilizar cuando se hace referencia a las unidades de nucleótidos, que están unidas covalentemente por los enlaces internucleotídicos entre los nucleótidos del oligómero. En el campo de la biotecnología, el término "nucleótido" se utiliza a menudo para hacer referencia a un monómero o unidad de ácido nucleico, y, como tal, en el contexto de un oligonucleótido puede hacer referencia a la base, tal como la "secuencia de nucleótidos", por lo general denominada secuencia de bases nucleotídicas (es decir, la presencia de la cadena principal de azúcar y los enlaces internucleosídicos está implícita). Asimismo, en particular, en el caso de oligonucleótidos en los que uno o más de los grupos de enlace internucleosídicos están modificados, el término "nucleótido" puede referirse a un "nucleósido", por ejemplo el término "nucleótido" se puede utilizar, incluso cuando se especifica la presencia o la naturaleza de los enlaces entre los nucleósidos.

Como un experto en la técnica reconocería, el nucleótido en el extremo 5' de un oligonucleótido no comprende un grupo de enlace internucleotídico en 5', aunque pueden o no comprender un grupo 5' terminal. Los nucleótidos de origen no natural incluyen nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados, tales como

nucleótidos bicíclicos o nucleótidos modificados en 2', tales como nucleótidos sustituidos en 2'.

5 "Análogos de nucleótidos" son variantes de los nucleótidos naturales, tales como nucleótidos ADN o ARN nucleótidos, en virtud de las modificaciones los restos de azúcar y/o de bases. En principio, los análogos podrían ser simplemente "silenciosos" o "equivalentes" a los nucleótidos naturales en el contexto del oligonucleótido, es decir no tienen ningún efecto funcional sobre la forma en que el oligonucleótido funciona para inhibir la expresión del gen diana. Sin embargo, dichos análogos "equivalentes" pueden ser útiles si, por ejemplo, son más fáciles o más baratos de fabricar, o son más estables en condiciones de almacenamiento o fabricación, o representan a una marca o marcador. Preferiblemente, sin embargo, los análogos tendrán un efecto funcional sobre la forma en la que el oligómero funciona para inhibir la expresión; por ejemplo, produciendo una mayor afinidad de unión a la diana y/o un aumento de la resistencia a las nucleasas intracelulares y/o una mayor facilidad de transporte al interior de la célula. Los ejemplos específicos de análogos nucleosídicos se describen en, por ejemplo, Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 y Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213, y en el esquema 1:



15 El oligómero puede, por tanto, comprender o consistir en una secuencia simple de nucleótidos de origen natural, preferiblemente 2'-desoxinucleótidos (denominado en el presente documento en general "ADN"), pero también, posiblemente, ribonucleótidos (denominado en el presente documento en general "ARN"), o una combinación de tales nucleótidos de origen natural y uno o más nucleótidos de origen no natural, es decir análogos de nucleótidos. Dichos ejemplos de análogos de nucleótidos pueden potenciar adecuadamente la afinidad del oligómero la secuencia diana.

20 Los ejemplos de análogos de nucleótidos adecuados y preferidos se proporcionan en el documento WO2007/031091 o son referencias en el mismo.

25 La incorporación de análogos de nucleótidos que potencian la afinidad en el oligómero, tal como LNA o azúcares

sustituidos en 2', puede permitir que el tamaño del oligómero de unión se reduzca y también puede reducir el límite superior para el tamaño del oligómero antes de que se produzca una unión inespecífica o aberrante.

En algunas realizaciones, el oligómero comprende al menos 1 análogo nucleosídico. En algunas realizaciones, el oligómero comprende al menos 2 análogos nucleosídicos. En algunas realizaciones, el oligómero comprende de 3-8 análogos de nucleótidos, por ejemplo 6 o 7 análogos de nucleótidos. En las realizaciones, con mucho, más preferidas, al menos uno de dichos análogos de nucleótidos 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 de nucleótidos pueden ser LNA. En algunas realizaciones, todos los análogos de nucleótidos pueden ser LNA.

Se reconocerá que cuando se hace referencia a un motivo de secuencia de nucleótidos preferida o secuencia de nucleótidos, que consiste solamente en nucleótidos, los oligómeros de la invención que están definidos por la secuencia pueden comprender un análogo de nucleótidos correspondiente en lugar de uno o más de los nucleótidos presentes en dicha secuencia, tales como unidades de LNA u otros análogos de nucleótidos, que aumentan la estabilidad del dúplex/T_m del dúplex de oligómero/diana (es decir, análogos de nucleótidos que aumentan la afinidad).

En algunas realizaciones, cualquier apareamiento erróneo entre la secuencia de nucleótidos del oligómero y la secuencia diana se encuentran, preferentemente, en las regiones fuera de los análogos de nucleótidos que aumentan la afinidad, tales como la región B a la que se hace referencia en el presente documento, y/o la región D como se hace referencia en el presente documento, y/o en el sitio de no modificados, tales como los nucleótidos de ADN en el oligonucleótido, y/o en regiones en las que están 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos contiguos.

Ejemplos de tal modificación del nucleótido incluyen modificar el resto de azúcar para proporcionar un grupo sustituyente en 2' o para producir una estructura en puente (ácido nucleico bloqueado) que mejora la afinidad de unión y también puede proporcionar una mayor resistencia a las nucleasas.

Un análogo de nucleótido preferido es LNA, tal como oxi-LNA (tal como beta-D-oxi-LNA y alfa-L-oxi-LNA), y/o amino-LNA (tal como beta-D-amino-LNA y alfa-L-amino-LNA) y/o tio-LNA (tal como beta-D-tio-LNA y alfa-L-tio-LNA) y/o ENA (tal como beta-D-ENA y alfa-L-ENA). El más preferido es beta-D-oxi-LNA.

En algunas realizaciones, los análogos de nucleótidos presentes en el oligómero de la invención (tal como en las regiones A y C mencionadas en el presente documento) se seleccionan independientemente de, por ejemplo: unidades de 2'-O-alkil-ARN, unidades de 2'-amino-ADN, unidades de 2'-fluoro-ADN, unidades de LNA, unidades de ácido arabino nucleico (ANA), unidades de 2'-fluoro-ANA, unidades de HNA, 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 de nucleótidos presente en el oligómero de la invención, o secuencia de nucleótidos contiguos del mismo.

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

En algunas formas de realización, el oligómero de acuerdo con la invención comprende al menos una unidad de ácido nucleico bloqueado (LNA), tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 unidades de LNA, tales como de 3-7 o de 4 a 8 unidades de LNA, o 3, 4, 5, 6 o 7 unidades de LNA. En algunas realizaciones, todos los análogos de nucleótidos son LNA. En algunas realizaciones, el oligómero puede comprender tanto beta-D-oxi-LNA, como una o más de las siguientes unidades de LNA: tio-LNA, amino-LNA, oxi-LNA, y/o ENA ya sea las configuraciones beta-D o alfa-L o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, todas las unidades de citosina de LNA son 5'metil-citosina. En algunas realizaciones de la invención, el oligómero puede comprender unidades de LNA y de ADN. Preferiblemente, el total combinado de unidades de LNA y ADN es de 10-25, tal como 10-24, preferiblemente 10-20, tal como 10 - 18, incluso más preferiblemente 12-16. En algunas realizaciones de la invención, la secuencia de nucleótidos del oligómero, tal como la secuencia de nucleótidos contiguos consiste en al menos un LNA y las unidades de nucleótidos restantes son unidades de ADN. En algunas realizaciones, el oligómero comprende solo análogos de nucleótidos de LNA y nucleótidos de origen natural (tales como, ARN o ADN, más preferentemente nucleótidos de ADN), opcionalmente con enlaces internucleotídicos modificados, tales como fosforotioato.

El término "base nucleotídica" se refiere al resto de base de un nucleótido y cubre las variantes tanto de origen natural como de origen no natural. El término "base nucleotídica" cubre no solo los heterociclos de purina y pirimidina conocidos, sino también los análogos heterocíclicos y los tautómeros de los mismos.

Ejemplos de bases nucleotídicas incluyen, pero no se limitan a, adenina, guanina, citosina, timidina, uracilo, xantina,

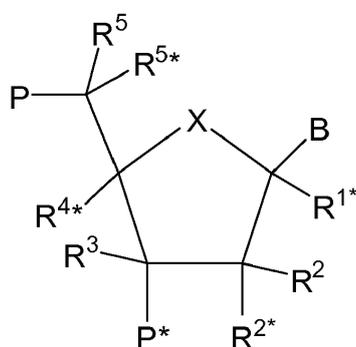
hipoxantina, 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina, y 2-cloro-6-aminopurina.

- 5 En algunas realizaciones, al menos una de las bases nucleotídicas presentes en el oligómero es una base nucleotídica modificada seleccionada del grupo que consiste en 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocytosine, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina, y 2-cloro-6-aminopurina.

LNA

- 10 El término "LNA" se refiere a un análogo de nucleósido bicíclico, conocido como "ácido nucleico bloqueado". Puede hacer referencia a un monómero de LNA, o, cuando se utiliza en el contexto de un "oligonucleótido de LNA", LNA se refiere a un oligonucleótido que contiene uno o más de tales análogos de nucleótidos bicíclicos. Los nucleótidos de LNA se caracterizan por la presencia de un grupo enlazador (tal como un puente) entre C2' y C4' del anillo de azúcar ribosa, por ejemplo como se muestra como el birradical $R^{4*} - R^{2*}$ como se describe más adelante.

- 15 El LNA usado en los compuestos de oligonucleótidos de la invención tiene, preferiblemente, la estructura de la fórmula general I



Fórmula 1

- 20 en la que para todos los centros quirales, los grupos asimétricos pueden encontrarse en cualquier orientación R o S;

en la que X se selecciona de -O-, -S-, -N (R^N)-, -C (R^6R^{6*})-, tal como, en algunas realizaciones -O-;

- 25 B se selecciona de hidrógeno, alcoxi C_{1-4} opcionalmente sustituido, alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido, aciloxi C_{1-4} opcionalmente sustituido, incluyendo las bases nucleotídicas de origen natural y análogos de bases nucleotídicas, intercaladores de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores y ligandos; preferiblemente, B es una base nucleotídica o análogo de base nucleotídica;

P designa un enlace internucleotídico de un monómero adyacente, o un grupo 5'-terminal, incluyendo tal enlace internucleotídico o grupo 5'-terminal opcionalmente el sustituyente R^5 o igualmente aplicable el sustituyente R^{5*} ;

- 30 P^* designa un enlace internucleotídico de un monómero adyacente, o un grupo 3'-terminal;

R^{4*} y R^{2*} juntos designan un grupo enlazador bivalente que consiste en 1 - 4 grupos/átomos seleccionados de entre $-C(R^aR^b)-$, $-C(R^a)=C(R^b)-$, $-C(R^a)=N-$, $-O-$, $-Si(R^a)_2-$, $-S-$, $-SO_2-$, $-N(R^a)-$, y $>C=Z$, en el que Z se selecciona de $-O-$, $-S-$, y $-N(R^a)-$, y R^a y R^b cada uno se selecciona de forma independiente de hidrógeno,, alquilo C_{1-12} opcionalmente sustituido, alquenoilo C_{2-12} opcionalmente sustituido, alquinoilo C_{2-12} opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxi C_{1-12} opcionalmente sustituido, alcoxialquilo C_{2-12} , alquenoilo C_{2-12} , carboxilo, alcóxicarbonilo C_{1-12} , alquilarcarbonilo C_{1-12} , formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxi, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxi, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di(C_{1-6} -alquil)amino, carbamoilo, mono- y di(alquilo C_{1-6})-amino-carbonilo, amino-alquilo C_{1-6} -aminocarbonilo, mono- y di(alquilo C_{1-6})aminO-alquilo C_{1-6} -aminocarbonilo, alquilo C_{1-6} -carbonilamino, carbamido, alcanoiloxi C_{1-6} , sulfono, alquilsulfoniloxi C_{1-6} , nitro, azido, sulfanilo, alquiltio C_{1-6} , halógeno, intercaladores de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores, y ligandos, en los arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos y en los que dos sustituyentes geminales R^a y R^b juntos pueden designar metileno (CH_2) opcionalmente sustituido, en el que para todos los centros quirales, los grupos asimétricos pueden encontrarse en cualquiera orientación R o S, y;

- 45 cada uno de los sustituyentes de R^{1*} , R^2 , R^3 , R^5 , R^{5*} , R^6 y R^{6*} , que están presentes se selecciona de forma independiente de hidrógeno, alquilo C_{1-12} opcionalmente sustituido, alquenoilo C_{2-12} opcionalmente sustituido, alquinoilo C_{2-12} opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxi C_{1-12} , alcóxicarbonilo C_{1-12} , alquilarcarbonilo C_{1-12} , formilo, arilo ariloxi-carbonilo, ariloxi, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxi, heteroarilcarbonilo, amino, mono y di alquil C_{1-6} -mino, carbamoilo, mono y di(alquil C_{1-6})-amino-carbonilo, amino-alquilo C_{1-6} -aminocarbonilo, mono y di(alquil C_{1-6})amino-alquil C_{1-6} -aminocarbonilo, alquil C_{1-6} -carbonilamino, carbamido, alcaloiloxi C_{1-6} , sulfono, alquilo C_{1-6} -sulfoniloxi, nitro, azido, sulfanilo, alquil

C₁₋₆-tio, halógeno, intercalantes de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores y ligandos, en los que arilo y heteroarilo pueden estar sustituidos opcionalmente y en los que dos sustituyentes geminales R_a y R_b juntos pueden designar oxo, tioxo, imino o metileno opcionalmente sustituido en los que R^N se selecciona de hidrógeno, alquilo C₁₋₄, y en el que dos sustituyentes adyacentes (no geminales) pueden designar un enlace adicional resultante en un enlace doble; y RN*, cuando está presente y no implicado en un birradical, 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, los grupos asimétricos pueden encontrarse en cualquier orientación R o S.

En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} juntos designan un birradical que consiste en un grupo seleccionado del grupo que consiste 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 puede estar opcionalmente independientemente seleccionado. En algunas realizaciones, R^a y R^b pueden seleccionarse opcionalmente independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁₋₆, tal como metilo, tal como hidrógeno.

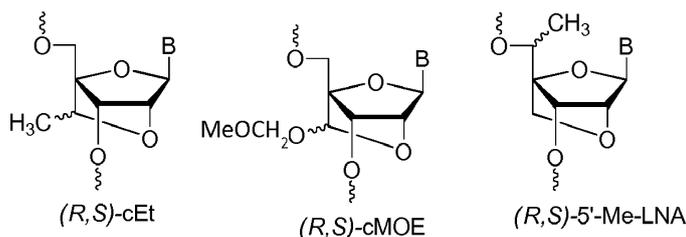
En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} juntos designan el birradical -O-CH (CH₂OCH₃) - (2O-metoxietilo ácido nucleico bicíclico – Seth at al., 2010, J. Org. Chem) – en la configuración R- o S-.

En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} juntos designan el birradical -O-CH(CH₂CH₃)-(2'O-etilbicíclico ácido nucleico – Seth at al., 2010, J. Org. Chem). - en la configuración R- o S-.

En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} juntos designan el birradical -O-CH(CH₃)-. - en la configuración R- o S-. En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} juntos designan el birradical -O-CH₂-O-CH₂- – Seth at al., 2010, J. Org. Chem).

En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} juntos designan el birradical -O-NR-CH₃-(Seth at al., 2010, J. Org. Chem).

En algunas realizaciones, las unidades de LNA tienen una estructura seleccionada del siguiente grupo:



En algunas realizaciones, R^{1*}, R², R³, R⁵, R^{5*} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alqueno C₂₋₆, alqueno C₂₋₆ sustituido, alquino C₂₋₆ o alquino 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, los grupos asimétricos pueden encontrarse en cualquier orientación R o S.

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

En algunas realizaciones, R^{1*}, R², R³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alqueno C₂₋₆, alqueno C₂₋₆ sustituido, alquino C₂₋₆ alkynyl o alquino 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, los grupos asimétricos pueden encontrarse en cualquier orientación R o S.

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

En algunas realizaciones, R⁵ y R^{5*} se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, -CH₃, -CH₂-CH₃, -CH₂-O-CH₃, y -CH = CH₂. Adecuadamente, en algunas realizaciones, R⁵ o R^{5*} son hidrógeno, en donde como el otro grupo (R⁵ o R^{5*} respectivamente) se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₋₅, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alqueno C₂₋₆ sustituido, alquino C₂₋₆ sustituido o acilo sustituido (-C(=O)-); en los que cada grupo sustituido está mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alqueno C₂₋₆, alqueno C₂₋₆ sustituido, alquino C₂₋₆, alquino C₂₋₆ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, N₃, COOJ₁, CN, O-C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=NH)NJ₁J₂ o N(H)C(=X)N(H)J₂ en las que X es O o S; y cada J₁ y J₂ es, de forma independiente, H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alqueno C₂₋₆, alqueno C₂₋₆ sustituido, alquino C₂₋₆, alquino C₂₋₆ sustituido, aminoalquilo C₁₋₆, aminoalquilo C₁₋₆ sustituido o un grupo protector. En algunas realizaciones, R⁵ o R^{5*} es alquilo C₁₋₆ sustituido. En algunas realizaciones, 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)NJ₁J₂ o N(H)C(O)N(H)J₂. En algunas realizaciones cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, H o alquilo C₁₋₆. En algunas realizaciones, R⁵ o

R^{5*} es metilo, etilo o metoximetilo. En algunas realizaciones, R⁵ o R^{5*} es metilo. En una realización adicional, R⁵ o R^{5*} es etilenilo. En algunas realizaciones, R⁵ o R^{5*} es acilo sustituido. En algunas realizaciones, R⁵ o R^{5*} es C(=O)NJ₁J₂. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos pueden encontrarse en cualquier orientación R o S. Dichos 5' nucleótidos bicíclicos modificados se divulgan en el documento WO 2007/134181.

En algunas realizaciones, B es una base nucleotídica, incluyendo análogos de bases nucleotídicas y bases nucleotídicas de origen natural, tales como una purina o pirimidina, o una purina sustituida o pirimidina sustituida, tal como una base nucleotídica a la que se hace referencia en el presente documento, tal como una base nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en adenina, citosina, timina, adenina, uracilo, y/o una base nucleotídica modificada o sustituida, tal como 5-tiazolo-uracilo, 2-tio-uracilo, 5-propinil-uracilo, 2'-tio-timina, 5-metilcitosina, 5-tiozolo-citosina, 5-propinil-citosina y 2,6-diaminopurina.

En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} juntos designan un birradical 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 cada uno se selecciona de forma independiente de hidrógeno, alquilo C₁₋₁₂, opcionalmente sustituido, alquenilo C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, alquinilo C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, hidroxí, alcoxi C₁₋₁₂, alcoxi alquilo C₂₋₁₂, alquenilo C₂₋₁₂, carboxi, alcoxycarbonilo C₁₋₁₂, alquilcarbonilo C₁₋₁₂, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxi, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxi, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di (alquil C₁₋₆)amino, carbamoilo, mono- y di (alquilo C₁₋₆)-amino-carbonilo, amino-alquilo C₁₋₆-aminocarbonilo, mono- y di(alquilo C₁₋₆)amino-alquilo C₁₋₆-aminocarbonilo, alquilo C₁₋₆-carbonylamino, carbamido, alcanilo C₁₋₆, sulfono, alquilsulfonilo C₁₋₆, nitro, azido, sulfanilo, alquiltio C₁₋₆, halógeno, intercaladores de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores y ligandos, en los que arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos y en los que dos sustituyentes geminales R^a y R^b juntos pueden designar metileno opcionalmente sustituido (CH =₂). Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos pueden encontrarse en cualquier orientación R o S.

En una realización adicional R^{4*} y R^{2*} juntos designan un birradical (grupo bivalente) 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, los grupos asimétricos pueden encontrarse en cualquier orientación R o S.

En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} junto designan el birradical C(R^aR^b)-N(R^c)-O-, en la que R^a y R^b se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alquenilo C₂₋₆, alquenilo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆ o alquinilo C₂₋₆ sustituido, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C₁₋₆ o aminoalquilo C₁₋₆ sustituido, como hidrógeno, y; en la que R^c se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo C₁₋₆ sustituido, alquenilo C₂₋₆, alquenilo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆ o alquinilo C₂₋₆ sustituido, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C₁₋₆ o aminoalquilo C₁₋₆ sustituido, tal como hidrógeno.

En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} junto designan el birradical C(R^aR^b)-O-C(R^cR^d)-O-, en la que R^a, R^b, R^c y R^d se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alquenilo C₂₋₆, alquenilo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆ alquynil o alquinilo C₂₋₆ sustituido, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo C₁₋₆ o aminoalquilo C₁₋₆ sustituido, tal como hidrógeno.

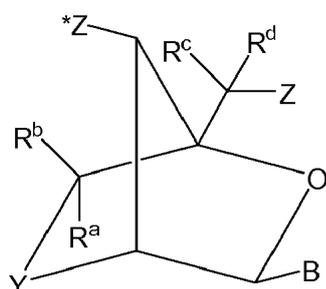
En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} forman el birradical -CH(Z)-O-, en el que Z se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alquenilo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆ sustituido, acilo, acilo sustituido, amida sustituida, tiol o tiol sustituido; y en el que cada uno de los grupos sustituidos, están, de forma independiente, mono o poli sustituidos con grupos sustituyentes opcionalmente protegidos seleccionados independientemente de halógeno, oxo, hidroxilo, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ³C(=X)NJ₁J₂ y CN, en el que cada uno de J₁, J₂ y J₃ es, de forma independiente, H o alquilo C₁₋₆, y X es O, S o NJ₁. En algunas realizaciones Z es alquilo C₁₋₆ o alquilo C₁₋₆ sustituido. En algunas realizaciones, Z es metilo. En algunas realizaciones Z es alquilo C₁₋₆ sustituido. En algunas realizaciones dicho grupo sustituyente es alcoxi C₁₋₆. En algunas realizaciones, Z es CH₃OCH₂-. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos pueden encontrarse en cualquier orientación R o S. Tales nucleótidos bicíclicos se divulgan en el documento US 7,399,845. En algunas realizaciones, R^{1*}, R², R³, R⁵, R^{5*} son hidrógeno. En algunas realizaciones, R^{1*}, R², R^{3*} son hidrógeno, y uno o ambos de R⁵, R^{5*} pueden ser distintos de hidrógeno como se ha hecho referencia anteriormente y en el documento WO 2007/134181.

En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} juntos designan un birradical que comprende un grupo amino sustituido en el puente de forma que consisten en o comprenden el birradical -CH₂-N(R^c)-, en el que R^c es alquilo C₁₋₁₂. En algunas realizaciones R^{4*} y R^{2*} juntos designan un birradical -Cq₃q₄-NOR-, en el que q₃ y q₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alquenilo C₂₋₆, alquenilo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆ o alquinilo C₂₋₆ sustituido, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, acilo, acilo

sustituido, aminoalquilo C₁₋₆ o aminoalquilo C₁₋₆ sustituido; en el que cada grupo sustituido es, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, COOJ₁, CN, O-C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=NH)N J₁J₂ o N(H)C(=X=N(H)J₂) en el que X es O o S; y cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, aminoalquilo C₁₋₆ o un grupo protector. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos pueden encontrarse en cualquier orientación R o S. Tales nucleótidos bicíclicos se divulgan en el documento WO2008/150729. En algunas realizaciones, R^{1*}, R², R³, R⁵, R^{5*} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alquenilo C₂₋₆, alquenilo 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. En algunas realizaciones, R^{1*}, R², R³, R⁵, R^{5*} son hidrógeno. En algunas realizaciones, R^{1*}, R², R³ son hidrógeno y uno o ambos de R⁵ R^{5*} pueden ser distintos de hidrógeno como se ha hecho referencia anteriormente y en el documento WO 2007/134181. En algunas realizaciones R^{4*} y R^{2*} juntos designan un birradical (grupo bivalente) C(R^aR^b)-O-, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente halógeno, halógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alquenilo C₂₋₆, alquenilo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ sustituido, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, OJ₁, SJ₁, SOJ₁, SO₂J₁, NJ₁J₂, N₃, CN, C(=O)OJ₁, C(=O)NJ₁J₂, C(=O)J₁, O-C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=NH)NJ₁J₂, N(H)C(=O)NJ₁J₂ o N(H)C(=S)NJ₁J₂; o R^a y R^b juntos son =C(q₃)(q₄); q₃ y q₄ son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C₁₋₆ o alquilo C₁₋₆ sustituido; cada grupo sustituido es, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alquenilo C₂₋₆, alquenilo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ sustituido, OJ₁, SJ₁, NJ₁J₂, N₃, CN, C(=O)OJ₁, C(=O)NJ₁J₂, C(=O)J₁, O-C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=O)NJ₁J₂ o N(H)C(=S)NJ₁J₂. y cada uno de J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alquenilo C₂₋₆, alquenilo C₂₋₆ sustituido, alquinilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ sustituido, aminoalquilo C₁₋₆, aminoalquilo C₁₋₆ sustituido o un grupo protector. Tales compuestos se divulgan en el documento WO2009006478A.

In En algunas realizaciones, R^{4*} y R^{2*} forman el birradical - Q -, en el que Q es C(q₁)(q₂)C(q₃)(q₄), C(q₁)=C(q₃), C[=C(q₁)(q₂)]-C(q₃)(q₄) o C(q₁)(q₂)-C[=C(q₃)(q₄)]; q₁, q₂, q₃, q₄ son cada uno independientemente, H, halógeno, alquilo C₁₋₁₂, alquilo C₁₋₁₂ sustituido, alquenilo C₂₋₁₂, alcoxi C₁₋₁₂ sustituido, OJ₁, SJ₁, SOJ₁, SO₂J₁, NJ₁J₂, N₃, CN, C(=O)OJ₁, C(=O)-NJ₁J₂, C(=O) J₁, -C(=O)NJ₁J₂, N(H)C(=NH)NJ₁J₂, N(H)C(=O)NJ₁J₂ o N(H)C(=S)NJ₁J₂; cada J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, aminoalquilo C₁₋₆ o un grupo protector; y, opcionalmente, en el que cuando Q es C(q₁)(q₂)(q₃)(q₄) y uno de q₃ o q₄ es CH₃ entonces al menos uno del otro de q₃ o q₄ o uno de q₁ y q₂ es distinto de H. En algunas realizaciones, R^{1*}, R², R³, R⁵, R^{5*} son hidrógeno. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos pueden encontrarse en cualquier orientación R o S. Tales nucleótidos bicíclicos se divulgan en el documento WO2008/154401. En algunas realizaciones, R^{1*}, R², R³, R⁵, R^{5*} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alquenilo C₂₋₆, alquenilo 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. En algunas realizaciones, R^{1*}, R², R³, R⁵, R^{5*} son hidrógeno. En algunas realizaciones, R^{1*}, R², R³ son hidrógeno y uno o ambos de R⁵, R^{5*} pueden ser distintos de hidrógeno como se ha hecho referencia anteriormente y en el documento WO 2007/134181 o WO2009/067647 (análogos de ácidos nucleicos alfa-L-bicíclicos).

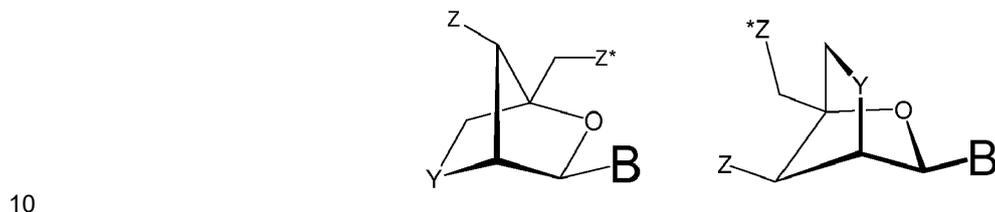
En algunas realizaciones, el LNA usado en los compuestos de oligonucleótidos de la invención tiene, preferiblemente, la estructura de la fórmula general II:



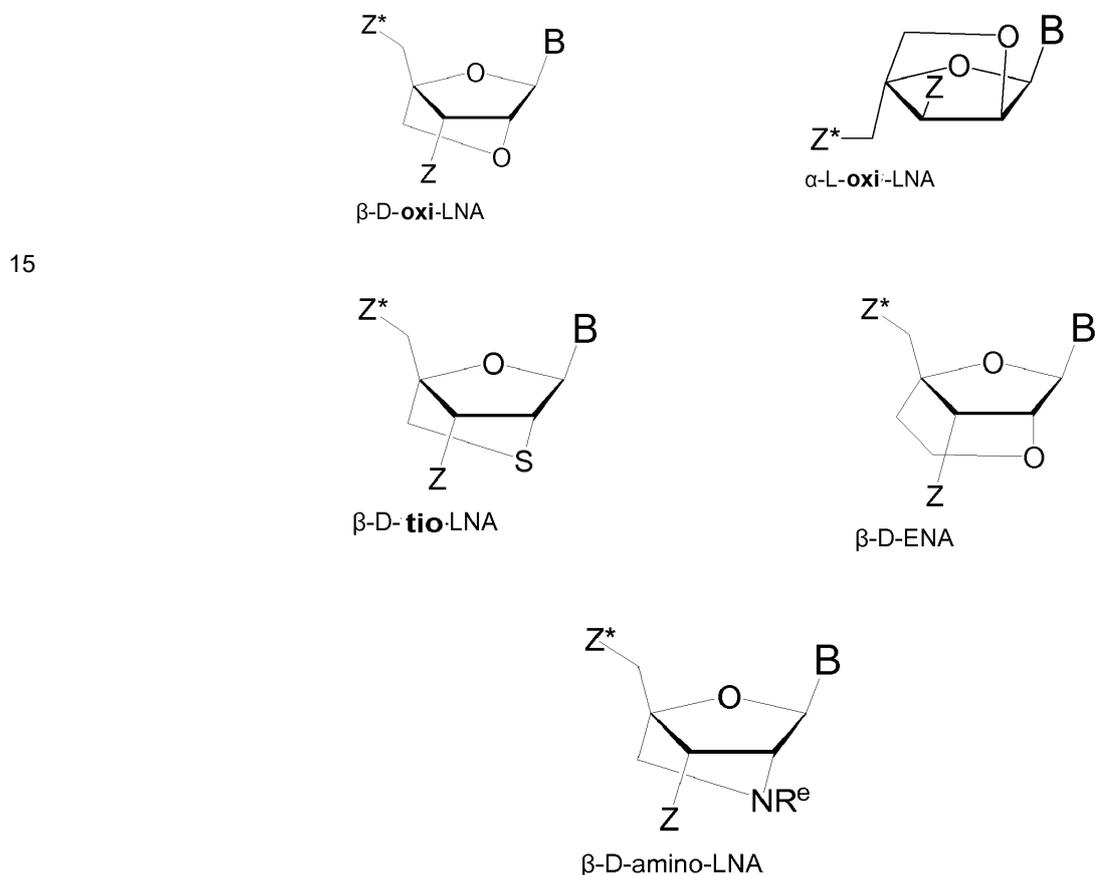
Fórmula II

en la que Y se selecciona del grupo que consiste en -O-, -CH₂O-, -S-, -NH-, N(R^e) y/o -CH₂-; Z y Z* se seleccionan independientemente entre un enlace internucleotídico, R^H, Un grupo terminal o un grupo protector; B constituye un resto de base nucleotídica (base nucleotídica) natural o no natural y R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄; R^a, R^b, R^c, R^d y R^e se seleccionan, opcionalmente de forma independiente, del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido, alquenilo C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, alquinilo C₂₋₁₂ opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxi C₁₋₁₂, alcoxi alquilo C₂₋₁₂, alquenilo C₂₋₁₂, carboxilo, alcoxicarbonilo C₁₋₁₂, alquilcarbonilo C₁₋₁₂, formilo, arilo, ariloxi-carbonilo, ariloxi, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxi-carbonilo, heteroariloxi, heteroarilcarbonilo, amino, mono- y di (alquilo C₁₋₆) amino, carbamoilo, mono- y di (alquilo C₁₋₆) amino-carbonilo, amino-alquil C₁₋₆-aminocarbonilo, mono- y di (alquilo C₁₋₆) amino-alquil C₁₋₆-aminocarbonilo, alquilo C₁₋₆-carbonilamino, carbamido, alcanoloxi C₁₋₆, sulfono, alquilsulfoniloxi C₁₋₆, nitro, azido, sulfanilo, alquilitio C₁₋₆,

5 halógeno, intercaladores de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos indicadores y ligandos, en los que arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos y en los que dos sustituyentes geminales R^a y R^b juntos pueden designar metileno opcionalmente sustituido (CH_2); y R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C_{1-4} . En algunas realizaciones, R^a , R^b , R^c , R^d y R^e se seleccionan, opcionalmente independientemente, del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C_{1-6} , tal como metilo. Para todos los centros quirales, los grupos asimétricos pueden encontrarse en orientación R o S, por ejemplo, dos isómeros estereoquímicos de ejemplo incluyen las isoformas beta-D y alfa-L, que se pueden ilustrar como sigue:



Unidades de LNA de ejemplo específicas se muestran a continuación:



20 El término "tio-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en la fórmula general anterior se selecciona de S o $-CH_2-S-$. Tio-LNA puede estar en la configuración tanto beta-D como alfa-L.

25 El término "amino-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en la fórmula general anterior se selecciona de $N(H)-$, $N(R)-$, $CH_2-N(H)-$, y $-CH_2-N(R)-$ en el que R se selecciona de hidrógeno y alquilo C_{1-4} . Amino-LNA puede estar en la configuración tanto beta-D como alfa-L.

El término "oxi-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en la fórmula general anterior representa $-O-$. Oxi-LNA puede estar en la configuración tanto beta-D como alfa-L.

30 El término "ENA" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en la fórmula general anterior es $-CH_2-O-$ (en la que el átomo de oxígeno de $-CH_2-O-$ está unido a la posición 2' con respecto a la base B). R^e es hidrógeno o metilo. En algunas realizaciones de ejemplo, LNA se selecciona de beta-D-oxi-LNA, alfa-L-oxi-LNA, beta-D-amino-LNA y

beta-D-tio-LNA, en particular beta-D-oxi-LNA.

Enlaces internucleotídicos

5 Los monómeros de los oligómeros descritos en el presente documento están acoplados entre sí a través de grupos de enlace. Adecuadamente, cada monómero está unido al monómero adyacente en 3' a través de un grupo de enlace.

10 El experto versado en la materia entenderá que, en el contexto de la presente invención, el monómero en 5' al final de un oligómero no comprende un grupo de unión en 5', aunque puede o no comprender un grupo terminal en 5'.

15 Los términos "grupo de enlace" o "enlace internucleotídico" se pretende que signifiquen un grupo capaz de acoplar covalentemente dos nucleótidos. Los ejemplos específicos y preferidos incluyen grupos fosfato y grupos fosforotioato.

Los nucleótidos del oligómero de la invención o nucleótidos contiguos de secuencia de los mismos están acoplados entre sí a través de grupos de enlace. Adecuadamente, cada monómero está unido al monómero adyacente en 3' a través de un grupo de enlace.

20 Enlaces internucleotídicos adecuados incluyen los indicados en el documento WO2007/031091, por ejemplo, los enlaces internucleotídicos indicados en el primer párrafo de la página 34 del documento WO2007/031091.

25 En algunas realizaciones, se prefiere modificar el enlace internucleotídico de su fosfodiéster normal a uno que es más resistente al ataque de la nucleasa, tales como fosforotioato o boranofosfato, estos dos, siendo escindibles por la RNasa H, también permiten la vía de la inhibición antisentido en la reducción de la expresión del gen diana.

30 En algunas realizaciones, tales como las realizaciones mencionadas anteriormente, cuando sea apropiado y no esté específicamente indicado, todos los grupos de enlace restantes son fosfodiéster o fosforotioato, o una mezcla de los mismos.

En algunas realizaciones, todos los grupos de enlace internucleotídicos son fosforotioato.

Conjugados

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

40 Por tanto, en varias realizaciones el oligómero de la invención puede comprender una región polinucleotídica que normalmente consiste en una secuencia contigua de nucleótidos y una región no nucleotídica adicional. En referencia al oligómero de la invención que consiste en una secuencia contigua de nucleótidos, el compuesto puede comprender componentes no nucleotídicos, tales como un componente conjugado.

45 En varias realizaciones de la invención, el compuesto oligomérico está unido a ligandos/conjugados, que pueden usarse para, por ejemplo, aumentar la captación celular de compuestos oligoméricos. El documento WO2007/031091 proporciona ligandos y conjugados adecuados.

50 La invención también proporciona un conjugado que comprende el compuesto de acuerdo con la invención como se describe en el presente documento y al menos un resto no nucleotídico o no polinucleotídico unido covalentemente a dicho compuesto. Por tanto, en varias realizaciones en las que el compuesto de la invención consiste en un ácido nucleico o una secuencia nucleotídica especificados, como se divulga en el presente documento, el compuesto puede comprender también al menos un resto no nucleotídico o no polinucleotídico (p. ej., que no comprende uno o más nucleótidos o análogos de nucleótidos) unido covalentemente a dicho compuesto.

55 La conjugación (a un resto conjugado) puede potenciar la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligómero de la invención. Dichos restos incluyen, entre otros, anticuerpos, polipéptidos, restos lipídicos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo hexil-s-tritilol, un tiocolésterol, una cadena alifática, por ejemplo dodecadiol o residuos de undecilo, un fosfolípido, por ejemplo di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-o-hexadecil-rac-glicero-3-h-fosfonato, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, Un ácido adamantano acético, un resto de palmitilo, una octadecilamina o un resto de hexilamino-carbonil-oxicolesterol.

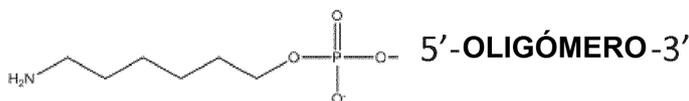
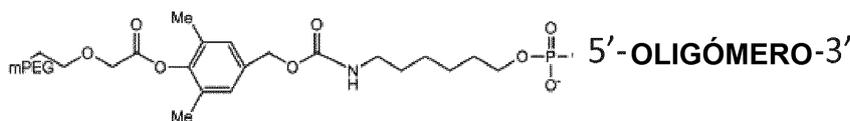
65

Los oligómeros de la invención también pueden estar conjugados con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo aspirina, ibuprofeno, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

En ciertas realizaciones, el resto conjugado es un esteroide, tal como colesterol.

En varias realizaciones, el resto conjugado comprende o consiste en un polímero cargado positivamente, tal como péptidos cargados positivamente de una longitud de, por ejemplo, de 1-50, tal como 2-20, tal como 310 residuos aminoácidos y/u óxido de polialquileno tal como polietilglicol (PEG) o polipropilenglicol, véase el documento WO 2008/034123. Idóneamente, el polímero cargado positivamente, tal como un óxido de polialquileno puede estar unido al oligómero de la invención a través de un ligador tal como el ligador liberable descrito en el documento WO 2008/034123.

A modo de ejemplo, en los conjugados de la invención se pueden usar los siguientes restos conjugados:



Oligómeros activados

La expresión "oligómero activado", como se usa en el presente documento, hace referencia a un oligómero de la invención que está unido covalentemente (es decir, funcionalizado) a al menos un resto funcional que permite la unión covalente del oligómero a uno o más restos conjugados, es decir restos que no son en sí mismos ácidos nucleicos o monómeros, para formar los conjugados descritos en el presente documento. Normalmente, un resto funcional comprenderá un grupo químico que es capaz de unirse de forma covalente al oligómero a través de, por ejemplo, un grupo 3'-hidroxilo o el grupo NH₂ exocíclico de la base adenina, un espaciador que es, preferentemente, un grupo hidrofílico y terminal que es capaz de unirse a un resto conjugado (p. ej., un grupo amino, sulfhidrilo o hidroxilo). En algunas realizaciones, este grupo terminal no está protegido, por ejemplo es un grupo NH₂. En otras realizaciones, el grupo terminal está protegido, por ejemplo mediante cualquier grupo protector adecuado tal como los descritos en 'Protective Groups in Organic Synthesis', de Theodor W. Greene y Peter G. M. Wuts, 3ª Edición (John Wiley & Sons, 1999). Ejemplos de grupos protectores hidroxilo adecuados incluyen ésteres tales como éster de acetato, grupos aralquilo tal como bencilo, difenilmetilo o trifenilmetilo y tetrahidropiraniolo. Ejemplos de grupos protectores amino adecuados incluyen bencilo, alfa-metilbencilo, difenilmetilo, trifenilmetilo, benciloxicarbonilo, terc-butoxicarbonilo y grupos acilo tales como tricloroacetilo o trifluoroacetilo. En algunas realizaciones, el resto funcional es de autoescisión. En otras realizaciones, el resto funcional es biodegradable. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 7.087.229.

En algunas realizaciones, los oligómeros de la invención están funcionalizados en el extremo 5' con el fin de permitir la unión covalente del resto conjugado al extremo 5' del oligómero. En otras realizaciones de la invención, los oligómeros de la invención pueden estar funcionalizados en el extremo 3'. En otras realizaciones más, los oligómeros de la invención pueden estar funcionalizados a lo largo de la estructura o en el resto de base heterocíclica. En otras realizaciones más, los oligómeros de la invención pueden estar funcionalizados en más de una posición seleccionada de forma independiente del extremo 5'. El extremo 3', la estructura y la base.

En algunas realizaciones, los oligómeros activados de la invención se sintetizan incorporando durante la síntesis uno o más monómeros que están unidos covalentemente a un resto funcional. En otras realizaciones, los oligómeros activados de la invención se sintetizan con monómeros que no se han funcionalizado y el oligómero se funcionaliza tras la finalización de la síntesis. En algunas realizaciones, los oligómeros están funcionalizados con un éster impedido que contiene un ligador aminoalquilo, en el que la porción alquilo tiene la fórmula (CH₂)_w, en la que w es un número entero que varía de 1 a 10, preferentemente aproximadamente 6, en el que la porción alquilo del grupo alquilamino puede ser de cadena lineal o de cadena ramificada, y en el que el grupo funcional está unido al oligómero a través de un grupo éster (-O-C(O)-(CH₂)_wNH).

En otras realizaciones, los oligómeros están funcionalizados con un éster impedido que contiene un ligador (CH₂_w-sulfhidrilo (SH), en el que w es un número entero que varía de 1 a 10, preferentemente aproximadamente 6, en el que la porción alquilo del grupo alquilamino puede ser de cadena lineal o de cadena ramificada, y en el que el grupo funcional está unido al oligómero a través de un grupo éster (-O-C(O)-(CH₂)_wNH).

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos activados por sulfhidrilo están conjugados con restos poliméricos tales como polietilenglicol o péptidos (mediante la formación de un puente disulfuro).

5 Los oligómeros activados que contienen ésteres impedidos como se ha descrito con anterioridad se pueden sintetizar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica y, en concreto, mediante procedimientos divulgados en la publicación PCT N° WO 2008/034122 y los ejemplos en la misma.

10 En otras realizaciones más, los oligómeros de la invención se funcionalizan introduciendo grupos sulfhidrilo, amino o hidroxilo en el oligómeros por medio de un reactivo de funcionalización sustancialmente como se describe en las patentes de EE.UU. N° 4.962.029 y 4.914.210, es decir un reactivo sustancialmente lineal que tiene una fosforoamidita en un extremo unida a través de una cadena espaciadorahidrofílica al extremo opuesto, que comprende un grupo sulfhidrilo, amino o hidroxilo protegido o no protegido. Dichos reactivos reaccionan principalmente con grupos hidroxilo del oligómeros. En algunas realizaciones, dichos oligómeros activados tienen un reactivo de funcionalización acoplado a un grupo 5'-hidroxilo del oligómero. En otras realizaciones, los oligómeros activados tienen un reactivo de funcionalización acoplado a un grupo 3'-hidroxilo. En otras realizaciones más, los oligómeros activados de la invención tienen un reactivo de funcionalización acoplado a un grupo hidroxilo sobre la estructura del oligómero. En otras realizaciones adicionales, el oligómeros de la invención está funcionalizado con más de uno de los reactivos de funcionalización como se describe en las patentes de EE.UU. N° 4.962.029 y 4.914.210. Procedimientos de sintetizar dichos reactivos de funcionalización y de incorporarlos en monómeros y oligómeros se divulgan en las patentes de Estados Unidos n.º 4.962.029 y 4.914.210.

25 En algunas realizaciones, el extremo 5' de un oligómeros unido en fase sólida está funcionalizado con un derivado dienilfosforoamidita, seguido de la conjugación del oligómeros desprotegido con, por ejemplo, un aminoácido o péptido mediante una reacción de cicloadición de Diels-Alder.

30 En varias realizaciones, la incorporación de monómeros que contienen modificaciones de 2'-azúcar, tal como un azúcar sustituido con 2'-carbamato o un azúcar desoxirribosa-2'-(O-fenil-N-ftalimido) en el oligómero facilita la unión covalente de restos conjugados a los azúcares de oligómero. En otras realizaciones se prepara un oligómeros con un ligador que contiene amino en la posición 2' de uno o más monómeros usando un reactivo tal como, por ejemplo, 5'-dimetoxitritil-2'-O-(*e*-ftalimidilaminopentil)-2'-desoxiadenosina-3'--N,N-diisopropil-cianoetoxi fosforoamidita. Véase, por ejemplo, Manoharan, y col., Tetrahedron Letters, 1991, 34, 7171.

35 En otras realizaciones adicionales, los oligómeros de la invención pueden tener restos funcionales que contienen amina sobre la base nucleotídica, incluido sobre los grupos amino de purina N6, sobre el N2 exocíclico de la guanina o sobre las posiciones N4 o 5 de la citosina. En varias realizaciones, dicha funcionalización se puede conseguir usando un reactivo comercial que ya está funcionalizado en la síntesis del oligómero.

40 Algunos restos funcionales están disponibles comercialmente, por ejemplo restos de unión heterobifuncional y homobifuncional están disponibles en Pierce Co. (Rockford, Ill.). Otros grupos de unión disponibles comercialmente son los reactivos 5'-amino-modificador C6 y 3'-amino-modificador, ambos disponibles en Glen Research Corporation (Sterling, Va.). El 5'-amino-modificador también está disponible en ABI (Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.) como Aminolink-2, y 3'-Amino-Modificador también está disponible en Clontech Laboratories Inc. (Palo Alto, Calif.). En algunas realizaciones En algunas realizaciones

45 *Composiciones*

50 El oligómero de la invención se puede usar en formulaciones y composiciones farmacéuticas. Adecuadamente, tales composiciones comprenden un diluyente, vehículo, sal o adyuvante farmacéuticamente aceptable. PCT/DK2006/000512 proporciona diluyentes, vehículos y adyuvantes farmacéuticamente aceptables adecuados y preferidos. Las dosis, formulaciones, vías de administración, composiciones, formas de dosificación, combinaciones con otros agentes terapéuticos, formulaciones de profármacos adecuados también se proporcionan en el documento WO2007/031091.

55 Realizaciones

1. Un método de pronóstico para determinar la idoneidad del tratamiento de un sujeto humano con infección por VHC con un inhibidor de microARN-122, comprendiendo dicho método las etapas de

60 determinar el nivel de al menos un biomarcador en la muestra de suero
comparar el nivel de la al menos una biomarcador con una o más muestras de referencia o valores de referencia,

65 para determinar si el sujeto 1 – 3 es probable que sea o es adecuado para el tratamiento de la infección por VHC con un inhibidor de microARN-122. (es decir, un probable respondedor al inhibidor de miR-122), en el que el al menos un biomarcador es microARN-122.

2. El método de acuerdo con la realización 1, en el que el inhibidor del micro-ARN-122 es un oligonucleótido

antisentido que es complementario a microARN-122 o a una subsecuencia del mismo, en toda la longitud del oligonucleótido.

3. El método de acuerdo con la realización 1 o 2, en el que el sujeto infectado con VHC no ha recibido tratamiento previo y/o es asintomático y/o ha sido diagnosticado con VHC en los 3 años anteriores.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 - 3, en el que el al menos un biomarcador es discriminatorio con la capacidad de respuesta al tratamiento de la infección por VHC.

5. El método de acuerdo con la realización 4, en el que el al menos un biomarcador es un biomarcador de la función hepática.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 - 5, en el que el al menos un biomarcador comprende además un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en: un microARN sérico, GammaGT, AST y ALT.

7. El método de acuerdo con realizaciones 1 - 6, en el que el microARN es miR-122 maduro.

8. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 - 7, en el que el nivel del biomarcador de microARN se compara con el nivel de al menos un microARN de referencia en la muestra de suero, tal como un microARN cuyos niveles son invariables en el suero.

9. El método de acuerdo con la realización 8, en el que el microARN de referencia se selecciona de uno o más del grupo que consiste en miR-17, miR-18a, miR-345 y miR-16.

10. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 - 7 en el que el al menos un biomarcador comprende además un biomarcador que es un biomarcador de la función hepática, tal como una enzima hepática.

11. El método de acuerdo con la realización 10, en el que la enzima hepática se selecciona del grupo que consiste en ASAT, ALAT, y GGT.

12. El método de acuerdo con la realización 10 u 11, en el que se determinan los niveles de al menos 2 biomarcadores de enzimas hepáticas.

13. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 - 12, en el que se determinan los niveles de al menos 2, 3, o 4 biomarcadores.

14. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 - 13, en el que se determinan los niveles de al menos 2 biomarcadores de enzimas hepáticas, así como los niveles del biomarcador de microARN 122.

15. El método de acuerdo con la realización 14, en el que se seleccionan al menos 2 biomarcadores de enzima hepática del grupo que consiste en ASAT, ALAT, y gammaGT.

16. El método de acuerdo con la realización 15, en el que el método comprende las etapas de determinar los niveles de ALAT y/o miR122 y/o GGT en la muestra de sangre, en el que una elevación de ALAT y/o miR-122, ALAT y/o GGT, o ALAT y miR-122 y/o GGT es indicativa de un sujeto que no es adecuado para el tratamiento con el inhibidor de miR-122.

17. El método de acuerdo con la realización 15 o 16, en el que el método comprende las etapas de determinar los niveles de ALAT y/o miR122 y/o GGT en la muestra de sangre, en el que una elevación de ALAT y/o miR-122, ALAT y/o GGT, o ALAT y miR-122 y/o GGT es indicativa de un sujeto que no es adecuado para el tratamiento con el inhibidor de miR-122 (un respondedor [probable]).

18. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 - 17, en el que la muestra o valor de referencia se obtiene a partir de uno o más sujetos que no están infectados con el VHC, tal como un valor promedio de una población comparativa sana no infectada por el VHC.

19. Un kit de pronóstico para uso como un diagnóstico in vitro, comprendiendo dicho kit un ensayo de cuantificación para miR-122 humano y al menos un ensayo de cuantificación más durante al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en GammaGT, ASAT y ALAT.

20. Un método de determinación de la dosis eficaz probable de un agente inhibidor de miR-122, tal como miravirsén, para la administración a un sujeto con infección por el VHC, comprendiendo dicho método

i) determinar el nivel de al menos un biomarcador en la muestra de sangre

ii) comparar el nivel de la al menos una biomarcador con una o más muestras de referencia o valores de referencia,

para determinar la dosis eficaz probable del inhibidor de microARN-122 para la administración al sujeto con el fin de aliviar la infección por VHC, en la que el al menos un biomarcador es microARN-122.

21. Una sonda de detección para microARN-122, para su uso como compañero de diagnóstico para una terapéutica del VHC, tal como un inhibidor de microARN-122.

22. La sonda de detección de acuerdo con la realización 21, en la que la sonda es para su uso en un ensayo pronóstico para determinar la idoneidad de un sujeto en necesidad de tratamiento de VHC (por ejemplo crónica) para el tratamiento con el agente terapéutico del VHC.

23. La sonda de detección de acuerdo con la realización 21 o 22 en la que el nivel de microARN específico del hígado en suero se correlaciona de forma inversa con la idoneidad de la materia para el tratamiento.

Ejemplos

Ensayos de biomarcadores de transaminasas:

Los protocolos de biomarcadores utilizados para la medición de ALT fue el ensayo de Advia Chemistry Systems ALT assay (03903166 Rev. B 2007–05); el protocolo para la medición de ALT fue el ensayo de ALT Advia Chemistry Systems ALT assay (03815151 Rev. B 2007–05), el protocolo para la medición de la GGT fue el ensayo de Advia Chemistry Systems ALT assay (04130756 Rev. B 2007–05).

5 Los microARN se detectaron utilizando ensayos TaqMan de ABI. Ejemplos de proveedores alternativos de microARN se proporcionan en el presente documento e incluyen, por ejemplo, reactivos Exiqon A/S mercury LNA®.

Ejemplo 1: clasificación de la respuesta virológica al tratamiento con miravirsén

10 Se realizó un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo de varias dosis ascendentes de Fase 2a con 36 pacientes no tratados previamente con infección crónica por VHC de genotipo 1. Los pacientes se reclutaron de forma secuencial a una de tres cohortes (9 fármaco activo: 3 placebo por cohorte). Miravirsén se administró como inyecciones subcutáneas semanales, durante 29 días (5 inyecciones en total), en dosis de 3 mg/kg en la cohorte 1, 5 mg/kg en la cohorte 2, y 7 mg/kg en la cohorte 3.

15 De todos los pacientes incluidos en el estudio, se tomaron muestras de sangre dos veces antes del inicio del tratamiento: en una visita de selección para evaluar la idoneidad para su inclusión en el estudio, y en la visita basal justo antes de la primera dosis de tratamiento. Después de iniciar el tratamiento, se tomaron muestras de sangre semanalmente, hasta, e incluyendo, la semana 18 después de la primera dosis de tratamiento.

20 Se aisló el suero de cada muestra y el título viral del VHC se cuantificó mediante la evaluación de los niveles de ARN de VHC utilizando QRT-PCR en las muestras.

25 La respuesta al tratamiento con miravirsén en cada paciente se clasifica en una escala de 0 a 4. Este grado se asigna en base a la máxima reducción de log en base 10 del ARN del VHC en comparación con el valor basal.

Específicamente,

- 30 (i) Grado 0: disminución menor de 1 log
 (ii) Grado 1: disminución de más de 1 log y de menos de 2 log
 (iii) Grado 2: disminución de más de 2 log y de menos de 3 log
 (iv) Grado 3: disminución de más de 3 log y de menos de 4 log
 (v) Grado 4: disminución de más de 4 log

35 Algunos pacientes no completaron el período completo de estudio de 18 semanas, sino que salieron del estudio antes de tiempo por varias razones. Además, en la cohorte 3, no todos los pacientes alcanzaron la semana 18 en el momento de redactar este texto. Dado que el grado de respuesta para un paciente dado se basa en la respuesta máxima observada durante todo el período de estudio para ese paciente, los inventores se preguntaron si los diferentes periodos de estudio sesgarían el grado de respuesta. Con este fin, se evaluó si existe tal conexión entre el grado de respuesta y el período de estudio (es decir, número de semanas completas). La figura 1 muestra los diagramas de caja de los grados de respuesta como una función del número de semanas completadas. Como puede apreciarse en la Figura 1, no hay conexión entre el grado de respuesta y el período de estudio. Esto demuestra que el grado no está sesgado por los períodos de estudio más cortos de 18 semanas para un subconjunto de los pacientes.

45 El comité asesor de productos antivirales de la FDA define respondedores nulos al tratamiento de la infección crónica por hepatitis C a los pacientes con reducción $< 1 \log_{10}$ en el ARN del VHC en la semana 12 (Sherman et al., 2007 Hepatology Vol. 46 No. 6). Del mismo modo, los respondedores parciales se definen como Reducción > 1 pero $< 2 \log_{10}$ del ARN del VHC a las 12 semanas. Para la comparación, el grado 0 tal como se define en el presente documento, es, por tanto, un subconjunto de los respondedores nulos y el grado 1 es un subconjunto de los respondedores parciales.

Ejemplo 2: Dependencia del grado de respuesta en el nivel de dosis de miravirsén

55 A continuación, se planteó la hipótesis de que la respuesta virológica al tratamiento con miravirsén cuantificada por la simple clasificación de cinco niveles presentados en el Ejemplo 1, podría depender del nivel de dosis del compuesto.

60 Por lo tanto, para los tres niveles de dosis utilizadas en el estudio de fase 2 bis (ejemplo 1), se evaluó si existía una asociación entre el grado de respuesta y nivel de dosis.

65 Para cada grado de respuesta, el número de pacientes en cada nivel de dosis se muestra en la Figura 2A. En los grados más bajos (0 y 1), el nivel de dosis de 3 mg/kg está sobrerrepresentado. Por el contrario, en los altos grados (3 y 4), no hay niveles de dosis de 3 mg/kg. La comparación de los niveles de dosis de 5 y 7 mg/kg no muestra ninguna diferencia clara. El análisis estadístico de estos datos mediante la prueba exacta de Fisher confirma que no hay diferencia significativa en los grados de respuesta entre los niveles de dosis de 5 y 7 mg/kg ($P = 0,78$). Si

agrupamos los niveles de dosis 5 y 7 mg/kg y se compara con la dosificación de 3 mg/kg, la distribución de los grados de respuesta están en el límite significativamente diferentes ($P = 0,09$).

La distribución de los grados de respuesta como una función de la dosis de tratamiento se presenta también como una tabla de contingencia en la figura 2B. Aquí, los grados de respuesta se agrupan en 0 y 1 frente a 2, 3, y 4, y las dosis de tratamiento a 3 mg/kg en comparación con 5 y 7 mg/kg, para tener suficientes pacientes en cada combinación de dosis-respuesta al tratamiento. Como se ve, la mayoría de los grados de respuesta (2, 3 y 4) se alcanzan con las altas dosis de tratamiento (5 y 7 mg/kg). Esta asociación entre la dosis de tratamiento y el grado de respuesta es estadísticamente significativa ($p < 0,05$ por la prueba exacta de Fisher).

Ambos enfoques implican que al menos algunos de los malos respondedores (grado 0) a los que se ha dado la dosis baja de 3 mg/kg podrían mostrar una respuesta si dosificado con concentraciones más altas de miravirsén. Por consiguiente, los inventores han concluido que los 3 pacientes a los que se han administrado las dosis de 5 o 7 mg/kg con un grado 0 (véase la Figura 2A) representan más claramente pacientes que responden mal al tratamiento con miravirsén.

Ejemplo 3: Medición de biomarcadores en muestras de suero en la selección y basales de pacientes con VHC

Se extrajo sangre de todos los pacientes incluidos en el estudio clínico de fase 2a descrito en el ejemplo 1 se en el momento de la selección (para evaluar la inclusión/exclusión en el estudio) y en el momento basal (antes de la primera dosis de tratamiento). Había entre 6 y 34 días entre la obtención de muestras en la selección y basal para un paciente dado, siendo la diferencia un promedio de de 20 +/- 6 días.

Para cada muestra, se evaluaron 40 observables diferentes. Estos incluyeron mediciones de biomarcadores, así como las pruebas de función realizadas por dos laboratorios de química clínica, excepto para la cuantificación de microARN que la realizó (Austin, Texas, EE.UU.), véase la Tabla 1.

Tabla 1. *Observables medidos en cada muestra.* Para cada observable se indican los límites inferior y superior del intervalo normal (para varones y mujeres individualmente cuando sea pertinente), así como la unidad en la que se informa de la medición.

Observable	Sexo*	Límite inferior de la normalidad **	Límite superior de la normalidad **	Unidad
ALAT (SGPT)	M y V	0	69	U _l
Albúmina	M y V	34	52	g _l
Fosfatasa alcalina	F	46	129	U _l
Fosfatasa alcalina	M	58	141	U _l
APA1	M y V	101	203	mg/dl
APOB	M y V	60	170	mg/dl
APTT	M y V	24	45	s
ASAT (SGOT)	M y V	0	52	U _l
B2-microglobulina	M y V	0	300	ng/ml
Basófilos	M y V	0	0,2	10 ⁹ /l
Bilirrubina (conjugado)	M y V	0	7	umol/l
Bilirrubina (total)	M y V	0	30	umol/l
BUN (urea)	F	0	8,1	mmol/l
BUN (urea)	M	0	9,6	mmol/l
Ca (calcio)	M y V	2,21	2,63	mmol/l
Colesterol	M y V	0	6,5	mmol/l
Cl (cloruro)	M y V	99	110	mmol/l
Cockcroft y Gault	M y V	70	160	ml/min
Creatinina	F	0	115	umol/l
Creatinina	M	0	124	umol/l
Eosinófilos	M y V	0	0,6	10 ⁹ /l
Factor VII	M y V	50	150	%
GammaGT	F	0	50	U _l
GammaGT	M	0	79	U _l
Globulina	M y V	20	40	g _l
Glucosa	M y V	0	6,2	mmol/l
Hemoglobina	F	7,3	9,5	mmol/l
Hemoglobina	M	8,1	11,2	mmol/l
ARN del VHC	M y V	0		UI/ ml
Hematocrito	F	0,34	0,47	L/l
Hematocrito	M	0,38	0,52	L/l
Fosfato inorgánico	M y V	0,8	1,5	mmol/l
K (potasio)	M y V	3,6	5,2	mmol/l
LDH	M y V	0	275	U _l

Observable	Sexo*	Límite inferior de la normalidad **	Límite superior de la normalidad **	Unidad
Recuento leucocitos	de M y V	3,8	11	10 ⁹ /l
Linfocitos	M y V	1	4,8	10 ⁹ /l
Monocitos	M y V	0	0,9	10 ⁹ /l
Na (sodio)	M y V	137	147	mmol/l
Neutrófilos	M y V	1,4	8,2	10 ⁹ /l
Recuento plaquetas	de M y V	150	400	10 ⁹ /l
Proteína (total)	M y V	63	85	g/l
PT	M y V	10	15	s
PT (INR)	M y V	0,85	3,5	
PH en orina	M y V	5	8	
Densidad en orina específica	M y V	1,003	1,035	kg/l
microARN-122	M y V	-2,4	1,0	ciclos

* M: Mujer, V: varón

** definido como la media +/- 2 desviaciones estándar. Cuando se indican las diferencias entre los intervalos estándar del laboratorio de Europa y de Estados Unidos, se eligió el intervalo máximo. Para miR-122, se calcularon los intervalos estándar como se describe en el ejemplo.

Se realizaron las mediciones de laboratorio de química clínica como se describe en otro lugar.

5 Las mediciones de microARN se realizaron solo muestras de suero basales. En resumen, se extrajo el ARN de cada muestra de suero utilizando el método de extracción establecido por el Asuragen's Pharmacogenomics Services Group. En cada muestra de ARN, los niveles de miR-122, miR-17 y miR-18a se midieron mediante qRT-PCR. Estas mediciones se llevaron a cabo como un procedimiento RT-PCR de dos etapas utilizando ensayos TaqMan Small RNA Assays (Applied Biosystems; Foster City, C, EE.UU.). La primera etapa implicó la síntesis de ADNc a partir de ARN total utilizando un cebador de transcriptasa inversa de tallo-bucle específica de la diana, lo que da lugar a la generación de un amplicón quimérico de miARN/RT-cebador. En el segundo paso, este amplicón se amplificó en un ensayo estándar de PCR en tiempo real TaqMan utilizando cebadores directos e inversos específicos. Además de los cebadores, se usó una sonda TaqMan marcada con fluorescencia y específica del amplicón para controlar el aumento de la cantidad de amplicón a medida que avanzaba la PCR. El número ciclo en el cual la señal de fluorescencia de la sonda TaqMan excede un valor umbral por encima del ruido, que se define como el valor Ct, se utiliza como una medida de la concentración original de ADNc en la muestra (cuanto menor es el valor de Ct, menos ciclos han sido necesarios para amplificar la señal por encima del ruido, y más material de ADNc de partida debe haber habido). En un estudio independiente, se ha identificado que miR-17 y miR-18a se expresan de forma estable entre los pacientes infectados por el VHC y los sujetos control sanos. Por lo tanto, se realizó un promedio de los valores de Ct para miR-17 y miR-18a (Ct medio de de miR-17 y miR-18a), y se restó el valor Ct de miR-122 de dicho valor medio. Esto establece un valor dCt de miR-122 que es comparable en todas las muestras de suero, DCT (miR-122) = (Ct (miR-17) + Ct (miR-18a))/2 - Ct (miR-122). Específicamente, cuanto mayor es el valor de dCt, mayor es la expresión de miR-122 en la muestra.

25 Para evaluar la solidez con el tiempo, para cada observable en cada muestra, se evaluó la relación entre las mediciones de la selección y basal. En concreto, para cada observable, se calculó la correlación entre las medidas de detección y basal detallados en los pacientes. Los resultados se muestran en la Tabla 2, primeras dos columnas. Como se ve, 20 de los observables muestran una fuerte y significativa correlación ($r \geq 0,7$, $P < 0,0001$) entre las mediciones en la selección y basales, y 6 observables muestran una correlación débil o ausente ($r < 0,4$, $P > 0,01$).
 30 Tabla 2. *Comparación de las mediciones en la selección y basal.* Para dichos 33 observables que se midieron en todos los pacientes, en los momentos tanto de selección como basal, se enumeran dos comparaciones. En las columnas 1 y 2 se muestran para cada observable el coeficiente de correlación y su significado asociado al comparar los valores de detección y basales en los pacientes (prueba de correlación de Spearman). En la columna 3 se muestra la importancia en la evaluación de la diferencia en los promedios en el momento de selección y basal (prueba del rango con signo de Wilcoxon).

35

Además de la correlación, también se evaluaron los cambios generales en los valores medidos en los tiempos de selección y basal. La importancia de este cambio en los valores se indica en la columna 3 de la Tabla 2. Solo el hematocrito, la hemoglobina, y el calcio (significación marginal) son juzgados como que muestran un cambio global en el valor ($P < 0,005$).

Observable	r	P (correlación)	P (wilcoxon)
Cockcroft y Gault	0,93	1,20 E-14	0,95
Globulina	0,91	3,00 E-14	0,13
Colesterol	0,9	1,00 E-13	0,017
Fosfatasa alcalina	0,87	8,50 E-12	0,44

Además de la correlación, también se evaluaron los cambios generales en los valores medidos en los tiempos de selección y basal. La importancia de este cambio en los valores se indica en la columna 3 de la Tabla 2. Solo el hematocrito, la hemoglobina, y el calcio (significación marginal) son juzgados como que muestran un cambio global en el valor ($P < 0,005$).

Observable	r	P (correlación)	P (wilcoxon)
ARN del VHC	0,87	8,10 E-12	0,21
GammaGT	0,84	1,70 E-10	0,76
Recuento de plaquetas	0,84	4,20 E-10	0,41
ALAT (SGPT)	0,83	2,50 E-10	0,8
ASAT (SGOT)	0,81	1,60 E-09	0,56
Hemoglobina	0,81	3,20 E-09	0,0018
Proteína (total)	0,78	2,60 E-08	0,032
Creatinina	0,77	3,60 E-08	0,27
Monocitos	0,75	1,70 E-07	0,32
Hematocrito	0,75	2,80 E-07	5,70 E-05
Bilirrubina (conjugado)	0,74	2,90 E-07	0,54
LDH	0,71	1,50 E-06	0,3
PT	0,7	2,10 E-06	0,31
Recuento de leucocitos	0,7	2,40 E-06	0,32
Bilirrubina (total)	0,7	1,80 E-06	1
Linfocitos	0,7	2,80 E-06	0,25
APTT	0,62	6,30 E-05	0,39
Neutrófilos	0,62	0,00017	0,76
Albúmina	0,62	5,50 E-05	0,021
BUN (urea)	0,62	6,30 E-05	0,043
Eosinófilos	0,6	0,00013	0,52
Ca (calcio)	0,52	0,001	0,0051
Cl (cloruro)	0,4	0,016	0,15
K (potasio)	0,4	0,016	0,027
Densidad específica en orina	0,32	0,061	0,3
PH en orina	0,24	0,15	0,17
Basófilos	0,23	0,18	0,85
Glucosa	0,15	0,37	0,34

Ejemplo 4: Identificación de asociaciones entre los niveles basales de los observables y el grado de respuesta a miravirsén

5 Se identificaron asociaciones entre los niveles basales de los observables (véase el ejemplo 3) y la respuesta al tratamiento con miravirsén (véase el ejemplo 1) utilizando dos abordajes: bien mediante una diferencia significativa en los niveles promedio de medición entre los respondedores malos (grado 0) y el resto (grados 1 -4), tal como se evaluó mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon, o por una correlación significativa entre los niveles de medición y el grado de respuesta, tal como se evaluó mediante la prueba de correlación de Spearman.

10 Se incluyen pacientes de las tres cohortes en este análisis, a pesar de que algunos de los respondedores de grado 0 en el grupo de dosis baja podrían haber mostrado una respuesta de grado superior si se les hubiera administrado una dosis más alta (véase el ejemplo 2).

15 De los 40 observables para los se dispone de datos basales, los cuatro asociados más significativamente con el grado de respuesta evaluados por la prueba de correlación de rangos y/o de suma de rangos y también mostraron una alta concordancia entre los valores en los momentos de selección y basal ($r > 0,8$, véase el ejemplo 3), eran de miR-122, GGT, ALAT, ASAT y, véase la figura 3 y la tabla 3.

20 Tabla 3. *Asociaciones significativas entre los observables y los grados de respuesta. Significación de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (en relación con los gráficos de barras en la figura 3) y resultados de la prueba de correlación de Spearman (en relación con los diagramas de dispersión en la figura 3). Solo se muestran los 5 primeros.*

Observable	P (wilcoxon)	r	P (correlación)
miR-122	0,005	-0,48	0,01
PT	0,14	0,44	0,02
GGT	0,31	-0,39	0,05
ALAT	0,05	-0,35	0,07
ASAT	0,13	-0,30	0,12

25 Estos cuatro observables se han comunicado todos ellos como biomarcadores séricos de la función hepática o de enfermedad/daño hepática (para ALAT, ASAT y GGT, bien conocido para miR-122, véase Bihrer et al., 2011, Am. J.

Gastroenterol, vol. 106, No.

Además, se identificó que el PT tenía una correlación significativa con la respuesta (tabla 3).

5 Además, para todos los observables medidos, se calcularon correlaciones pareadas. A partir de esto, se agruparon los observables en función del grado de correlación positiva entre ellos, véase la Figura 4 a continuación. Como se ve, miR-122, GGT (GammaGT), racimo ALAT, ASAT se agrupa juntos debido a las correlaciones pareadas sueltas (correlaciones pareadas promedio $r = 0,46$).

10 *Ejemplo 5: Construcción de un clasificador de pronóstico*

En el ejemplo 4 (a) se identificaron asociaciones significativas entre los parámetros de la función hepática, específicamente los niveles de cada uno de los observables ALAT, ASAT, GGT, y miR-122, y el grado de respuesta al tratamiento con miravirsén. Además, (b) se mostró que estos cuatro biomarcadores se correlacionaban entre sí, pero solo débilmente. Por último, en el ejemplo 3 (c) se mostró que para ALAT, ASAT, GGT, donde se dispone también de mediciones de tiempo de selección, en la mayoría de los pacientes la medición en la selección y basal fueron muy similares. Estas tres propiedades, (a) de significación, (b) independencia, y (c) solidez motivaron la exploración de la utilidad de uno o más de estos observables para establecer una predicción precisa del grado de respuesta.

El método de predicción de los inventores se construye por medio de un algoritmo de clasificación conocido como árbol de decisión (Duda, Hart, y Stork, Pattern Classification, Wiley-Interscience; Segunda edición, 2000), específicamente un árbol de decisión binario.

Un árbol de decisión binario puede entenderse como una secuencia de preguntas, o decisiones, en la que la próxima pregunta depende de la respuesta, sí o no, a la pregunta actual. Tal secuencia de decisiones estar representada en una estructura de árbol que consiste en nodos (las preguntas) conectados por ramas (las respuestas) que conducen a otros nodos. Por convención, el primer nodo (primera pregunta) se muestra en la parte superior, de modo que el árbol está al revés.

En este caso, para una muestra dada en la que ALAT, ASAT, GGT, y miR-122 se han medido, la clasificación por el árbol de decisión binario progresa como una secuencia de preguntas, donde cada pregunta evalúa si uno o más de estos observables es igual o se encuentra por encima, un determinado valor de corte. Este esquema es análogo al proceso de estudio diagnóstico del patólogo, en el que una muestra se le asigna a los subgrupos cada vez más finos a través de una serie de pruebas de diagnóstico diferencial. Un ejemplo específico se muestra en la Fig. 5.

La razón fundamental para la estructura de árbol en la Figura 5 se presenta en la Figura 6. Las mediciones de ALAT y ASAT (expresadas en relación con el límite superior de la normalidad, véase el ejemplo 3) para todos los pacientes tratados con miravirsén se representan. Todos los pacientes con ALAT <1 y ASAT <1 (líneas discontinuas en la figura 6^a), respondieron al tratamiento (respuesta de grado > 0). Esta observación es capturada por la primera pregunta (nodo raíz) en la Figura 5. En la figura 6B se muestran únicamente los 13 pacientes que no tenían ALAT <1 y ASAT <1 . Para estos pacientes, las mediciones de miR-122 y GGT se representan uno frente al otro. Para miR-122 $<2,82$ y GGT $<4,87$ (líneas discontinuas en la Fig. 6B), los pacientes restantes están completamente separados en los que responden y los que no responden, al tratamiento con miravirsén. Esta observación es capturada por la segunda pregunta en la Figura 5.

Este modelo de clasificación implica que los pacientes que respondieron mal, o nada en absoluto, al tratamiento con miravirsén, tienen una función hepática alterada o daños en el hígado: presentan niveles elevados de ALAT y/o ASAT, en comparación con el límite superior de la normalidad, y niveles muy elevados de miR-122 y/o GGT, en comparación con el límite superior de la normalidad.

Ejemplo 6: Entrenamiento y pruebas del clasificador

Volviendo ahora a la cuestión de la utilización de datos de entrenamiento para crear o "crecer" un árbol de decisión. Cualquier árbol de decisión dividirá progresivamente las muestras en subconjuntos más pequeños y más pequeños. Lo ideal sería que cada subconjunto debe contener, en última instancia, muestras asignadas al mismo marcador (por ejemplo, grado 0). También, preferiblemente, solo una o pocos subconjuntos deben contener muestras con cualquier marcador determinado. Finalmente, se prefiere un árbol simple, compacto, en referencia a la observación general de que el modelo más sencillo que explica los datos es generalmente el que preferir.

Se han propuesto varias medidas diferentes matemáticas que optimizan la "pureza" de un solo marcador en los subgrupos después de una división (Duda, Hart, y Stork, Pattern Classification, Wiley-Interscience; 2^a edición, 2000). Un ejemplo es la medida de la varianza con impureza $i(N) = P_1 P_2$, en la que P_j es la fracción de las muestras en el nodo N que tienen marcador usando esta medida, el observable en un punto de corte dado que maximiza la caída de la impureza después de la división, $\Delta i(N)$. Se puede encontrar mediante búsqueda exhaustiva en combinación con algoritmos de gradiente descendente. Aquí, la caída de la impureza $\Delta i(N)$ Se define como $\Delta i(N) =$

$i(N) = P_L i(N_L) + (1 - P_L) i(N_R)$, donde N_L y N_R son los nodos descendientes izquierda y derecha, $i(N_L)$ y $i(N_R)$ son sus impurezas, y P_L es la fracción de los patrones en el nodo N que se destinarán a N_L cuando un determinado observable y se utiliza de corte.

5 Estas medidas funcionan mejor cuando los datos de entrenamiento son representativos de todas las mediciones de biomarcadores que el clasificador se encontrará cuando se analice. En la práctica esto significa que el número de pacientes incluidos en los datos de entrenamiento debe ser lo suficientemente alto para que sea posible eliminar una fracción de pacientes en los datos de formación, por ejemplo 5 -10%, sin que afecten significativamente a la estructura y los puntos de corte en el árbol. De este modo, se dice que dicho árbol entrenado es robusto.

10 Una estimación objetiva del rendimiento predictivo (precisión, especificidad, sensibilidad, etc.) de un clasificador entrenado de forma robusta se puede establecer mediante un nuevo conjunto independiente de pacientes; los datos de prueba. Todavía más importante, los datos de prueba no deben haberse usado de ninguna forma para entrenar al clasificador.

15 Los biomarcadores incluidos en un árbol entrenado de forma tan sólida por los métodos descritos en el presente documento, así como los valores de corte identificados, pueden aceptarse como generalmente predictivos cuando se consigue un alto grado de precisión al aplicar el clasificador a un conjunto independiente de pacientes.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Santaris Pharma A/S

<120> TRATAMIENTO DIRIGIDO DE HCV Y MÉTODOS DE PRONÓSTICO

<130> 1133WO

<150> US 61/556313

<151> 07-11-2011

<160>3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 85

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ccuuagcaga gcuguggagu gugacaaugg uguuuuguguc uaaacuauca aacgccauua 60

ucacacuaaaa uagcuacugc uaggc 85

<210>2

<211> 23

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

uggaguguga caaugguguu ugu 23

<210> 3

<211> 15

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de LNA Miravirsen

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(15)

<223> Enlaces fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-metil citosina de LNA
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Adenosina de LNA
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Guanina de LNA
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Timina de LNA
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 5-metil citosina de LNA
 25
 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-metil citosina de LNA
 30
 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-metil citosina de LNA
 35
 <400>3
 ccattgtcac actcc 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de pronóstico para determinar la idoneidad del tratamiento de un sujeto humano con infección por VHC con un inhibidor de microARN-122, comprendiendo dicho método las etapas de:
- i) determinar el nivel de al menos un biomarcador en una muestra de suero obtenida de dicho sujeto humano;
 - ii) comparar el nivel de al menos un biomarcador con una o más muestras de referencia o valores de referencia;
- 10 para determinar si el sujeto es probable que sea, o es, adecuado para el tratamiento de la infección por VHC con un inhibidor de microARN-122 (es decir, un probable respondedor al inhibidor de miR-122), en el que el al menos un biomarcador es microARN-122.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el inhibidor del micro-ARN-122 es un oligonucleótido antisentido que es complementario a microARN-122 o a una subsecuencia del mismo, en toda la longitud del oligonucleótido.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido de LNA.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el oligonucleótido antisentido es miravirsén.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el sujeto infectado con VHC no ha recibido tratamiento previo y/o es asintomático y/o ha sido diagnosticado con VHC en los 3 años anteriores.
- 25 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la etapa i) del método de pronóstico comprende además la etapa de determinar el nivel de al menos otro biomarcador en la muestra de suero obtenida de dicho sujeto humano y comparar el nivel del al menos otro biomarcador con una o más muestras de referencia o valores de referencia, en el que el al menos otro biomarcador es un biomarcador de enzima hepática seleccionado del grupo que consiste en GammaGT, ASAT y ALAT.
- 30 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el al menos otro biomarcador es ASAT.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el al menos otro biomarcador es ALAT.
- 35 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el al menos otro biomarcador es GammaGT.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que se determinan los niveles de al menos 2 de los biomarcadores enzimáticos.
- 40 11. El uso *in vitro* de una sonda de detección para microARN-122 como un ensayo de pronóstico para determinar la idoneidad de un sujeto en necesidad de tratamiento para el VHC (por ejemplo, crónico), para el tratamiento con un agente terapéutico del VHC, tal como un inhibidor de microARN-122.
- 45 12. Un kit que comprende la sonda de detección de acuerdo con la reivindicación 11, para su uso como un diagnóstico *in vitro* para determinar la idoneidad de un sujeto en necesidad de tratamiento para el tratamiento del VHC (por ejemplo, crónico) con un agente terapéutico del VHC, comprendiendo dicho kit un ensayo de cuantificación para miR-122 humano y al menos un ensayo de cuantificación más para el al menos otro biomarcador seleccionado del grupo que consiste en GammaGT, ASAT y ALAT.
- 50 13. Un método de determinación de la dosis eficaz probable de un agente inhibidor de miR-122, para la administración a un sujeto con infección por el VHC, comprendiendo dicho método las etapas de
- i) determinar el nivel de al menos un biomarcador en la muestra de sangre obtenida del sujeto humano infectado por el VHC;
 - ii) comparar el nivel de la al menos una biomarcador con una o más muestras de referencia o valores de referencia,
- 55 para determinar la dosis eficaz probable del inhibidor de microARN-122 para la administración al sujeto con el fin de aliviar la infección por VHC, en la que el al menos un biomarcador es microARN-122.
- 60 14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el agente inhibidor de miR-122 es un oligonucleótido de LNA.
- 65 15. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el agente inhibidor de miR-122 es miravirsén.

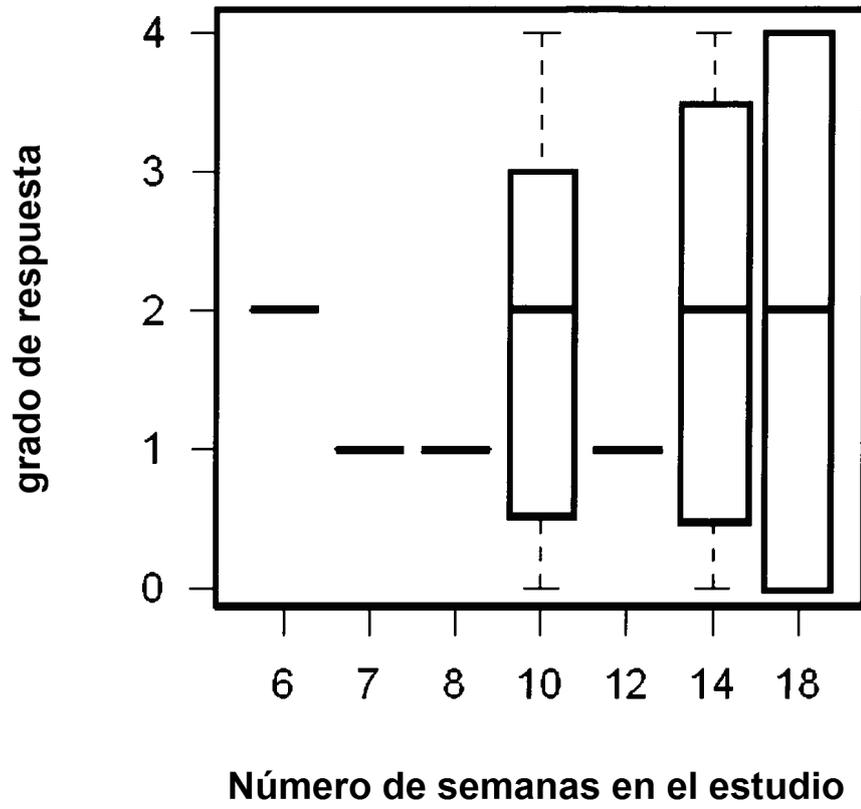
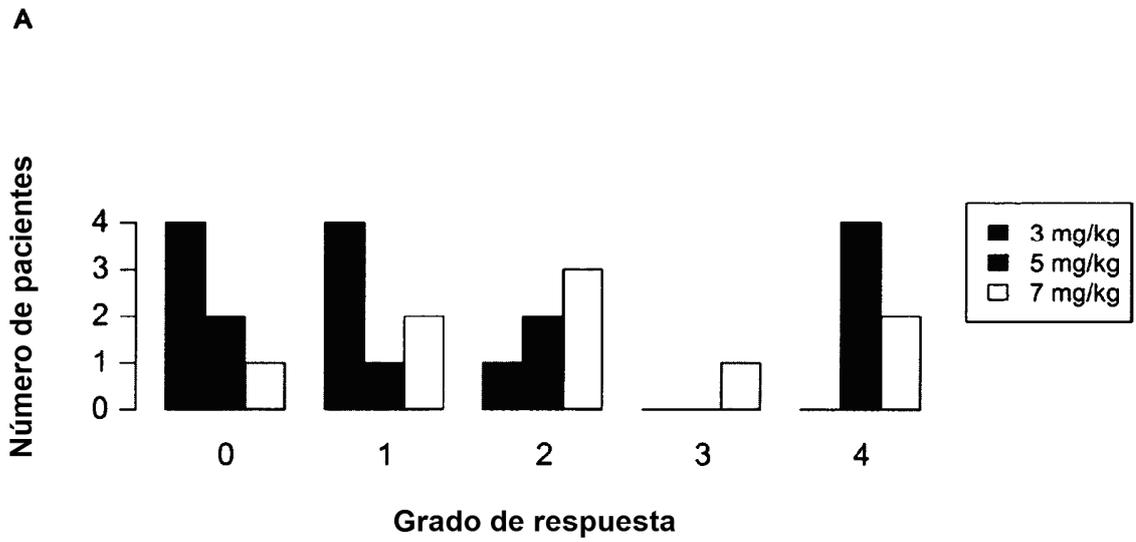


Figura 1



B

Dosis de tratamiento	Grado de respuesta	
	0 o 1	2, 3 o 4
3 mg/kg	8	1
5 o 7 mg/kg	6	12

$P = 0,01$

Figura 2

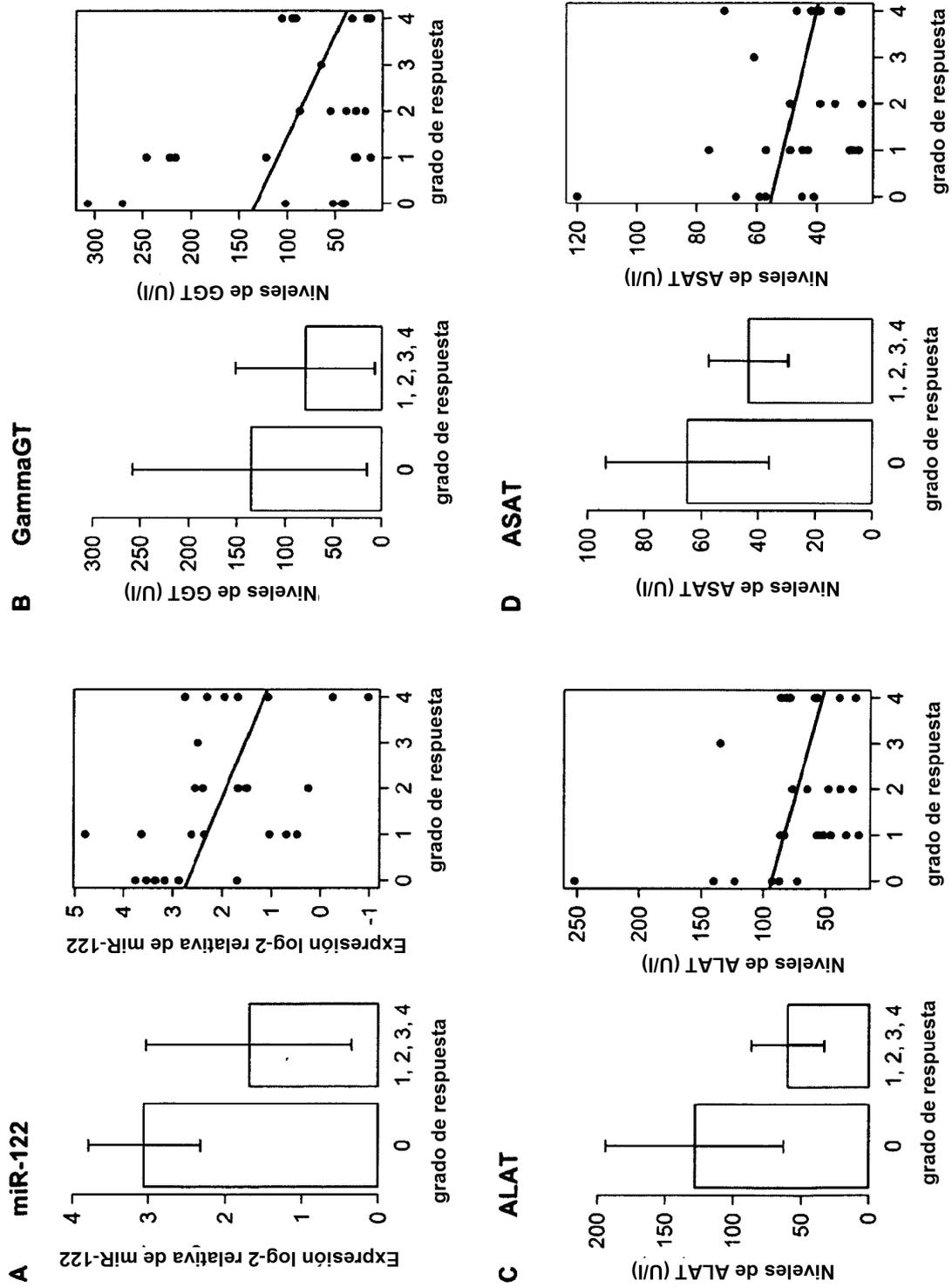


Figura 3

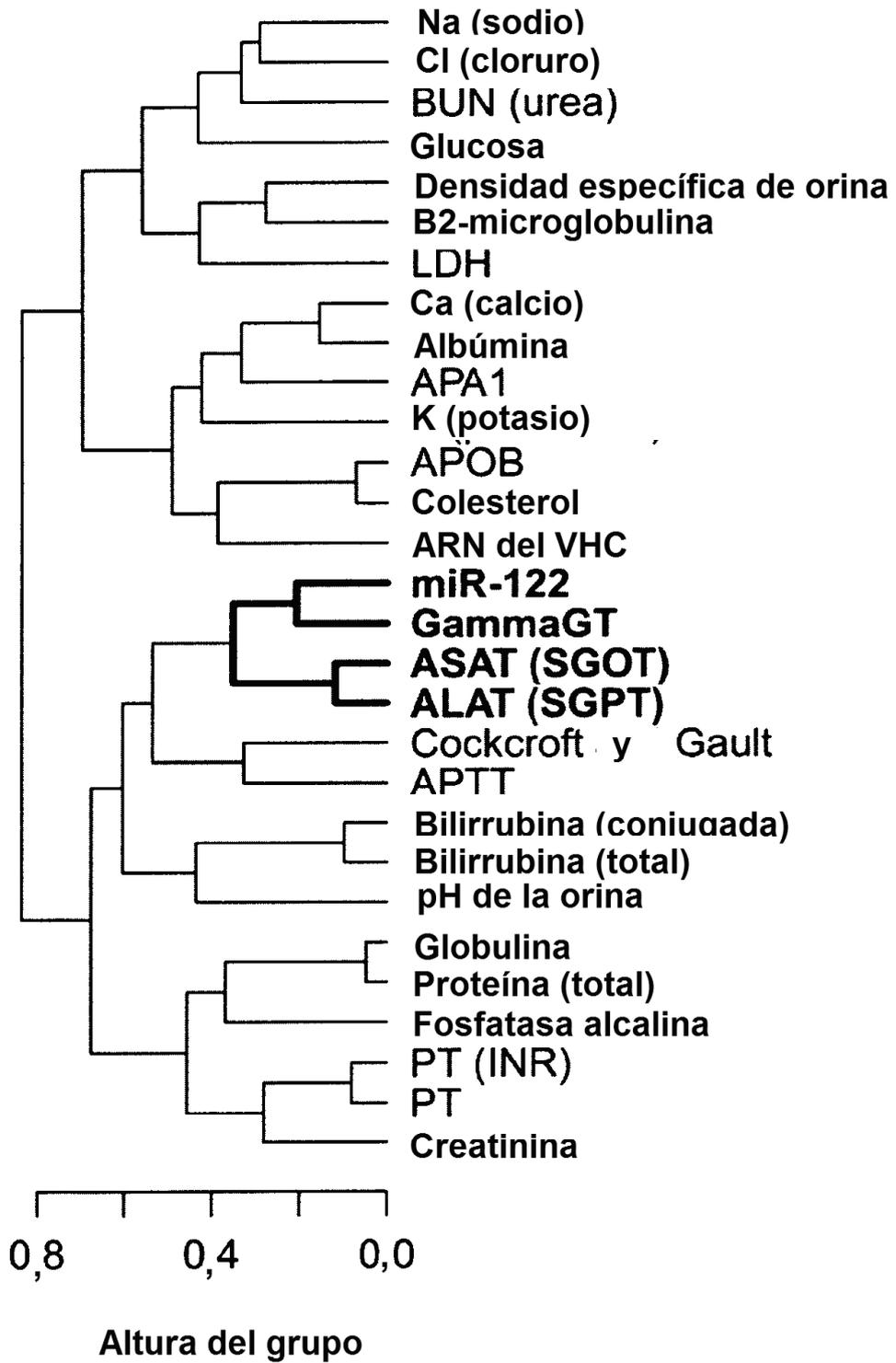


Figura 4

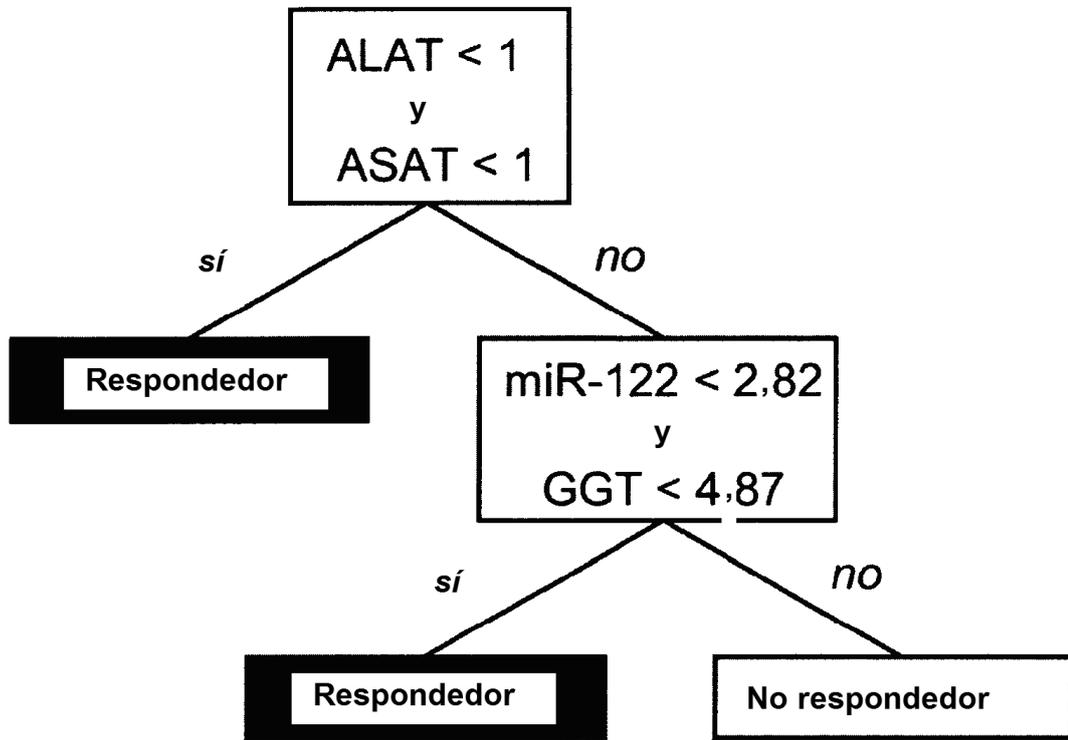
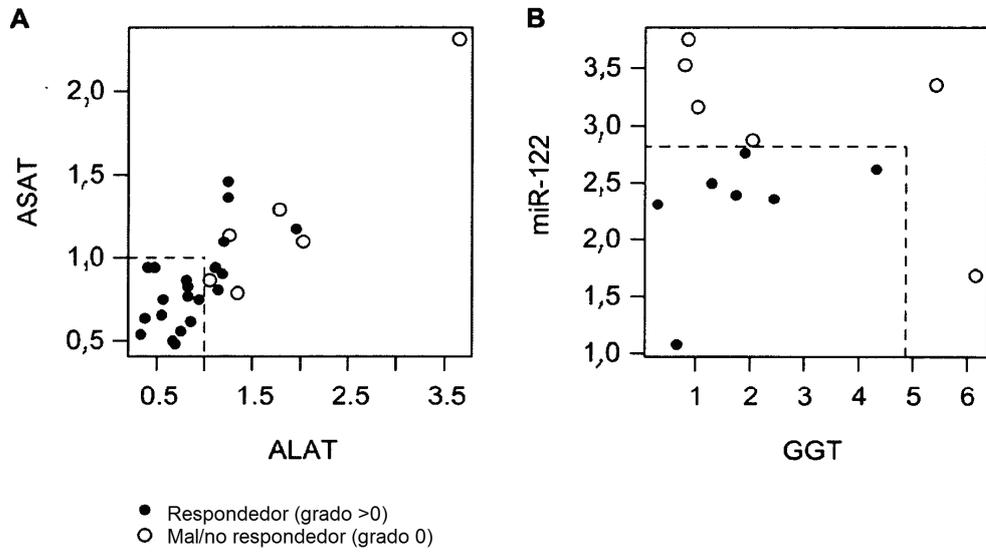


Figura 5



Todos los valores de los ejes se expresan como relativos al límite superior de la normalidad (tabla 1 en el ejemplo 3)

Figura 6