

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 845**

21 Número de solicitud: 201631216

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**C07H 21/02** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**19.09.2016**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**19.03.2018**

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (100.0%)**  
**Avda. Blasco Ibañez, 13**  
**46010 Valencia ES**

72 Inventor/es:

**ARTERO ALLEPUZ, Rubén D.;**  
**LLAMUSÍ TROISI, María Beatriz;**  
**CERRO HERREROS, Estefanía y**  
**FERNÁNDEZ COSTA, Juan M.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

54 Título: **Modulación de microRNAs contra la distrofia miotónica tipo 1 y antagonistas de microRNAs para ello**

57 Resumen:

Modulación de microRNAs contra la distrofia miotónica tipo 1 y antagonistas de microRNAs para ello. La invención proporciona el uso de inhibidores de microRNAs represores de los genes MBNL1 y/o MBNL2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia miotónica 1. Inhibir dichos microRNAs permite incrementar los niveles endógenos de las correspondientes proteínas MBNL1 y/o MBNL2, paliando con ello síntomas de la enfermedad, especialmente cuando se inhiben represores que se expresan en los principales órganos afectados: músculo esquelético, corazón u órganos del sistema nervioso central. Se prefiere la inhibición de los microRNAs miR-23b-3p y miR-218-5p. Se proporcionan también antagonistas de naturaleza oligorribonucleotídica o análogos de oligorribonucleótidos adecuados para ello, con preferencia por antagomiRs dirigidos contra los microRNAs citados con modificaciones químicas que potencien su interacción con la diana, su estabilidad in vivo y su capacidad de penetrar en las células y distribuirse por tejidos y órganos.

ES 2 659 845 A1

## DESCRIPCIÓN

Modulación de microRNAs contra la distrofia miotónica tipo 1 y antagonistas de microRNAs para ello

### Campo técnico

- 5 La invención se refiere al uso de pequeñas moléculas que comprenden unidades de ribonucleótidos o análogos de los mismos para su aplicación terapéutica contra enfermedades. Más concretamente, la invención se refiere al uso de antagonistas de microRNAs, como los antagomiRs, para el tratamiento de la distrofia miotónica tipo 1.

### Antecedentes de la invención

- 10 La distrofia miotónica tipo 1 (DM1) es un trastorno neuromuscular incurable que constituye una seria preocupación clínica pues al hecho de ser la distrofia muscular más común de inicio adulto se une que es altamente discapacitante. Clínicamente, la DM1 se considera un trastorno multisistémico que afecta principalmente al músculo esquelético y liso, al sistema nervioso y al corazón y se caracteriza por una reducción de la masa
- 15 muscular (distrofia muscular), lo que puede conducir a insuficiencia respiratoria y muerte, cataratas posteriores subcapsulares iridiscentes, defectos en la conducción del impulso cardíaco, cambios endocrinos, miotonía (dificultad para relajar el músculo después de una contracción voluntaria), disfunciones del Sistema Nervioso Central que incluyen déficit de atención, patrones de personalidad característicos, alteraciones del sueño y
- 20 síndrome disejecutivo. Este cuadro clínico se completa con una edad de aparición altamente variable, que va desde formas congénitas (desde el nacimiento) a DM1 infantil, de inicio en la etapa adulta de la vida y en la tercera edad. La forma más común de la enfermedad, la de inicio en la adolescencia o segunda década de vida, reduce la esperanza de vida de los pacientes a 48-55 años (Harper, 2001; Gagnon *et al.*, 2007). La
- 25 DM1 se clasifica como una enfermedad rara ya que su prevalencia en la población se estima inferior a 1 cada 2000 personas.

A nivel genético, se conoce que la DM1 es una enfermedad hereditaria autosómica dominante y está causada por la presencia de expansiones de cientos de repeticiones del motivo CTG\*CAG en la región 3' no traducida (3' UTR) del gen de la proteína quinasa de

30 la distrofia miotónica (*DMPK: dystrophia myotonica-protein kinase*) (para una revisión reciente, véase por ejemplo Thornton, 2014). El gen *DMPK* humano (HGNC: 2933, Entrez Gene: 1760, Ensembl: ENSG00000104936, OMIM: 605377 , UniProtKB: Q09013) normal alberga 5-37 copias del motivo de trinucleótidos, pero una mutación dinámica puede

aumentar este número a más de 5000 copias de la repetición. La gravedad de la enfermedad se correlaciona aproximadamente con el número de repeticiones, es decir, el tamaño de la expansión.

Existe también la llamada distrofia miotónica de tipo 2 (DM2), menos frecuente, que se debe a mutaciones en un gen diferente, el gen *CNBP*, presente en el cromosoma 23 humano. En la DM2 aparece también disfunción muscular, pero involucra sobre todo a los músculos de la raíz de las extremidades (hombros, nalgas, muslos...), mientras que en la DM1 están implicados sobre todo los músculos de la porción distal de las extremidades. Al contrario que en DM1, la DM2 no parece afectar a la esperanza de vida y se suele manifestar con síntomas más moderados.

La expresión de alelos expandidos en DM1 da como resultado la retención nuclear de mRNA de *DMPK* mutante y la reducción de los niveles de proteína DMPK (Davis *et al.*, 1997). Los transcritos mutantes secuestran los factores de corte y empalme (proceso al que se aludirá en adelante por el término inglés *splicing*) que son similares a la proteína de *Drosophila* Muscleblind (MBNL, abreviatura en inglés de *Muscleblind-like*), lo que da lugar al *splicing* alternativo anormal de multitud de otros transcritos y la expresión de formas fetales de las correspondientes proteínas en adultos que padecen DM1 (Lin *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2010). De hecho, tanto la proteína Muscleblind de *Drosophila* (UniProtKB O16011, CG33197) como sus homólogos MBNL1-3 de vertebrados, son conocidos como reguladores del *splicing*. Los transcritos de los genes MBNL1 y MBNL2, por su parte, están sometidos ellos mismos a *splicing* alternativo, generando numerosas isoformas proteicas (Pascual *et al.*, 2006). MBNL1 se expresa fuertemente en tejido muscular esquelético y cardíaco y durante la diferenciación de los mioblastos. Su expresión es menor en otros tejidos tales como cerebro, placenta, pulmones, hígado, riñón y páncreas. MBNL2 tiene una expresión solapante en gran medida y se detecta en corazón, cerebro, placenta, pulmones, hígado, músculo esquelético, riñones y páncreas. MBNL3, por su parte, se expresa en placenta y células satélite. Para información más detallada sobre todo ello, puede consultarse la revisión Fernandez-Costa *et al.* (Fernandez-Costa *et al.*, 2011).

Por lo tanto, se cree que la espliceopatía es el principal factor que subyace en la patogénesis de la DM1. Sin embargo, distintos mecanismos alternativos tales como cambios adicionales en la expresión génica, transcritos antisentido, la eficacia de la traducción, la desregulación de la poliadenilación alternativa y la desregulación de miRNAs pueden contribuir a la patogénesis de la DM1 (Batra *et al.*, 2014; Yadava *et al.*,

2016; Kalsotra *et al.*, 2014).

Se han probado varios enfoques terapéuticos en modelos animales de DM1. Entre ellos, los resultados más interesantes derivan del bloqueo de la interacción entre MBNLs y el RNA tóxico utilizando moléculas pequeñas, péptidos, morfolinós u oligonucleótidos antisentido, y espaciómeros (“*gapmers*”) para degradar los transcritos DMPK mutantes  
5 (revisado por Klein *et al.*, 2015).

Una alternativa menos explorada en DM1 es la modulación terapéutica de la expresión de los genes *MBNL1* y *MBNL2* (HGNC: 6923, Entrez Gene: 4154, Ensembl: ENSG00000152601, OMIM: [606516](#), UniProtKB: [Q9NR56](#), al que se  
10 identificaba previamente en HGNC con el símbolo MBNL). Aunque la expresión de las expansiones CUG desencadena diferentes alteraciones moleculares, las evidencias actuales apuntan al secuestro de las proteínas MBNLs como la principal causa de los síntomas de la enfermedad. El modelo de ratón con el gen *Mbnl1* inactivado (ratón *knockout*, abreviado KO, para *Mbnl1*) muestra miotonía, *splicing* incorrecto de transcritos  
15 musculares y cataratas, que son todos ellos síntomas característicos de la enfermedad de DM1 (Kanadia *et al.*, 2003). Más recientemente, se han descrito en ratones de dos meses de edad mutantes en *Mbnl1* las características más relevantes de la disfunción cardíaca (hipertrofia, fibrosis intersticial y alteraciones del *splicing*), lo que sugiere un papel de la reducción de la *Mbnl1* en los problemas cardíacos de DM1 (Dixon *et al.*,  
20 2015). Además, los polimorfismos genéticos en el promotor del gen MBNL1 humano han sido asociados con la gravedad de la enfermedad (Huin *et al.*, 2013).

Sin embargo, los ratones KO para *Mbnl1* no muestran todo el conjunto de síntomas de la DM1. Por lo tanto, se ha planteado la hipótesis de que *Mbnl2* podría compensar la pérdida de función de *Mbnl1* en estos ratones. De hecho, los ratones KO para *Mbnl1* con  
25 expresión reducida de *Mbnl2* (*Mbnl1*<sup>-/-</sup>; *Mbnl2*<sup>+/-</sup>), son viables, pero desarrollan la mayor parte de los defectos cardinales de la enfermedad, incluida la reducción de la esperanza de vida, bloqueo cardíaco, miotonía grave, fibras atróficas y debilidad progresiva de los músculos esqueléticos. En apoyo de la hipótesis de compensación puede mencionarse que los niveles de *Mbnl2* están incrementados en ratones KO para *Mbnl1*<sup>-/-</sup> y *Mbnl2*  
30 puede regular exones que normalmente son regulados por *Mbnl1* (Lee *et al.*, 2013).

Varias observaciones sugieren que la sobreexpresión de MBNL1 puede tener potencial para el tratamiento de la patología de la DM1. En primer lugar, la sobreexpresión de MBNL1 es bien tolerada en el músculo esquelético de ratones transgénicos, causando sólo cambios relativamente menores en el *splicing*, pero sin afectar a la longevidad

(Chamberlain *et al.*, 2012). En segundo lugar, la administración de la proteína Mbn11 recombinante a un modelo de DM1 de ratón *HSA<sup>LR</sup>*, rescata la miotonía y las alteraciones del *splicing* características de la DM1 (Kanadia *et al.*, 2006).

5 Dada la gravedad de los síntomas de la DM1, que pueden conducir a la muerte prematura del paciente, y la ausencia en la actualidad de tratamientos eficaces para la misma, es de interés explorar estrategias terapéuticas alternativas.

Así, sería interesante comprobar si la sobreexpresión de MBNL1, sola o en combinación con la modulación de MBNL2, podría también tener aplicación terapéutica en seres humanos aquejados de DM1. Sin embargo, dado que el diseño y la autorización de la  
10 aplicación de vectores de expresión seguros para su administración a seres humanos es compleja, sería interesante encontrar una manera de conseguir aumentar los niveles de la proteína MBNL1 o MBNL2 en seres humanos, en los mismos tejidos donde normalmente se transcriben, mediante algún método alternativo a la expresión de dicha  
15 proteína desde un vector artificial. Sería preferible, además, que dicho incremento de nivel se produjera, al menos, en uno o más de los tejidos y órganos relevantes donde aparecen síntomas específicamente significativos de la enfermedad: músculo esquelético y liso, corazón y sistema nervioso.

La presente invención proporciona una solución a ese problema.

### **Sumario de la invención**

20 La presente invención se basa en compensar las insuficientes cantidades de proteínas MBNL (*Muscleblind-like*) que están disponibles para interactuar con sus dianas naturales en los pacientes con distrofia miotónica 1 (DM1), debido a que dicha proteína, entre otros mecanismos que pueden afectar a su expresión, distribución subcelular y actividad in vivo, queda secuestrada en foci ribonucleares de los que forman parte los  
25 transcritos mutantes del gen DMPK. Mediante la compensación de las cantidades de las proteínas MBNL, se intenta provocar una mejoría en los síntomas de dicha enfermedad. Y para ello, los presentes inventores proponen conseguir una regulación al alza de los niveles de dichas proteínas, provocada por un aumento de la expresión de las mismas, mediante el bloqueo de la acción de microRNAs (miRNAs) que intervienen negativamente  
30 en la regulación de su traducción y estabilidad, preferiblemente mediante oligorribonucleótidos, análogos de los mismos o, en general, moléculas de naturaleza oligorribonucleotídica, capaces de bloquear específicamente la acción de determinados miRNAs represores de los genes *MBNL1* y/o *MBNL2*.

Así, en un primer aspecto la presente invención se refiere a una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica y/o un análogo de oligorribonucleótido que es un antagonista de un microRNA que regula a la baja la expresión del gen humano *MBNL1* y/o *MBNL2*, o a una mezcla de dos o más de dichas moléculas. Dicha molécula se considerará una molécula

5 de naturaleza oligorribonucleotídica o análogo de oligorribonucleótido de la invención. Preferiblemente, la molécula es un antagonista de un microRNA que se expresa al menos en uno o más órganos seleccionados del grupo de cerebro, cerebelo, hipocampo, músculo esquelético y corazón, o en una o más células de un cultivo primario de uno de dichos órganos o de una línea celular establecida derivada de uno de dichos órganos

10 (incluidas las células madre pluripotentes inducidas, conocidas por sus siglas en inglés *iPSCs:induced pluripotent stem cells*) o células madre de uno de dichos órganos. Se prefiere que la molécula sea complementaria y comprenda un fragmento de secuencia de unidades de ribonucleótidos, o de análogos de ribonucleótidos, en el que la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de ribonucleótidos o de análogos de

15 ribonucleótidos es complementaria al menos en un 50% (o al menos en un 55%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100%) a la secuencia de las bases nitrogenadas de la molécula endógena (el microRNA o el RNA mensajero) a la que debe unirse. Preferiblemente, la molécula es un antagonista del microRNA-218-5p humano o del microRNA-23b-3p humano.

20 Compatiblemente con cualquiera de las preferencias anteriores, se prefiere que el antagonista sea un antagomiR, un blockmiR, un antimiR o una esponja de microRNA, con especial preferencia por que la molécula sea un antagomiR y, dentro de ellos, un antagomiR en el que la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de ribonucleótidos o de análogos de ribonucleótidos es complementaria es idéntica al menos

25 en un 80% a la secuencia de las bases nitrogenadas del microRNA al que debe unirse. Especialmente en el caso de que la molécula sea un antagomiR, un antimiR o una esponja de microRNA, se prefiere que la molécula sea complementaria a la secuencia del microRNA-218-5p o la del microRNA-23b-3p humano o que comprenda un fragmento de secuencia de unidades de ribonucleótidos, o de análogos de ribonucleótidos, en el que la

30 secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de ribonucleótidos o de análogos de ribonucleótidos es idéntica al menos en un 80% (o al menos en 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100%) a la secuencia de las bases nitrogenadas del oligorribonucleótido de SEQ ID NO:1 o de SEQ ID NO:2. Especialmente cuando la molécula es un antagomiR, se prefiere que dicha molécula sea

35 complementaria a la secuencia del microRNA-218-5p humano o la del microRNA-23b-3p humano o que comprenda un fragmento de secuencia de unidades de ribonucleótidos, o

de análogos de ribonucleótidos, en el que la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de ribonucleótidos o de análogos de ribonucleótidos es complementaria al menos en un 50% (o al menos en un 55%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100%) a la del microRNA-218-5p humano o la del microRNA-23b-3p humano, con especial preferencia por que sea complementaria al menos en un 80%. Muy preferiblemente, la molécula es un análogo de oligorribonucleótido de tipo antagomiR en el que al menos una de las unidades es un análogo de ribonucleótido que presenta una o más modificaciones químicas en el resto de la ribosa, en el enlace fosfato o en ambos, la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de ribonucleótidos o análogos de ribonucleótidos es idéntica a la secuencia de bases nitrogenadas de las unidades de ribonucleótidos del oligorribonucleótido de SEQ ID NO:1 o del oligorribonucleótido de SEQ ID NO:2 y que, optativamente, presenta en el extremo 5' y/o en el extremo 3' uno o más restos adicionales que no son restos de adenorribonucleótidos o ribonucleótidos. Con la mayor preferencia, la molécula es el antagomiR-218 (SEQ ID NO:10) o el antagomiR-23b (SEQ ID NO:11). En otra posible realización, especialmente interesante en el caso de antimicroRNAs, la molécula de naturaleza oligorribonucleotídica y/o el análogo de oligorribonucleótido comprende un fragmento que es complementario en un 100% a la región semilla del microRNA del que es antagonista. Otra posible realización, especialmente interesante en el caso de blockmiRNAs, es una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica y/o el análogo de oligorribonucleótido que comprende un fragmento compuesto por una sucesión de unidades de ribonucleótidos o de análogos de ribonucleótidos en el que la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de ribonucleótidos o de análogos de ribonucleótidos es complementaria al menos en un 80% a la secuencia de las bases nitrogenadas de la región reconocida por el microRNA del que es antagonista en un mRNA diana (es decir, regulado a la baja por ese microRNA).

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos una de las moléculas de naturaleza oligorribonucleotídica o un análogo de oligorribonucleótido de la presente invención, una mezcla de las mismas, o un vector de expresión que comprende la secuencia codificante de al menos una de dichas moléculas de naturaleza oligorribonucleotídica. En una posible realización, la composición adicionalmente comprende un vehículo y/o uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En otra posible realización preferida, compatible con la anterior, la composición comprende el análogo de oligorribonucleótido tipo antagomiR representado por SEQ ID NO:10 (antagomiR-218-5p) o el análogo de oligorribonucleótido tipo antagomiR representado por SEQ ID NO:11 (antagomiR-23b-3p) o una mezcla de los

mismos. Es también una posible realización, compatible con todas las anteriores y especialmente preferida cuando están presentes en la composición el antagomiR-23b-3p y/o el antagomiR-218-5p, que la molécula de naturaleza oligorribonucleotídica o análogo de oligorribonucleótido esté en una concentración de 50 nM a 200 nM, ambas incluidas.

- 5 En un aspecto más, la invención se refiere al uso de una de las moléculas de naturaleza oligorribonucleotídica o un análogo de oligorribonucleótido de la invención, una mezcla de dos o más de ellas, o una composición que comprende al menos una de dichas moléculas, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia miotónica tipo 1. Por tanto, está comprendido dentro del alcance de la invención y puede
- 10 considerarse un aspecto de la misma, una de las moléculas de naturaleza oligorribonucleotídica o un análogo de oligorribonucleótido de la invención, una mezcla de dos o más de ellas, o una composición para uso en el tratamiento de la distrofia miotónica tipo 1. Preferiblemente, en este aspecto de la invención referido al uso para la fabricación de un medicamento y, por tanto, relacionado con el uso en el tratamiento de la distrofia
- 15 miotónica tipo 1, es una posible realización aquella en que la molécula es o la composición comprende un antagonista del microRNA-218-5p humano, un inhibidor del microRNA-23b-5p humano, una mezcla de los mismos o una composición que los comprende. En una posible realización, el tratamiento es un tratamiento paliativo de uno o más síntomas de la distrofia miotónica tipo 1. Dentro de la anterior, una posible
- 20 preferencia es que el tratamiento sea un tratamiento paliativo de una o más de las alteraciones musculares que forman parte de los síntomas de la distrofia miotónica tipo 1.

### Breve descripción de las figuras

- Fig. 1. El silenciamiento específico de tejido de *dme-miR-277* y *dme-miR-304* provoca la sobreexpresión de RNA y proteínas *muscleblind* en el músculo de *Drosophila*. (A):
- 25 Niveles de expresión de *muscleblind* relativo a un control endógeno obtenidos por amplificación por qRT-PCR a partir de moscas que expresan las construcciones de esponjas de miRNAs para *dme-miR-92a*, *dme-miR-100*, *dme-miR-124*, *dme-miR-277* y *dme-miR-304* en el músculo: los niveles de expresión de *muscleblind* fueron fuertemente regulados al alza en las moscas que expresaban las esponjas de microRNAs miR-277SP
- 30 y miR-304SP con respecto a moscas que expresan una construcción UAS-scrambledSP (B): Análisis de los niveles de isoformas de *muscleblind* por qRT-PCR, donde se aprecia que el silenciamiento de *dme-miR-277* en el músculo causó una regulación al alza de la isoforma *mbIB*, mientras que los niveles de expresión de las isoformas *mbIC* y *mbID* se redujeron en las moscas que expresaban miR-277SP; por el contrario, los niveles de
- 35 *mbIC* y *mbID* se incrementaron y los de la isoforma *mbIB* se redujeron en las moscas que

expresaban miR-304SP. (C) Detección de la proteína Muscleblind por Western blot, donde se detectó la sobreexpresión de la proteína Muscleblind en las moscas que expresaban miR-304SP. Todos los transgenes indicados fueron dirigidos al músculo utilizando *Mhc-Gal4*. \*p <0,05, \*\*p <0,01, \*\*\*p <0,001 (prueba de la t de Student).

- 5 Fig. 2. El silenciamiento de *dme-miR-277* y *dme-miR-304* potencia la expresión de *muscleblind* y rescata eventos de *splicing* incorrecto en un contexto de DM1. (A) Gráfico de barras que muestra los niveles de expresión de *muscleblind* según los datos obtenidos por qRT-PCR en moscas *i(CTG)480* que expresaban las construcciones esponja indicadas bajo el gráfico: se muestra que el mRNA de *muscleblind* se reguló al alza de
- 10 manera significativa en las moscas modelo que expresaban miR-277SP y miR-304SP en comparación con las moscas que no expresan las expansiones (control, *Mhc-Gal4/+*) o las moscas modelo que expresaban los scrambled-SP (*scramble-SP* en la figura). (B) Análisis de transferencia Western en muestras de las mismas moscas, que mostró la sobreexpresión de Muscleblind C sólo en las moscas modelo que expresaban miR-
- 15 304SP. (C-F) Imágenes confocales de secciones longitudinales de los IFM (músculos indirectos de vuelo) de moscas que expresaban o no esponjas de miRNAs según se muestra en la esquina inferior derecha, que muestran la localización de la señal de anti-Muscleblind (verde en el original, gris claro en escala de grises), con contratinción de los núcleos con DAPI (señal azul en el original, gris más apagado en escala de grises): se
- 20 aprecia señal de Muscleblind en las bandas sarcoméricas de las moscas control (c); por el contrario, Muscleblind se encontró en los agregados nucleares de los IFM en los que se expresaban expansiones CTG (d); la expresión de miR-277SP en las moscas modelo liberó Muscleblind de los agregados y restauró su distribución en las bandas del sarcómero (e); la expresión de miR-304SP dio lugar a una sobreexpresión dispersa de
- 25 Muscleblind tanto en los núcleos como en el citoplasma. (G) Resultados obtenidos tras RT-PCR para evaluar la inclusión del exón 16' (+e16') de *Fhos* o su exclusión (-e16') en moscas con diferentes genotipos y expresión de esponjas de microRNAs, según se indica sobre las fotografías; se muestran también los resultados correspondientes a los transcritos de *Rp49* detectados como control endógeno. (H) Cuantificación del porcentaje
- 30 de inclusión del exón 16' de *Fhos* a partir de los resultados mostrados en el panel G, que confirmó una mejora del *splicing* erróneo de *Fhos* en las moscas modelo que expresaban miR-304SP. (I, L) Gráficos de barras que muestra los resultados, obtenidos por qRT-PCR, de expresión del exón 13 de *Serca* (*Serca* e13) y el exón 2 del gen *CyP6W1* (*CyP6W1* e2) en relación con *Rp49*, que confirmaron un rescate significativo del *splicing*
- 35 de *Serca* en moscas modelo que expresaban miR-304SP y de la expresión relativa de *CyP6W1* en estas moscas. (J) Resultados obtenidos tras RT-PCR para evaluar la

inclusión de los exones 3-5 del gen *TnT* (+e3-5), que no difirió en los genotipos estudiados. (K) Cuantificación del porcentaje de inclusión de los exones 3 a 5 de *Tnt* a partir de los resultados mostrados en el panel J. Los transgenes de todos los genotipos indicados fueron dirigidos al músculo utilizando *Mhc-Gal4*. Barra de escala = 2  
5 micrometros. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (prueba de la t de Student).

Fig. 3. El silenciamiento de *dme-miR-277* y *dme-miR-304* rescata la atrofia muscular y la presencia de foci ribonucleares en las moscas modelo. (a-c, e-g): Secciones dorsoventrales de tórax embebido en resina, de moscas con los genotipos indicados bajo las fotografías: se aprecia cómo, en comparación con las moscas control (a), la expresión  
10 de miR-277SP dio como resultado una reducción significativa del área del músculo (b), mientras que la expresión de miR-304SP no tuvo efecto en este fenotipo (c); en las moscas modelo de DM1, el área del músculo se redujo hasta un 40% de lo normal (e); sin embargo, en las moscas modelo que expresaban uno cualquiera de entre miR-277SP o miR-304SP, el área muscular aumentó hasta un 60% de lo normal (f, g). (d, h):  
15 Cuantificación del porcentaje medio del área muscular según el genotipo indicado bajo las barras; los gráficos muestran las medias  $\pm$  E.E.M. Se analizaron seis individuos por genotipo y se cuantificaron seis fotografías de cada uno. En todas las imágenes la parte dorsal está hacia arriba. (i-k) Hibridación in situ de cortes transversales de musculatura de moscas con los genotipos indicados bajo las fotografías: se aprecia cómo, en  
20 comparación con las moscas control donde se observa una clara presencia de foci (i) la expresión de miR-277SP y miR-304SP dio como resultado una reducción significativa de estos, siendo prácticamente inapreciable en este último caso (j y k). Todos los genotipos indicados fueron dirigidos al músculo utilizando *Mhc-Gal4*. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (prueba de la t de Student).

25 Fig.4. La inhibición de *dme-miR-277* o *dme-miR-304* mejora la locomoción y la supervivencia de las moscas modelo de DM1. (a, e) Altura media de aterrizaje de moscas con los genotipos relevantes indicados bajo el gráfico. En los individuos control (a), el silenciamiento de *dme-miR-277* disminuyó la altura de aterrizaje mientras que el silenciamiento de *dme-miR-304* no afectó al vuelo. En las moscas modelo de DM1 (e), la  
30 expresión de miR-277SP o miR-304SP rescató la disminución de la capacidad de vuelo observada. (b, f) Histogramas de la velocidad de ascensión por superficies expresada como la velocidad media  $\pm$  E.E.M. en mm/s. En las moscas control (b), el silenciamiento de cualquiera de entre *dme-miR-277* o *dme-miR-304* no tuvo efecto sobre la velocidad de ascensión. Sin embargo, en las moscas modelo de DM1 (f), que tienen una velocidad de  
35 ascensión muy reducida, la expresión de miR-277SP o miR-304SP rescató

significativamente este fenotipo. (c, g) Curvas de supervivencia y (d,h) supervivencia media, que muestran que la expresión de miR-277SP o miR-304SP no tuvieron efecto sobre las moscas control, pero mejoraron la supervivencia de las moscas modelo de DM1. Se analizaron entre 140 y 160 individuos de cada genotipo. Todos los transgenes  
 5 indicados fueron dirigidos al músculo con *Mhc-Gal4*. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (prueba de la t de Student).

Fig. 5. Validación de resultados del *screening* primario de miRNAs represores de *MBNL1* o *MBNL2*. (a-b) Representación logarítmica en base 2 ( $\log_2$ ) del nivel de expresión relativo de *MBNL1* (a) y *MBNL2* (b) en células HeLa transfectadas con plásmidos  
 10 derivados de pCMV-MIR que expresan diferentes miRNAs humanos (miR-7, miR-23b, miR-146b, miR-218, miR-372), siendo el valor de referencia para ambos genes el detectado en células HeLa transfectadas con el plásmido pCMV-MIR vacío (VTC en la figura) y el gen endógeno utilizado para normalizar *GAPDH*. Como control de la transfección el vector expresaba la proteína GFP. \*  $p < 0,05$  \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . (c-d)  
 15 Representación del nivel de expresión relativo a nivel de proteína de *MBNL1* (panel c) y *MBNL2* (panel d) en células HeLa transfectadas con los plásmidos de los ensayos mostrados en (a) y (b), utilizando igualmente como valor de referencia para ambos genes el detectado en células HeLa transfectadas con el plásmido pCMV-MIR vacío (VTC en la figura) y utilizando como control endógeno  $\beta$ -actina. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (prueba de la t  
 20 de Student).

Fig. 6. Confirmación experimental de las secuencias diana reconocidas por los miRNAs candidatos en 3' UTRs mediante ensayos de Luciferasa. (A) Representación  
 esquemática, a escala, de los sitios de unión predichos por los programas miRanda y  
 TargetsScan de los microRNAs indicados sobre los 3'UTRs de MBNL1. Aunque dicho gen  
 25 sufre splicing alternativo, ninguna de las isoformas conocidas afecta a la presencia en el transcrito de las dianas mostradas. (B) Representación gráfica de la actividad de los diferentes microRNAs sobre sensores luc:3'-UTR MBNL1 expresada en unidades relativas de luciferasa de Gaussia, normalizadas respecto al control interno SEAP (Gluc/SEAP). (C) Para comprobar que la unión de miR-23b es directa, se muestran los  
 30 datos del sensor 3'UTR de este miRNA candidato con la secuencia diana predicha mutada (MUT) y también su versión con la diana complementaria perfecta (PM), así como los datos obtenidos cuando la diana natural (WT) está presente en el sensor 3'UTR. La actividad de miR-23b sobre los sensores 3'UTR natural, mutado y PM se expresa en unidades relativas de luciferasa de Gaussia, normalizadas respecto al control interno  
 35 SEAP (Gluc/SEAP). \* $p < 0,05$  \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . (D) Representación esquemática, a

escala, de los sitios de unión predichos por los programas miRanda y Targetscan de los microRNAs indicados sobre las 3'UTRs de MBNL2. Como en el caso de MBNL1, aunque dicho gen sufre *splicing* alternativo, ninguna de las isoformas conocidas afecta a la presencia en el transcrito de las dianas mostradas. (E) Representación gráfica de la actividad de los diferentes microRNAs sobre sensores luc:3'UTR de MBNL2 expresada en unidades relativas de luciferasa de *Gaussia*, normalizadas respecto al control interno SEAP (Gluc/SEAP). (F,G): Representación gráfica de la actividad de los microRNAs mirR-23b (F), miR-218 (G) que resultaron positivos en el ensayo anterior. Como en el caso de MBNL1, se muestran los datos obtenidos con las versiones del sensor 3'UTR diseñadas para cada miRNA candidato con la secuencia diana predicha mutada (mut) y también su versión con diana complementaria perfecta (PM), así como los datos obtenidos cuando la diana natural (WT) está presente en el sensor 3'UTR. La actividad de los diferentes microRNAs sobre los 3'UTR natural, mutado y PM se expresan en unidades relativas de luciferasa de *Gaussia*, normalizadas respecto al control interno SEAP (Gluc/SEAP). \* $p < 0,05$  \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (prueba de la t de Student).

Fig. 7. Representación gráfica del nivel de expresión relativo de los diferentes microRNAs (miR-23b, miR-146b, miR-218, miR-372) mediante qPCR. Como controles endógenos para la normalización de la expresión se utilizaron los genes U1 y U6. (A) Expresión de los microRNAs en los diferentes tejidos de ratón (cepa FVB); (B) expresión de microRNAs en fibroblastos de individuos controles y de pacientes con DM1; (C) expresión de microRNAs en biopsias musculares de individuos control y pacientes con DM1. \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (prueba de la t de Student).

Fig. 8. Ensayos de toxicidad con antagomiRs de los microRNAs 218 y 23b en mioblastos normales Representación gráfica del porcentaje de inhibición de la supervivencia celular a las 60 h, obtenida en mioblastos control provocada por la toxicidad asociada a ensayo de dosis respuesta con cantidades crecientes de los antagomiRs, respecto al logaritmo en base 10 de la concentración nanomolar del compuesto. Las cantidades probadas en mioblastos control se indican sobre las correspondientes curvas.

Fig. 9. Ensayos de respuesta a dosis de los antagomiRs de los microRNAs 218 y 23b: representación gráfica del nivel de expresión de MBNL1 (a, b) o MBNL2 (c, d) en mioblastos control sanos, DM1 y tratados con los antagomiR-23b y antagomiR-218 (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M). Como controles endógenos para la normalización de la expresión se utilizaron los genes GAPDH y ACTB. En los paneles de la izquierda se ve la expresión de MBNL1 (a) o MBNL2 (c) a las 48 horas post-transfección y transdiferenciación con los antagomiRs, mientras que en los paneles de la derecha se ve la expresión de MBNL1 (b)

o MBNL2 (d) a las 96 horas post-transfección y transdiferenciación con los antagomiRs. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (prueba de la t de Student).

Fig. 10. Ensayos de respuesta a dosis de los antagomiRs de los microRNAs 218 y 23b: evaluación del splicing alternativo de los genes cTNT, DMD, SERCA1, BIN, IR y GAPDH mediante RT-PCR semicuantitativa en muestras de mioblastos de controles sanos (CNT) y de pacientes con DM1 sin tratar (DM1), o tratados con los antagomiR-23b y antagomiR-218 a las concentraciones indicadas (50 nM, 100 nM, 200 nM). Se muestran los resultados obtenidos tras 48 h (paneles A, C, D, E, F, G) o 96 h (paneles B, H, I, J, K, L) de transdiferenciación. Los paneles A y B muestran fotografías de los correspondientes fragmentos de los geles de las electroforesis realizadas tras la RT-PCR; en la parte derecha de los ensayos correspondientes a cada gen se indica el exón para el cual se comprobó su inclusión (leyenda encabezada por un signo "+") o exclusión (leyendas encabezadas por un signo "-"). Los paneles C, D, E, F, G (ensayo a 48 h) y H, I, J, K, L (ensayo a 96 h) muestran gráficos de barras con los porcentajes de exclusión (parte en gris claro) o inclusión (parte superior, en gris más oscuro) de cada uno de esos exones para los controles CNT y DM1 y las concentraciones de cada antagomiR indicadas bajo las barras.

### Descripción detallada de la invención

Como se ha comentado previamente, la presente invención se basa en conocimientos que indican que en pacientes con DM1 la actividad de las proteínas de la familia MBNL es limitante, lo cual se origina, al menos en parte, porque los mRNA transcritos de alelos mutantes del gen DMPK, que presentan cientos de repeticiones CUG adicionales en la región UTR de 3', se acumulan en foci en los que quedan secuestradas proteínas Muscblind-like (MBNL), apartándolas de sus dianas funcionales. Por ello, los presentes inventores proponen que la regulación al alza de los niveles de las proteínas endógenas MBNL supone un enfoque terapéutico contra la DM1, que ayudaría a paliar sus síntomas.

La base de la presente invención es la identificación de miRNAs que actúan negativamente sobre la expresión de las proteínas MBNL y el bloqueo o inhibición de los mismos, para disminuir o impedir su efecto negativo sobre los niveles de las proteínas MBNL, dando lugar con ello a un incremento de dichos niveles.

El papel fundamental de los miRNA en la regulación de la expresión génica ha sido bien establecido. Los microRNAs (comúnmente abreviados como miRNAs) son RNAs endógenos no codificantes, de una longitud aproximada de 22 nucleótidos, que actúan post-transcripcionalmente y ejercen sus efectos reguladores principalmente mediante la

unión a la región 3' UTR del mRNA diana, lo que da como resultado la desadenilación del mRNA y, con ello, provocan la disminución o la supresión de la traducción o, raramente, la escisión del mRNA. Este último efecto, la escisión del mRNA, puede darse cuando existe una complementariedad completa entre un mRNA y un miRNA que se une al mismo, lo cual permite que actúe un miembro de la familia de proteínas llamadas argonautas, concretamente Ago2, que es capaz de escindir el mRNA y conducir a su degradación directa. Para la unión de un microRNA al correspondiente RNA mensajero, es fundamental la presencia en dicho mRNA de la llamada "región semilla" ("seed región"), que es un fragmento de unos 6-8 nucleótidos (habitualmente 7), que forma parte de la zona del mRNA a la que se une el microRNA y que tiene una complementariedad perfecta con una parte del microRNA, habitualmente los nucleótidos 2 a 8 ó 9 del mismo, a la que se suele llamar igualmente región semilla. Aunque la complementariedad entre el microRNA y su correspondiente mRNA no sea perfecta en toda la zona de apareamiento, sí lo es en la región semilla; con ella, el microRNA podrá ser funcional en la regulación de la expresión del gen al que corresponda el mRNA que la contenga.

Así, los presentes inventores proponen una aproximación terapéutica para la mejora de la DM1 que consiste en la modulación de las proteínas MBNL endógenas provocando el secuestro de uno o más de los miRNAs que actúan negativamente sobre su expresión, dando con ello lugar a una regulación al alza y, como consecuencia, a un aumento de los niveles de las proteínas MBNL endógenas. Por tanto, se trata de provocar la modulación de la proteína endógena mediante el silenciamiento o la disminución de la actividad represora de miRNAs específicos implicados en la regulación de su expresión. Particularmente, en el presente caso, se tiene preferencia por miRNAs que se expresen en músculo, por ser uno de los principales órganos afectados por la enfermedad.

De acuerdo con lo anterior, y tal como se utiliza en la presente memoria, se denomina inhibidores, silenciadores o bloqueadores de un miRNA a los compuestos que son capaces de producir una disminución de la actividad endógena de dicho miRNA. Por ser habitual en la literatura relacionada con estrategias análogas hablar de "antagonismo" (véase, p.ej., el artículo de Landford *et al.*, 2010, sobre silenciamiento del miR-122), estos tres términos se han englobado bajo la denominación "antagonista" de un miRNA. Puesto que la presente invención se centra en disminuir la actividad de miRNAs represores de la expresión de ciertos genes, es dicha capacidad represora la que se verá disminuida por la presencia de sus inhibidores, silenciadores o bloqueantes: sus antagonistas. Si bien, estrictamente hablando, el término "silenciamiento" podría interpretarse como la anulación absoluta de dicha actividad, dado que la diferencia entre que se produzca dicha

anulación o una disminución no absoluta de la actividad represora puede depender de la concentración de compuesto utilizada, los cuatro términos (inhibidores, silenciadores, bloqueantes o antagonistas) se utilizan como sinónimos en la presente memoria, siendo suficiente que un compuesto dé lugar a una disminución de la actividad represora de un miRNA para que sea considerado un inhibidor, silenciador, bloqueante o, en suma, un antagonista del mismo. Análogamente, el efecto producido por un inhibidor, silenciador o bloqueante es denominado inhibición, silenciamiento o bloqueo del miRNA en distintas partes de la memoria, entendiéndose que cualquiera de esos tres términos conllevan y significan un antagonismo de la acción del mismo. En algunos puntos específicos, particularmente cuando se hace referencia a ensayos en los que se han utilizado esponjas de miRNAs, se utiliza también la palabra “agotamiento” para aludir al efecto que se produce cuando dichas esponjas están presentes, pues puede considerarse que el número de sitios de unión en dichas esponjas da lugar a que queden unidas a ellas la mayor parte o la práctica totalidad de las moléculas de miRNA que tienen secuencias complementarias a ellas, “agotándose” las moléculas de ese miRNA disponibles para interaccionar con otras moléculas o compuestos en la célula donde las esponjas estén presentes.

En la presente invención, se tiene preferencia por antagonistas específicos de dichos miRNAs, que sean también, a su vez, oligorribonucleótidos o moléculas derivadas de los mismos que incorporen, entre otras, alguna de las modificaciones químicas habituales con las que se modifican las moléculas de oligorribonucleótidos para hacerlas más resistentes a la degradación o biodisponibles, tales como la modificación de parte o todos los nucleótidos con grupos 2'-metoxi (2'-O-metil: 2'-OMe), 2'-Ometoxietil (2'-MOE), y/o fosforotioatos. Tal como se utiliza en la presente memoria, se denomina oligorribonucleótidos a las moléculas que resultan de la unión de un máximo de 50 unidades de los monómeros que dan lugar a la molécula conocida de forma abreviada como RNA, monómeros que están compuestos por un grupo fosfato, las bases nitrogenadas adenina (A), citosina (C), guanina (G) o uracilo (U), y la pentosa conocida como ribosa. Por lo habitual de su uso, se consideran también incluidas dentro de dicha definición las moléculas entre cuyas unidades se encuentra el nucleótido inosina.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “moléculas de naturaleza oligorribonucleotídica” incluye tanto a los oligorribonucleótidos propiamente dichos, tal como se han definido más arriba, como también a los “análogos de oligorribonucleótidos”. Se consideran “análogos de oligorribonucleótidos” las moléculas derivadas de los mismos que incorporen alguna modificación química en al menos una de las unidades de

ribonucleótidos que los componen, ya sea en el grupo fosfato, la pentosa o una de las bases nitrogenadas; se incluyen también las modificaciones consistentes en la adición de grupos de naturaleza no nucleotídica en los extremos 5' y/o 3'. Por extensión, a efectos de la presente invención y tal como se utilizan en la presente memoria, los términos

5 “molécula de naturaleza oligorribonucleotídica” y “análogo de oligorribonucleótido” incluyen también a las esponjas de miRNAs o miRNAs esponja, pues puede considerarse que el principal constituyente de los mismos son repeticiones de oligonucleótidos colocadas en tándem, con la particularidad de que cada uno de dichos oligonucleótidos son en sí mismos o contienen un sitio de unión de un microRNA de interés.

- 10 Con respecto a las posibles modificaciones químicas incluidas en los análogos de oligorribonucleótidos, el término se aplicará especialmente cuando se trate de una o más de las modificaciones habituales conocidas por los expertos en la materia de la biología molecular, tanto en el campo de la investigación básica como, en la particular, en la búsqueda de aplicaciones terapéuticas de dichas moléculas. Puede encontrarse
- 15 información sobre este tipo de modificaciones en revisiones como la de Kole *et al.* (Kole *et al.*, 2012). En particular, para los propósitos de la invención, son de especial interés (y se consideran incluidas dentro de las modificaciones que dan lugar a moléculas incluidas dentro del alcance de la invención) aquellas modificaciones, válidas para oligorribonucleótidos o ácidos ribonucleicos de mayor longitud, que dan lugar a análogos
- 20 de RNAs con resistencia incrementada a la hidrólisis, y que generalmente son modificaciones en la ribosa, tales como las que resultan en: RNAs 2'-O-metil-sustituidos (las modificaciones 2'-metoxi); RNAs 2'-O-metoxietil-sustituidos; LNAs (“*locked nucleic acids*”: ácido nucleico bloqueado, en el que el residuo de la ribosa está modificado con un puente extra que conecta el oxígeno de 2' y el carbono de 4' y bloquea a la ribosa en la
- 25 conformación 3'-*endo*); BNAs (“*bridged nucleic acid*”: ácido nucleico con puentes); PMOs (ácidos nucleicos donde la ribosa ha sido sustituida por un grupo morfolino), o PNAs (“*peptide nucleic acid*”: ácido nucleico peptídico, donde el grupo ribosa-fosfato se sustituye por un residuo de aminoácido, de forma que el análogo de nucleótido tiene por
- 30 esqueleto una estructura de unidades repetidas de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces peptídicos). Últimamente se están utilizando también nucleótidos con un tipo adicional de química: los CRN (“Conformationally Restricted Nucleotides”), en los que el residuo de ribosa se encuentra bloqueado en una conformación rígida mediante un resto químico que actúa como conector, modificación que se está usando principalmente para obtener antagomiRs con nuevas propiedades (ver, por ejemplo, la información
- 35 proporcionada en la página web: <http://www.marinabio.com/pipeline/nucleic-acid-drugs/>). Son también comunes, y se consideran igualmente incluidas dentro de las posibles

modificaciones que dan lugar a análogos de oligorribonucleótidos de la invención, las modificaciones que dan lugar a enlaces fosforotioato, que son modificaciones que afectan a grupos fosfato que forman parte del “esqueleto” de la cadena de nucleótidos, dando lugar a la introducción de un átomo de azufre en sustitución de un átomo de oxígeno del grupo fosfato que no está actuando como puente entre nucleótidos; estas modificaciones hacen que las uniones entre nucleótidos sean resistentes a la degradación por nucleasas, por lo que es habitual que se introduzcan entre los últimos 3-5 nucleótidos en los extremos 5' o 3' de oligonucleótidos para inhibir su degradación por exonucleasas, aumentando su estabilidad. Es habitual representar los análogos de ribonucleótidos fosforotioados anteponiendo a la abreviatura de la base una r y colocando detrás un asterisco (p.ej., rA\*), mientras que las bases 2'-O-metiladas y unidas a fosforotioato pueden encontrarse representadas con una letra m delante de su abreviatura y un asterisco detrás (p.ej., mA\*). Por su frecuencia de uso dentro del grupo de los antimisRs, se incluye también entre las modificaciones químicas que dan lugar a análogos de oligorribonucleótidos de la invención la metilación en 5' de la base nitrogenada citosina (C), lo que parece incrementar la estabilidad de los dúplex que se forman con la diana.

Son posibles y conocidas también otras distintas modificaciones químicas, que quedan comprendidas igualmente dentro de las modificaciones posibles que dan lugar a análogos de oligorribonucleótidos. Como puede deducirse de la definición de “moléculas de naturaleza oligorribonucleotídica” y la de “análogos de oligorribonucleótidos”, quedan comprendidas también dentro de la definición de análogos de oligorribonucleótidos las moléculas que puedan considerarse de carácter híbrido, en las que unas unidades presentan modificaciones y otras no, así como los híbridos entre análogos de ácidos nucleicos y péptidos o, incluso, las moléculas híbridas en las que algunas de las unidades nucleotídicas son ribonucleótidos (o análogos de los mismos) y otras son desoxirribonucleótidos (nucleótidos donde el azúcar es desoxirribosa), así como los análogos de estos últimos, es decir, los híbridos RNA-DNA y los análogos de ellos.

Para los propósitos de la presente invención, se consideran incluidos dentro de las moléculas de naturaleza oligorribonucleotídica o los análogos de oligorribonucleótidos los inhibidores, bloqueantes o antagonistas de miRNAs de los tipos conocidos como antagomiRs, blockmiRs, antimisRs y las esponjas de miRNAs.

Así, por ejemplo, en el Ejemplo 1 de la presente memoria se utilizan moléculas que corresponden a este grupo de compuestos y que están formados por varias unidades de ribonucleótidos, las esponjas de miRNAs o miRNAs esponja (en inglés, *microRNA sponges*), que son transcritos expresados desde promotores fuertes que contienen

múltiples sitios de unión a un microRNA de interés, colocados en tándem. Los miRNAs esponja habitualmente están diseñados de manera que inhiben miRNAs con un fragmento heptamérico u octamérico complementario (región semilla), de forma que una única construcción esponja puede utilizarse para bloquear toda una familia de miRNAs que compartan el mismo motivo, aunque también pueden contener toda la secuencia diana para un miRNA específico. El término “construcción esponja” se utiliza a veces indistintamente para hacer alusión a los vectores a partir de los cuales se expresan los miRNAs esponja y a las moléculas de RNA expresadas a partir de los mismos. Por cuestiones de claridad, en la presente memoria, se ha procurado reservar el término “construcción esponja” para el vector a partir del cual se expresa el miRNA esponja como tal o bien para el fragmento específico del vector que codifica el miRNA esponja expresado, pero se habla del efecto de dichas construcciones cuando se alude a los efectos encontrados cuando se ha producido la expresión de los correspondientes miRNAs esponja en las células o tejidos en ensayo.

Dado que las esponjas de miRNAs no son totalmente específicas, sino que pueden bloquear, silenciar o inhibir varios miRNAs que compartan un mismo motivo, para evitar en lo posible efectos no deseados y que se vean afectados genes que no tienen ninguna implicación en la DM1, en la presente invención se tiene preferencia por inhibidores específicos de los grupos de los llamados blockmiRs, los antimiriRs o los antagonimiRs, especialmente por estos últimos. En los tres casos se trata de oligonucleótidos con modificaciones químicas que impiden que una serie de moléculas se unan a un lugar concreto de una molécula de mRNA, aunque hay algunas diferencias entre ellos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los blockmiRs son pequeños RNAs de química especial diseñados contra la secuencia que un miRNA concreto detecta en un RNA mensajero (mRNA) concreto, por lo que, en un principio, cada uno de ellos sólo debería desreprimir el efecto de ese miRNA sobre ese transcrito, siendo esperable un efecto muy específico. Por tanto, se diseñan de forma que tengan una secuencia que sea complementaria a la de un fragmento de la secuencia de un mRNA que sirve como sitio de unión para un miRNA, de tal forma que se suelen unir en el extremo 3' de la región no traducida (UTR) de un mRNA, es decir, en la zona en la que se suelen unir los miRNAs endógenos.

Los antagonimiRs, en cambio, se utilizan en general para silenciar miRNAs endógenos. Por tanto, se denomina antagonimiRs a pequeños RNAs sintéticos, químicamente modificados con respecto al correspondiente oligómero de RNA compuesto sólo por unidades de ribonucleótidos, y que son complementarios a un miRNA diana. Por tanto, pueden

considerarse análogos de oligonucleótidos que se unen específicamente a miRNAs concretos y, por ello, actúan como inhibidores/bloqueantes de miRNAs. Como un miRNA puede tener muchos transcritos diana, el uso de antagomiRs puede dar lugar en ocasiones a efectos colaterales indeseables, por quedar afectados mRNAs que no se deseaba modular. Habitualmente, los antagomiRs incluyen modificaciones químicas en sus unidades, en comparación con los ribonucleótidos, tales como grupos 2-O-metilo, fosforotioatos y restos de colesterol conjugados; también es habitual que incluyan al menos una modificación que o bien dé lugar a algún tipo de impedimento para la actuación de la proteína Ago2 o bien a un apareamiento imperfecto entre el antagomiR y el miRNA diana, evitando con ello que se produzca la escisión mediada por Ago2. Tal como recogen Wang *et al.* en su revisión sobre implicaciones de microRNAs en enfermedades hepáticas (Wang *et al.*, 2012), se ha informado de que los antagomiRs inhiben su miRNA diana, de manera dependiente de dosis, en diferentes tejidos de ratones cuando se administran por vía intravenosa como moléculas desnudas. Entre otros efectos, se conoce que un antagomiR del miR-221 fue capaz de bloquear el crecimiento de xenoinjertos de tumores de HCC en ratones y prolongar su supervivencia. La vía cutánea también es una vía habitual de administración de antagomiRs.

Por su parte, los antimiriRs, habitualmente son complementarios a sólo una parte del miRNA maduro que es su diana, la llamada región semilla, pero se unen a él con gran afinidad, debido a que presentan modificaciones que incrementan en gran medida la unión con su diana, tales como las propias de los LNAs antes descritas o, en ocasiones también, como ya se ha comentado, la metilación en 5' de la base nitrogenada citosina (C), lo que también parece incrementar la estabilidad de los dúplex que se forman con la diana. Rottiers *et al.* observaron no sólo la inhibición efectiva de familias de miRNAs utilizando antimiriRs dirigidos a la región semilla de dichos miRNAs, de sólo 8 unidades de análogos de nucleótidos con modificaciones tipo LNA, sino también la eficacia y seguridad de estos tratamientos a largo plazo en primates no humanos. Tal como recogen también Wang *et al.*, en la referencia antes citada (Wang *et al.*, 2012), estas pequeñas moléculas presentan una potente actividad en todo un rango de tejidos de ratón, rata, mono y chimpancé tras su administración sistémica como moléculas desnudas, a dosis considerablemente menores que las de otros inhibidores. El antimiriR SPC3649, por ejemplo (Landford *et al.*, 2010) se ha utilizado en estudios clínicos en fase 2a para pacientes con infección crónica del virus de la hepatitis C (ClinicalTrials.gov No. NCT01200420).

Como puede deducirse de las definiciones anteriores, el diseño de inhibidores /

antagonistas de microRNAs parte habitualmente de una secuencia básica de ribonucleótidos corta, que puede ser la secuencia complementaria al microRNA a inhibir (es lo habitual en antagomiRs y antimiriRs, así como también en esponjas de microRNAs) o bien la secuencia del propio microRNA o una secuencia complementaria a una zona del mRNA al que se une el microRNA (caso de los blockmiRs). Tal como se utiliza en la presente memoria, se entiende que dos cadenas de moléculas de naturaleza nucleotídica son complementarias en un 100% (o, como se expresa de forma más abreviada en la presente memoria, que sus secuencias son complementarias) cuando la secuencia de nucleótidos o análogos de nucleótidos de una de ellas, leída en sentido 5'-3', es la secuencia de los nucleótidos o análogos de nucleótidos que presentan las bases nitrogenadas con las que se aparean las bases nitrogenadas de los nucleótidos o análogos de nucleótidos de la otra secuencia, leída en sentido 3'-5'. Es decir, la secuencia 5'-UAGC-3' sería complementaria a las secuencias 3'-AUCG-5' (en el caso de ser las unidades ribonucleótidos o análogos de ribonucleótidos) y 3'-ATCG-5' (en el caso de ser las unidades dexosirribonucleótidos o análogos de dexosirribonucleótidos), que serían, respectivamente, las secuencias 5'-GCUA-3' y 5'-GCTA-3' en sentido 5'-3'. En algunos casos, particularmente en el diseño de antimiriRs, es importante que la molécula antagonista comprenda un fragmento que es idéntico a la secuencia complementaria a la de la región semilla del microRNA al que quiere antagonizar, al menos en lo que se refiere a la complementariedad de las bases nitrogenadas. Y es que a menudo, especialmente en el caso de los antagomiRs y los antimiriRs, se incorporan modificaciones a las correspondientes unidades de ribonucleótidos, que afectan principalmente al residuo de la ribosa y/o al fosfato, modificaciones que son difíciles de indicar en las representaciones habituales de secuencias de nucleótidos, donde el nucleótido presente en una determinada posición se identifica por la abreviatura de la base nitrogenada que forma parte del mismo. Por ello, en la presente invención, se encuentran comparaciones de moléculas de antagonistas de microRNAs que hacen referencia al porcentaje de identidad entre las secuencias de las bases nitrogenadas de las unidades de ribonucleótidos o análogos de ribonucleótidos presentes en dichas unidades, pues es lo que puede indicar si dos moléculas o fragmentos de secuencia están diseñadas partiendo de la misma secuencia de ribonucleótidos básica de partida, aunque se le hayan podido incorporar a los ribonucleótidos distintas modificaciones químicas en cada caso.

Para diseñar las moléculas antagonistas, es importante tener en cuenta que exista suficiente complementariedad con las moléculas endógenas a las que deban unirse para que realmente se produzca el efecto de inhibición / antagonismo / silenciamiento deseado. En ese sentido, pueden tenerse en cuenta ejemplos de que la

complementariedad “típica” entre un miRNA y su diana puede ser del 50% (ver, por ejemplo, la referencia <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/detail.php?mirtid=MIRT000125#target>), por lo que es recomendable que la molécula de naturaleza oligorribonucleotídica de la invención

5 comprenda un fragmento de secuencia de unidades de ribonucleótidos, o de análogos de ribonucleótidos, en el que la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de ribonucleótidos o de análogos de ribonucleótidos es idéntica al menos en un 50% (o al menos en un 55%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100%), a la secuencia complementaria a la del fragmento de la

10 molécula endógena con la que se tenga que aparear, es decir, a la secuencia del microRNA endógeno con el que se deba unir (en el caso de antagomiRs y de la secuencia repetitiva de las esponjas de miRNAs) o la secuencia del fragmento del mRNA mensajero (en el caso de blockmiRs). En el caso de antagomiRs, cuya longitud suele ser aproximadamente igual a la de los miRNAs cuya acción tienen que antagonizar, se

15 prefiere especialmente que la secuencia de las bases nitrogenadas de sus unidades de ribonucleótidos o de análogos de ribonucleótidos sea idéntica al menos en un 80% (o al menos en un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100%), a la secuencia complementaria a la del microRNA endógeno al que tienen que antagonizar; este es el criterio que se ha seguido para el diseño de antagomiRs contra

20 los microRNAs humanos miR-218-5p y miR-23b-3p. En el caso de los antimiriRs, lo más importante es que comprendan un fragmento en el que la secuencia de las bases nitrogenadas de los nucleótidos o análogos de nucleótidos sea complementaria (preferiblemente, complementaria al 100%) a la secuencia de las bases nitrogenadas de los nucleótidos de la región semilla del miRNA maduro que es su diana, por lo que la

25 complementariedad en el resto de los nucleótidos o análogos de nucleótidos que estén presente en el antimiriR, de haberlos, es menos importante.

El alineamiento de secuencias para su comparación se puede llevar a cabo con los algoritmos de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981); o Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970); mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson

30 and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444 (1988); o mediante las aplicaciones informáticas basadas en dichos algoritmos y metodologías, incluidas pero sin limitarse a: CLUSTAL, en el programa PC/Gene de Intelligenetics (Mountain View, California, EE.UU.); GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics (Genetics Computer Group (GCG), Wisconsin EE.UU.) En particular,

35 los programas de la familia BLAST, que están basados en el algoritmo de Altschul et al. (Altschul *et al.*, 1990), son de acceso público (por ejemplo, a través de la página del

Centro Nacional para la Información Biotecnológica de EE.UU. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pueden utilizarse para realizar búsquedas y cálculos de identidad, y en especial, para los propósitos de la invención, BLASTN, dedicado a nucleótidos.

5 Como puede verse en los ensayos que se describen y divulgan en los Ejemplos de la presente memoria, los presentes inventores han partido de la realización de una prueba de concepto en un modelo de DM1 de *Drosophila melanogaster*, en el que se sobreexpresan repeticiones de trinucleótidos CUG en el músculo. Este modelo se utilizó para explorar el potencial terapéutico del silenciamiento de microRNAs específicos  
 10 (miRNAs) impulsando con ello la expresión de *muscleblind*. Los ensayos realizados con dicho modelo, descritos en el Ejemplo 1, demuestran que es posible la regulación al alza de las proteínas *muscleblind* endógenas de *Drosophila* mediante el secuestro de miRNAs que modulan negativamente su expresión, concretamente mediante el uso de construcciones “esponja”. Para ello, se partió de un juego de miRNA identificados como  
 15 potenciales reguladores de *muscleblind*, encontrando que sólo el silenciamiento específico de dos de los miRNAs del juego inicial, *dme-miR-277* o *dme-miR-304*, dio lugar al efecto directo deseado: un aumento de los niveles tanto de la proteína *muscleblind* como del correspondiente mRNA. Esta regulación al alza tuvo como resultado la reversión de varios eventos de *splicing* erróneos y, con ello, el rescate de  
 20 varios fenotipos parecidos a los síntomas de la DM1, como la reducción de la atrofia muscular. Las moscas en las que se llevó a cabo el ensayo mostraron una mejora de la función muscular en los ensayos de vuelo y de ascenso por superficies y un incremento de la esperanza de vida.

Análogamente, la presente memoria describe la identificación, en células HeLa, de  
 25 potenciales miRNAs que podrían regular negativamente MBNL en seres humanos (MBNL1 y/o MBNL2), la selección de aquellos que efectivamente parecían tener efectos reguladores, la comprobación en modelos animales, concretamente de ratón, de su expresión en tejidos de interés generalmente afectados en casos de DM1, el diseño de inhibidores (concretamente antagomiRs) para unos miRNAs concretos, comprobación de  
 30 la efectividad de los mismos para aumentar la expresión de MBNL1 y/o MBNL2 en mioblastos humanos y verificación de que se corresponde con el rescate de varios eventos de *splicing* alternativo típicamente alterados en mioblastos de pacientes aquejados de DM1. Estos ensayos, unidos a la prueba de concepto anterior realizada en *Drosophila*, demuestran la eficacia de la estrategia diseñada.

35 La prueba de concepto realizada en *Drosophila*, descrita en el Ejemplo 1, es también

significativa porque mostró algunos hechos notables, a tener en cuenta para el diseño de inhibidores, bloqueadores o silenciadores específicos de miRNAs, en particular para su aplicación en el tratamiento de la DM1 en mamíferos, especialmente en humanos. En particular, merecen comentarse los siguientes:

- 5 - Como se ha comentado, aunque se partió de un juego de miRNA identificados como potenciales reguladores de *muscleblind* a partir de datos anteriores de los presentes inventores y de análisis bioinformáticos, sólo el silenciamiento de dos ellos, *dme-miR-277* (SEQ ID NO:29) y *dme-miR-304* (SEQ ID NO:30), dio lugar a la regulación al alza de la expresión del gen de *Drosophila muscleblind*, tanto a nivel
- 10 de mRNA como de las propias proteínas. Por tanto, la simple identificación de motivos estructurales que puedan hacer indicar que un miRNA pueda tener un efecto en la regulación de la expresión de *MBNL1* y/o *MBNL2* no garantiza que sea un miRNA con efecto negativo en su expresión ni que el diseño de un inhibidor específico del mismo pueda dar lugar a los efectos deseados sobre la elevación de
- 15 los niveles de una y/u otra proteína, en especial cuando lo que se desea es que dicho incremento de los niveles de las proteínas se produzca en los tejidos adecuados y se vea acompañado por una mejora en los síntomas de la DM1.
- También es interesante comentar que el análisis cuantitativo confirmó que cada construcción esponja daba lugar a la elevación de los niveles de diferentes isoformas de *muscleblind*. Curiosamente, ambas construcciones esponja, *miR-277SP* y *miR-304SP* (las construcciones esponjas diseñadas, específicamente, para silenciar *dme-miR-277* y *dme-miR-304*), fueron capaces de regular negativamente la expresión de las isoformas *mbIB* y *mbIC*, respectivamente, en lugar de aumentar la expresión, lo que sugiere algún tipo de regulación interisoforma, tal como se ha demostrado previamente para las proteínas MBNL (Kino *et al.*, 2015; Terenzi *et al.*, 2010). Este hecho indujo a los presentes inventores a plantearse la identificación en células humanas de miRNAs que fueran o bien inhibidores de *MBNL1* o de *MBNL2* o de ambas, para controlar posibles efectos reguladores o compensatorios entre ambas proteínas o entre los miRNAs
- 20 que regulan su expresión.
- 25 - Los ensayos de inmunodetección de la proteína en el tejido muscular de moscas que expresaban una de las construcciones esponja, *miR-304SP* y *miR-277SP*, demostraron la sobreexpresión de *Muscleblind* en ambos casos, aunque en diferentes localizaciones subcelulares: *miR-277SP* provocó un incremento preferentemente en bandas sarcoméricas y *miR-304SP* en los núcleos. Merece
- 30
- 35

mencionarse que en ninguno de los dos casos se detectó la retención de Muscleblind en foci ribonucleares los cuales no se detectan en secciones de IFMs de tórax de mosca mediante una sonda diseñada para detectar las expansiones (sonda “CAG”). Finalmente, consistentemente con los conocimientos previos que indican que la isoforma MbIC se localiza en el núcleo y con regulación preferencial de la expresión de MbIC por parte de *miR-304SP*, pudo confirmarse que la expresión de *miR-304SP* permitió rescatar un número de eventos de *splicing* erróneos dependientes de Muscleblind. Tomándolos en conjunto, estos datos confirman que la regulación al alza de muscleblind conseguida mediante el silenciamiento de miRNAs reguladores específicos es suficiente para rescatar las características moleculares críticas alteradas en modelos de DM1 en moscas.

- En el Ejemplo 1 se describe también el efecto positivo de la expresión de las construcciones esponja *miR-277SP* y *miR-304SP* sobre la recuperación de la atrofia muscular, que es un fenotipo característico de DM1.

- Expresando las construcciones esponja con el conductor (“driver”) *Mhc-Gal4*, también se probaron los efectos de la sobreexpresión de Muscleblind a largo plazo. En las moscas control, se observó que la expresión de *miR-304SP*, provocó un aumento de 6 veces en la expresión relativa de *muscleblind* y no tuvo efecto sobre el área del músculo, la supervivencia o la función del aparato locomotor. Sin embargo, la expresión de *miR-277SP*, que produjo una regulación al alza de 15 veces de *muscleblind*, causó una reducción significativa en el área de músculo, que se correlaciona con una disminución de la altura de aterrizaje. En un fondo que expresa CTG, sin embargo, la expresión de cualquiera de las construcciones esponja provocó efectos beneficiosos, lo que sugiere que la sobreexpresión limitada de transcritos de dianas naturales adicionales de los miRNAs bloqueados es insignificante en comparación con los efectos positivos de estimular la expresión de *muscleblind*. Esto es importante, porque podrían producirse efectos deletéreos de *miR-277SP* por la sobreexpresión de varias de sus dianas, además de *muscleblind*, dado que *dme-miR-277* es uno de los miRNAs con la más alta expresión en el músculo. Estudios previos han confirmado que la sobreexpresión a largo plazo de MBNL1 en modelos de ratón es bien tolerada cuando se limita al músculo esquelético. La sobreexpresión de *MBNL1*, incrementada en el intervalo de 10 a 17 veces, no causó ninguna histopatología detectable o anomalías funcionales (Chamberlain & Raum, 2012). Estos resultados se interpretaron como un respaldo a la estrategia de intentar inhibir / silenciar / disminuir / antagonizar la actividad de

miRNAs específicos implicados en la regulación negativa de las proteínas *MBNL1* y/o *MBNL2* en mamíferos, particularmente humanos, como un medio para paliar los síntomas de DM1, sin producir efectos secundarios indeseables en otras funciones del individuo que está necesitado de recibir el tratamiento.

- 5 Así, estos resultados indicaron que el bloqueo de miRNAs represores de MBNL en humanos u otros mamíferos podría igualmente reducir los síntomas de DM1, proporcionando una prueba de concepto del potencial terapéutico de la regulación al alza de Muscleblind mediante bloqueadores de miRNAs específicos en pacientes con DM1. Así, el estudio con el modelo de *Drosophila* de la DM1 divulgado en la presente memoria
- 10 sienta las bases para la evaluación de los bloqueadores de miRNAs que reprimen la expresión de muscleblind (o, más bien, de las proteínas homólogas en mamíferos como los seres humanos) como diana terapéutica válida y eficaz para el tratamiento de la DM1.

Con esta base, los presentes inventores abordaron un estudio de identificación de posibles miRNA represores de las proteínas humanas *MBNL1* y/o *MBNL2*, para

15 comprobar después si podía utilizarse una estrategia análoga de inhibir/bloquear uno o varios de dichos miRNAs para aumentar los niveles de las proteínas *MBNL1* y/o *MBNL2* y, con ello, conseguir rescatar fenotipos característicos de DM1, como prueba de que la inhibición de dichos miRNAs podía servir para el tratamiento de síntomas característicos de dicha enfermedad.

- 20 Tal como se describe en el Ejemplo 2, se realizó un cribado (“*screening*”) inicial, para identificar potenciales represores de uno de dichos genes o de ambos, que identificó un total de 23 microRNAs candidatos, entre los cuales se hizo una preselección a partir de programas bioinformáticos, seleccionando aquellos para los que se habían predicho dianas de unión en las regiones 3' UTR de uno o de los dos genes. Sin embargo, los
- 25 ensayos de validación realizados indicaron que sólo algunos de los microRNAs preseleccionados, efectivamente daban lugar a una disminución de los niveles de la correspondiente proteína (*MBNL1* o *MBNL2*) producto de los genes que en principio eran regulados por dicho miRNA, incluso aunque se confirmó por aplicaciones bioinformáticas complementarias la presencia de dianas de unión para el correspondiente microRNA en
- 30 la región 3' no traducida (3' UTR). La disminución de los niveles de proteína producidos, en los casos en los que realmente existió, tampoco fue del mismo nivel para todos los microRNAs, siendo más pronunciado en algunos casos, destacando los de los microRNAs miR-23b-3p (al que se alude en forma abreviada en la memoria como miR-23b) y miR-218-5p (al que se alude en forma abreviada en la memoria como miR-218).
- 35 Esto muestra, como ya apuntaban los ensayos previos realizados en el modelo de

*Drosophila*, que la identificación de hipotéticas dianas de unión en la 3'UTR del RNA mensajero de un gen o de otros motivos que puedan indicar una supuesta interacción no garantiza ni hace esperable que un microRNA realmente sea un modulador de un gen, preferiblemente directo, ni que el bloqueo o inhibición de dicho microRNA realmente dé  
5 lugar a la modulación deseada que, en este caso, era un aumento de los niveles de la proteína MBNL1 y/o de la proteína MBNL2.

Además, se comprobó si los miRNAs preseleccionados se expresaban en los órganos más afectados por los síntomas característicos de la enfermedad, como son órganos del Sistema Nervioso Central tales como el cerebro, el cerebelo o el hipocampo, así como el  
10 músculo esquelético y el corazón. Los ensayos realizados con diferentes tejidos de ratón mostraron que la expresión de los microRNAs endógenos de dicho animal miR-23b y miR-218 en distintos tejidos relacionados con los órganos citados (cerebro anterior, cerebelo, hipocampo, corazón, cuádriceps y gastrónomo) fueron muy superiores a las de los restantes microRNAs preseleccionados, especialmente en el caso del miR-23b, que  
15 fue muy superior en todos los tejidos. Estos datos indican que la inhibición de los mismos microRNAs podría servir para tratar casos de distrofia miotónica 1 en otros mamíferos.

También se realizaron determinaciones de expresión génica a partir de biopsias musculares de seres humanos, observándose que los niveles de miR-218 y miR-23b estaban claramente incrementados en los pacientes de DM1 con respecto a los controles  
20 no aquejados por la enfermedad. También se observó un incremento del miR-218 en los fibroblastos obtenidos de pacientes con DM1 respecto a los controles. Estos datos son interesantes pues, tomados en conjunto con los ensayos de eficacia realizados con antagomiRs en el Ejemplo 3, indican que los cultivos de líneas establecidas o los cultivos primarios de células obtenidas de tejidos de interés de pacientes, como pueden ser los  
25 miocitos de músculo esquelético, pueden ser de utilidad para realizar ensayos y comprobar la eficacia de posibles bloqueantes o inhibidores de distintos miRNAs y observar si ciertas alteraciones moleculares características de la enfermedad muestran una mejora o resultan paliadas mediante los inhibidores en ensayo, como una indicación de un efecto paliativo de síntomas de la enfermedad. Y eso es importante para facilitar  
30 los estudios, pues los modelos de ratón existentes no reproducen todos los síntomas de la enfermedad humana, sino principalmente los síntomas relacionados con la disfunción muscular.

Estos ensayos, junto con los ensayos de comprobación de la interacción directa de los microRNAs miR-218 y miR-23b con los correspondientes mRNAs mensajeros (véase el  
35 ensayo con la luciferasa de *Gaussia*), dieron lugar a que se eligieran estos microRNAs

como los microRNAs de preferencia a inhibir / antagonizar, para los cuales desarrollar inhibidores / antagonistas.

Los microRNAs miR-218-5p y miR-23b-3p, al contrario que otros microRNAs inicialmente ensayados, tienen en común que cumplen las características que se buscaba que debían  
 5 cumplir los microRNAs candidatos a desarrollar inhibidores contra ellos con el objetivo de paliar síntomas característicos de la DM1, como son:

- Ambos parecen ser microRNAs represores de al menos uno de los genes sobre los que se deseaba actuar, los genes homólogos en seres humanos del gen *muscleblind* de *Drosophila*, *MBNL1* o *MBNL2*, represores que, según los  
 10 ensayos del Ejemplo 2, tienen una acción directa sobre los correspondientes RNAs mensajeros, lo que disminuye el riesgo de que sus potenciales inhibidores afecten otras rutas o vean disminuido su efecto mediante la regulación endógena de pasos intermedios necesarios hasta que se produjera su acción sobre los genes deseados.
- Ambos muestran expresión en tejidos de órganos relacionados con síntomas característicos de la enfermedad, como las alteraciones musculares, tanto las relacionadas con la movilidad como las cardíacas, o las alteraciones neurológicas. En particular, ambos muestran un incremento claro en sus niveles en muestras de biopsias musculares de pacientes con DM1, por lo que  
 15 los ensayos de bloqueo o inhibición de esos microRNAs en células y la observación de sus efectos sobre alteraciones moleculares relacionadas con la enfermedad, tales como las alteraciones del *splicing* alternativo, pueden ser indicativas de la efectividad de su bloqueo o inhibición para paliar síntomas de la enfermedad.

25 A pesar de estas coincidencias, que muestra que la elección preferencial de estos microRNAs para proceder a su bloqueo o inhibición responde a un mismo concepto inventivo, debe destacarse la diferencia significativa entre ellos de que el miR-218 es sólo represor de *MBNL2*, mientras que miR-23b es represor tanto de *MBNL1* como de *MBNL2*. Además, miR-218 está significativamente aumentado en biopsias musculares de  
 30 pacientes (miR-23b muestra una tendencia al alza, aunque no significativa en los datos experimentales disponibles) de modo que su bloqueo no solo anticipa la desrepresión de *MBNL2*, que ya se sabe que es una diana terapéutica, sino que mitigará los efectos aguas abajo que la sobreexpresión de miR-218 pudiera estar provocando sobre otros transcritos musculares, constituyendo por tanto una diana terapéutica en sí misma.

Además, aunque los ensayos presentados en la presente memoria confirman la expresión de ambos microRNAs en tejidos de interés relacionados con síntomas de la enfermedad, la búsqueda de los tejidos de expresión en la base de datos miRGator, versión 3.0 (v3.0) (<http://mirgator.kobic.re.kr>) revela algunas diferencias entre ambos microRNAs, presentando el miR-23b un abanico de tejidos más amplio. En concreto, según miRGator v3.0, miR-218 se expresa en: tejido adiposo, cerebro, sistema nervioso central, riñón, corazón, hígado y sistema biliar, pulmón, faringe, nasofaringe, nariz, placenta, bazo, células madre, testículo, útero; miR-23b, por su parte, se expresa en: sistema nervioso central, tracto gastrointestinal, tejido adiposo, mama, vejiga, corazón, queratinocitos, riñón, hígado y sistema biliar, pulmón, células linfoides, nariz, faringe, placenta, próstata, piel, bazo, células madre, testículo, glándula tiroides y útero. Así, puede considerarse una posible realización de la invención una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica y/o un análogo de oligorribonucleótido que es un antagonista de un microRNA que regula a la baja la expresión del gen humano *MBNL1* y/o *MBNL2*, o a una mezcla de dos o más de dichas moléculas y que se expresa al menos en uno o más órganos seleccionados del grupo de cerebro, cerebelo, hipocampo u otro órgano del sistema nervioso central, músculo esquelético, corazón, tejido adiposo, riñón, hígado y sistema biliar, pulmón, faringe, nasofaringe, nariz, placenta, bazo, testículo, útero, tracto gastrointestinal, mama, vejiga, próstata, piel, queratinocitos y células linfoides o en una o más células de un cultivo primario de uno de dichos órganos o de una línea celular establecida derivada de uno de dichos órganos (incluidas las células madre pluripotentes inducidas, conocidas por sus siglas en inglés iPSCs: *induced pluripotent stem cells*) o células madre de uno de dichos órganos. La elección del microRNA concreto a antagonizar, particularmente, la elección concretamente entre el microRNA-218-5p humano o del microRNA-23b-3p humano, determinará también el abanico de tejidos donde puede ejercerse el efecto antagónico. Por otro lado, la administración del antagonista mediante un posible vector de expresión del mismo puede permitir dirigir la expresión a un tejido o grupo de tejidos concretos en función del tropismo del propio vector de base y/o mediante la elección de elementos de control que den lugar a la expresión de la secuencia codificante ligada a los mismos sólo en tejidos concretos. Además, algunas formas de dosificación concretas pueden favorecer un mayor acceso a unos u otros órganos. Así, puede considerarse también que una posible realización, combinable con cualquiera otra, del aspecto de la presente invención más directamente referido a la aplicación terapéutica de la misma, podría enunciarse como: uso de una de las moléculas de naturaleza oligorribonucleotídica o un análogo de oligorribonucleótido de la invención, una mezcla de dos o más de ellas, o una composición que comprende al

menos una de dichas moléculas, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia miotónica tipo 1 mediante la inhibición o el antagonismo de la acción de un microRNA que regula a la baja la expresión del gen humano *MBNL1* y/o *MBNL2* en al menos uno o más órganos seleccionados del grupo de cerebro, cerebelo, hipocampo u otro órgano del sistema nervioso central, músculo esquelético, corazón, tejido adiposo, riñón, hígado y sistema biliar, pulmón, faringe, nasofaringe, nariz, placenta, bazo, testículo, útero, tracto gastrointestinal, mama, vejiga, próstata, piel, queratinocitos y células linfoides o células madre de uno o más de dichos órganos. Dado que se tiene especial preferencia por la inhibición o acción antagónica sobre el microRNA-218-5p humano, también se tiene porque el órgano u órganos se seleccionen del grupo de cerebro, cerebelo, hipocampo u otro órgano del sistema nervioso central, músculo esquelético, corazón, tejido adiposo, riñón, hígado y sistema biliar, pulmón, faringe, nasofaringe, nariz, placenta, bazo, testículo y útero o células madre de uno de dichos órganos, mientras la elección del miR-23b-3p permite extender las posibilidades de elección, según el conocimiento actual, al menos a tracto gastrointestinal, mama, vejiga, próstata, piel, queratinocitos y células linfoides o células madre de uno o más de dichos órganos, o combinaciones de los mismos, según se desee o se vea conveniente.

Los microRNAs humanos miR-218-5p (miR-218) y miR-23b-3p (miR-23b) difieren también en la secuencia de ribonucleótidos que los componen, así como en su región semilla, lo cual se debe tener en cuenta para el diseño de inhibidores / silenciadores / antagonistas específicos de cada uno de ellos. Se muestran a continuación las secuencias de sus versiones maduras, donde aparece en negrita la región semilla de cada uno de ellos, y el código de acceso a las mismas (MIMAT) en la base de datos de miRbase ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)):

miR-128-5p (MIMAT000275): 5'- **UUGUGCUU**GAUCUAACCAUGU-3' (SEQ ID NO:3)  
 miR-23b-3p (MIMAT0000418): 5'-**AUCACAUUGCCAGGG**AUUACC-3' (SEQ ID NO:4)

Aunque los ensayos realizados en el modelo de *Drosophila* demostraron la viabilidad de la inhibición de la acción de microRNAs represores mediante esponjas de microRNAs, y los ensayos de unión de los microRNAs miR-218 y miR-23b a las 3' UTR indicaron que el desarrollo de blockmiRs es también una estrategia posible para el bloqueo/inhibición de la acción de los microRNAs miR-218 o miR23b, los presentes inventores prefirieron optar por los antagomiRs, debido a que, como se explicó antes, las modificaciones químicas que generalmente se realizan sobre ellos dan lugar a un aumento de la estabilidad que es interesante para su posible administración directa a seres humanos, así como porque también la adición de restos lipofílicos o de naturaleza lipídica que a menudo se

incorporan en alguno de sus extremos suele facilitar su entrada en las células. Es por ello que los antagomiRs han sido los inhibidores de preferencia con la que se continuaron los ensayos, entre las posibles opciones para el desarrollo o identificación de una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica y/o un análogo de oligorribonucleótido que es un  
5 inhibidor de un microRNA que regula a la baja la expresión del gen humano *MBNL1* y/o *MBNL2*, para su uso en el tratamiento de la distrofia miotónica 1, y en especial entre los inhibidores del microRNA-218-5p humano o del microRNA-23b-3p humano.

Como puede verse en el Ejemplo 3, los antagomiRs específicos desarrollados, denominados antagomiR-218 y antagomiR-23b, presentan determinadas modificaciones  
10 químicas habituales en este tipo de análogos de oligorribonucleótidos, como las modificaciones 2'-O-metilo (2'-metoxi) en todos los restos de ribosa, la sustitución de algunos enlaces fosfato entre las unidades monoméricas análogas de nucleótidos por fosforotioato o la incorporación de restos de colesterol en un extremo de la molécula, concretamente en el extremo 3', aunque, como se detalló más arriba, son posibles otras  
15 distintas modificaciones, que darían también moléculas compatibles con la presente invención.

Los antagomiRs-23b y 218 demostraron ser capaces de penetrar en las células en los experimentos de transfección realizados. Los ensayos de toxicidad demostraron que las concentraciones que daban una señal apreciable de detección de dichos antagomiRs en  
20 células eran inferiores a la concentración inhibitoria que mata el 10% de las células (IC10) lo que apoya su seguridad y sus posibilidades de ser candidatos a moléculas para su uso para el tratamiento de la distrofia miotónica 1, además de permitir continuar con los ensayos.

Los ensayos de dosis respuesta realizados en mioblastos de pacientes de DM1 con uno  
25 u otro antagomiR, a diferentes dosis, mostraron que dichos antagomiRs son capaces de revertir el *splicing* aberrante de algunos genes que característicamente tienen ese proceso alterado en pacientes de DM1, lo que apoya su uso para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia miotónica 1, en particular para paliar síntomas de la enfermedad, especialmente síntomas que se corresponden con la  
30 disfunción muscular. No hubo coincidencia absoluta entre los eventos revertidos por uno u otro antagomiR, ni sobre las concentraciones preferenciales, por lo que la combinación de ambos podría ser interesante en algunos casos, aunque en otros podría mostrarse preferencia por el antagomiR-218.

Dada la estabilidad de los antagomiRs, es posible plantearse su administración a seres

humanos directamente, por ejemplo por vía subcutánea o sistémica, preferiblemente por vía intravenosa, por ejemplo disueltos o en suspensión en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como agua o alguna solución acuosa como, por ejemplo, suero salino o tampón fosfato. La composición en la que se administren puede contener excipientes  
5 farmacéuticamente aceptables.

Están también comprendidas dentro del alcance de la presente invención, las composiciones que comprendan uno de estos antagomiRs o sus mezclas, así como cualquier otro antagomiR dirigido contra el microRNA-218-5p humano o el microRNA-23b-3p humano o mezclas de ellos, o en general cualquier molécula de naturaleza  
10 oligorribonucleotídica y/o análogo de oligorribonucleótido que sea un inhibidor de uno de dichos microRNAs o de otro microRNA que regula a la baja la expresión del gen humano *MBNL1* y/o *MBNL2*, incluidas las composiciones que comprendan también un vehículo y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Además, dada la relación directa entre los vectores de expresión que expresen esponjas de miRNAs o, incluso, precursores de los  
15 microRNAs maduros que finalmente tienen efecto represor, se considera que está también comprendida dentro del alcance de la presente invención una composición que comprenda un vector de expresión de una de dichas moléculas de naturaleza oligorribonucleotídica, en particular los vectores que comprende la secuencia codificante de una esponja de microRNA que comprende múltiples sitios colocados en tándem  
20 complementarios al microRNA-218-5p humano o al microRNA-23b-3p humano o una mezcla de múltiples sitios de unión colocados en tándem complementarios a cada uno de ellos.

Para su aplicación clínica, las composiciones de la presente invención, que se considerarán entonces composiciones farmacéuticas de la presente invención, se pueden  
25 preparar en una forma adecuada para la aplicación deseada. Tal como se recoge en publicaciones también relacionadas con la aplicación clínica de inhibidores / antagonistas de microRNAs, como la solicitud internacional WO2012148373A1, generalmente esto implicará la preparación de composiciones que estén esencialmente libres de pirógenos, así como de otras impurezas que podrían ser perjudiciales para los seres humanos o  
30 animales. Dicha solicitud internacional WO2012148373A1 tiene por objeto compuestos análogos a los de la presente invención y aplicaciones terapéuticas de los mismos, por lo que la información sobre formas de preparación y presentación de composiciones farmacéuticas, posibles vehículos de administración adecuados, o formas y vías de administración pueden considerarse aplicables a la presente invención y puede tomarse  
35 como referencia para las composiciones de la presente invención. Parte de dicha

información se reproduce más abajo.

En una posible realización, la composición farmacéutica comprende una dosis eficaz de un inhibidor o antagonista del microRNA-218-5p humano o del microRNA-23b-3p humano o una mezcla de los mismos. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender un inhibidor/antagonista del microRNA-218-5p humano o del microRNA-23b-3p humano, o mezclas de los mismos. Preferiblemente, el inhibidor/antagonista del microRNA-218-5p humano presente es el inhibidor de tipo antagomiR utilizado en los ejemplos de la presente invención (representado por SEQ ID NO:10) y el inhibidor/antagonista del microRNA-23b-3p humano presente es el inhibidor de tipo antagomiR representado por SEQ ID NO:11. Más preferiblemente, el inhibidor(es)/antagonista(s) presentes estará presente a una concentración que permita la administración de una dosis terapéuticamente efectiva.

Una "dosis efectiva" o "dosis terapéuticamente efectiva" es una cantidad suficiente para efectuar un resultado clínico beneficioso o deseado. Una dosis efectiva de un inhibidor/antagonista de un microRNA, de acuerdo con los resultados previos obtenidos con moléculas dirigidas contra otros microRNAs, puede ser de aproximadamente 1 mg / kg a aproximadamente 100 mg / kg, aproximadamente 2,5 mg / kg a aproximadamente 50 mg / kg, o aproximadamente 5 mg / kg a aproximadamente 25 mg / kg. La determinación precisa de lo que se consideraría una dosis eficaz puede basarse en factores individuales para cada paciente, incluyendo su tamaño, edad, y la naturaleza del inhibidor o antagonista (por ejemplo, si es una construcción de expresión, un análogo de oligorribonucleótido tipo antagomiR o antimir...). Por lo tanto, las dosificaciones se pueden determinar fácilmente por los expertos normales en la técnica a partir de esta descripción y el conocimiento en la técnica. Puede ser necesario o conveniente administrar dosis múltiples al sujeto durante un periodo de tratamiento particular, administrando dosis diarias, semanales, mensuales, cada dos meses, cada tres meses o cada seis meses. En ciertas realizaciones, el sujeto recibe una dosis inicial en un primer momento que es mayor que una o más dosis posteriores o de mantenimiento.

Los sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microsferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, y liposomas, se pueden usar como vehículos de administración de los inhibidores/antagonistas de la presente invención, con los cuales se forma la composición farmacéutica de la invención. Las emulsiones grasas comercialmente disponibles que son adecuadas para la entrega de moléculas de naturaleza oligorribonucleotídica a un sujeto incluyen Intralipid®,

Liposyn®, Liposyn® II, Liposyn® III, Nutrilipid, y otras emulsiones de lípidos similares. Un sistema coloidal preferido para uso como vehículo de administración *in vivo* es un liposoma (es decir, una vesícula de membrana artificial). La preparación y uso de tales sistemas son bien conocidos en la técnica. Las formulaciones ejemplares también se describen en US 5,981, 505; Estados Unidos 6.217.900; Estados Unidos 6.383.512; Estados Unidos 5.783.565; Estados Unidos 7.202.227; Estados Unidos 6.379.965; US 6, 127,170; Estados Unidos 5.837.533; Estados Unidos 6.747.014; y WO03 / 093449, que se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

Otra posibilidad, como ya se ha comentado, es preparar las composiciones farmacéuticas de la invención utilizando sales y tampones apropiados para hacer que los vehículos de administración sean estables y ayudar en la captación por las células diana. Las composiciones de la presente invención pueden ser composiciones acuosas que comprenden una cantidad eficaz del vehículo de administración y que comprenden o bien las moléculas de naturaleza oligonucleotídica de la invención, de forma independiente o formando liposomas u otros complejos, o bien vectores de expresión de las mismas, disueltos o dispersos en un vehículo farmacéuticamente aceptable o medio acuoso. Las expresiones "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas o de otro tipo, cuando se administran a un animal o un ser humano. Tal como se usa en la presente memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, tampones, soluciones, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares aceptables para su uso en productos farmacéuticos de formulación, tales como productos farmacéuticos adecuados para la administración a seres humanos. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los ingredientes activos de la presente invención, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención. También se pueden incorporar en las composiciones ingredientes activos suplementarios, siempre que no inactiven las moléculas de la presente invención o sus vectores de expresión.

Las composiciones activas de la presente invención pueden administrarse por cualquiera de las vías comunes, siempre que el tejido diana esté disponible a través de esa ruta. Esto incluye las vías oral, nasal, o bucal y también, preferiblemente, la administración puede ser por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa. Como se ha comentado previamente, es habitual que las composiciones

que comprenden antagomiRs o antimiriRs se formulan para la administración intravenosa o subcutánea. A modo de ilustración, las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada de forma adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones  
5 también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen generalmente un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen, por ejemplo,  
10 soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Generalmente, estas preparaciones son estériles y fluidas en la medida que exista una fácil inyectabilidad. Las preparaciones deben ser estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como  
15 bacterias y hongos. Los disolventes apropiados o medios de dispersión pueden contener, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de  
20 dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por varios antibacterianos y agentes antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser  
25 provocada por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando los compuestos activos en una cantidad apropiada en un disolvente junto con cualesquiera otros ingredientes (por ejemplo, como se especifica anteriormente) como se desee, seguido de  
30 esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes deseados, por ejemplo, como se especifica anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación incluyen secado al vacío y  
35 liofilización técnicas que producen un polvo del ingrediente(s) activo(s) más cualquier

ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo previamente esterilizada por filtración.

Las composiciones de la presente invención generalmente se pueden formular en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) derivadas de ácidos inorgánicos (ácidos por ejemplo, clorhídrico o fosfórico), o de ácidos orgánicos (por ejemplo, acético, oxálico, tartárico, mandélico), y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres de la proteína también se pueden derivar de bases inorgánicas (por ejemplo, de sodio, potasio, amonio, calcio, o hidróxidos férricos) o de bases orgánicas (por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares).

En cualquier caso, se recomienda que la preparación de las composiciones de la presente invención siga prácticas que garanticen una calidad mínima para su uso en humanos, tal como las recogidas en la Guía de Buenas Prácticas de Fabricación de Ingredientes Farmacéuticos Activos del Grupo de Trabajo Q7 de la Conferencia Internacional sobre la Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Agentes Farmacéuticos para Uso Humano ("ICH Q7 Guideline. Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients", disponible en Internet en la dirección: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q7/Step4/Q7\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q7/Step4/Q7_Guideline.pdf), junto con su complemento de Preguntas y Respuestas, de 10 de junio de 2015, disponible en la dirección de Internet: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q7/ICH\\_Q7-IWG\\_QA\\_v5\\_0\\_14Apr2015\\_FINAL\\_for\\_publication\\_17June2015.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q7/ICH_Q7-IWG_QA_v5_0_14Apr2015_FINAL_for_publication_17June2015.pdf)).

Preferiblemente, se tendrán también en cuenta otras directrices de calidad de la misma procedencia, a las que se puede acceder a través de la página <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>, tales como la Q8, relativa al Desarrollo Farmacéutico, o la Q10, sobre el Sistema de Calidad Farmacéutico.

Tras la formulación, las soluciones se administran preferiblemente en una forma compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones pueden ser fácilmente administradas en una variedad de formas de dosificación tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco y similares. Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución generalmente se tampona adecuadamente y el diluyente líquido primero debe hacerse isotónico por ejemplo, con solución salina o glucosa suficiente. Tales soluciones acuosas se pueden utilizar, por ejemplo, para administración

intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Preferiblemente, se emplean medios acuosos estériles, como es conocido por los expertos en la técnica, seleccionados particularmente a la luz de la presente descripción. A modo de ilustración, una sola dosis se puede disolver en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1000  
 5 ml de fluido de hipodermocclisis o inyectarse en el sitio de infusión propuesto, (ver por ejemplo, "Remington Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035- 1038 y 1570 a 1580). Necesariamente ocurrirán algunas variaciones en la dosificación dependiendo de la condición del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto  
 10 individual. Por otra parte, para la administración humana, las preparaciones deben cumplir los estándares biológicos de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza tal como lo requiere, por ejemplo, las Directrices de Calidad del ICH antes citadas o a normativa de la FDA.

La invención se ilustrará ahora con más detalle con ayuda de los Ejemplos y Figuras que  
 15 se muestran a continuación.

### **Ejemplos**

Los ensayos descritos en los Ejemplos que se presentan a continuación fueron llevados a cabo con los siguientes materiales y metodologías:

#### *- Stocks de Drosophila*

20 La línea de moscas *MHC-Gal4* de la especie *Drosophila melanogaster* expresa el factor de transcripción Gal4 de levaduras con el patrón de expresión del gen de la cadena pesada de la miosina de *Drosophila*; por tanto, se expresa en toda la musculatura del insecto, incluyendo la musculatura somática o esquelética, la visceral o lisa, los músculos de la faringe y el vaso dorsal o corazón, entre otros. Se pueden adquirir a partir de  
 25 repositorios centralizados (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>) pagando una cuota para contribuir a su mantenimiento. Las líneas con esponjas de miRNAs (*UAS-miR-SP*) para los miRNAs de *Drosophila* *dme-miR-92a*, *dme-miR-100*, *dme-miR-124*, *dme-miR-277*, *dme-miR-304* y contra una secuencia al azar como control negativo (conocidos por el término inglés *scrambled-SP*, el control) se obtuvieron del Dr. T. Fulga (Fulga *et al.*,  
 30 2015). Brevemente, las construcciones de miR-SP fueron diseñadas con un casete de silenciamiento de 20 secuencias repetitivas complementarias a los miRNAs separadas por secuencias enlazadoras variables de cuatro nucleótidos (miR-92SP: SEQ ID NO:62; miR-100SP: SEQ ID NO:63; miR-124SP: SEQ ID NO:64; miR-277SP: SEQ ID NO:65; miR-304SP: SEQ ID NO:66). La línea recombinante *MHC-Gal4 UAS-i(CTG)480* fue

generada según han descrito Llamusi *et al.* (Llamusi *et al.*, 2013). La construcción y características de las líneas de moscas *UAS-mblC* y *UAS-IR-mbl* se ha descrito previamente (Garcia-Casado *et al.*, 2002; Llamusi *et al.*, 2013, respectivamente): *UAS-mblC* es un transgen que expresa la isoforma *mblC* (descrita en el número de acceso  
 5 NM\_176210) de *muscleblind* bajo el control del sistema Gal4/UAS, mientras que *UAS-IR-mbl* es un transgen que expresa una construcción interferente para silenciar todos los transcritos generados por *splicing* alternativo a partir del gen *muscleblind* y que en test previos se ha visto que es capaz de reducir la expresión de *mbl* hasta, al menos, el 50% de sus valores normales. Todos los cruces se realizaron a 25 °C con alimentación  
 10 estándar para moscas.

*-Extracción de RNA, RT-PCR y qRT-PCR*

Para cada réplica biológica, se extrajo el RNA total de 10 machos adultos utilizando Trizol (Sigma). Un microgramo de RNA se digirió con DNasa I (Invitrogen) y se retrotranscribió utiizando SuperScript II (Invitrogen) utilizando hexanucleótidos aleatorios según las  
 15 recomendaciones del fabricante. Se utilizaron 20 ng de cDNA en una reacción PCR estándar con Go taq polimerasa (Promega) y los cebadores específicos para analizar el *splicing* del exón 16' del gen *Fhos* y de los exones 3-5 del gen *Tnt*. Como control endógeno se utilizó *Rp49* utilizando 0,2 ng de cDNA. La qRT-PCR se llevó a cabo a partir de 2 ng cDNA molde con SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y  
 20 cebadores específicos (SEQ ID NO:31 a SEQ ID NO:50: ver Tabla 1). Para el gen de referencia, *Rp49*, la qRT-PCR se llevó a cabo a partir de 0,2 ng de cDNA. El ciclo térmico se llevó a cabo en sistema *Step One Plus Real Time PCR* (Applied Biosystems) según condiciones estándar. En cada experimento se llevaron a cabo tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. Los datos de la expresión relativa respecto al gen endógeno y el  
 25 grupo control se obtuvieron por el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los pares de muestras se compararon mediante la prueba de la t de dos colas ( $\alpha = 0,05$ ), aplicando la corrección de Welch cuando fue necesario.

Tabla 1: RT-qPCR de expresión en *Drosophila melanogaster*

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia (5' → 3')</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
<i>mbl fwd</i>	TTGAATCAAATTATAGCCCAAGCT	31
<i>mbl rev</i>	CGATTTTGCTCGTTAGCGTTT	32
<i>mblA fwd</i>	CAGACACCGAAATACTCTCTACAAACA	33

<i>mbIA rev</i>	AAAATCAGGAGTAAACAAATACACGTAGAC	34
<i>mbIB fwd</i>	CACACATCCAGATATGCTACTTACCA	35
<i>mbIB rev</i>	TGAGCGATTTTCGATTGATTTTG	36
<i>mbIC fwd</i>	CAGCAAACACACATCACCTACCA	37
<i>mbIC rev</i>	CTATCGAGCAGGAGGATGAAGAG	38
<i>mbID fwd</i>	GCCTCTGGAAAATGCTGCAA	39
<i>mbID rev</i>	CAGCAACCGCAAAAGAGCTT	40
<i>Serca fwd</i>	GCAGATGTTCTGATGTCG	41
<i>Serca rev</i>	CGTCCTCCTTCACATTCAC	42
<i>Cyp6w1 fwd</i>	TTGCGCACAAAATCTCTCC	43
<i>Cyp6w1 rev</i>	GTCCTGCAAGTTCTTTCAA	44
<i>Rp49 fwd</i>	GGATCGATATGCTAAGCTGTCGCACA	45
<i>Rp49 rev</i>	GGTGCGCTTGTTTCGATCCGTAACC	46
<i>Fhos fwd</i>	GTCATGGAGTCGAGCAGTGA	47
<i>Fhos rev</i>	TGTGATGCGGGTATCTACGA	48
<i>Tnt fwd</i>	CGACGATGAAGAGTACAC	49
<i>Tnt rev</i>	ACTCGGTGATGTATTCTTTTCAG	50

*-Western Blot*

Para la extracción de proteína total, se homogeneizaron 20 tórax de hembra en tampón RIPA (NaCl 150 mM, 1,0% de IGEPAL, 0,5% de desoxicolato de sodio, 0,1% SDS, Tris-HCl 50 mM pH 8,0) más cócteles de inhibidores de proteasas y de fosfatasa (Roche Applied Science). Las proteínas totales se cuantificaron con el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce) usando albúmina de suero bovino como estándar. 20 µg de las muestras se desnaturalizaron durante 5 min a 100°C, se resolvieron en geles de SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% en PBS-T (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, NaCl 150 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, KCl 3 mM, 0,05% de Tween 20, pH 7,4) y se realizó

inmunodetección sobre las mismas siguiendo los procedimientos estándar. Para la detección de la proteína Mbl de *Drosophila*, el anticuerpo anti-Mbl (Houseley *et al*, 2005) se preabsorbió frente a embriones de tipo silvestre en estadio temprano (0-6 h tras puesta) para eliminar la unión no específica de anticuerpos. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario pre-absorbido (durante toda la noche, 1:1000) seguido del anticuerpo secundario anti-IgG de oveja conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (1 h, 1:5000, Sigma-Aldrich). El control de carga se realizó con un anticuerpo anti-tubulina (incubación durante toda la noche, 1:5000, Sigma-Aldrich) seguido de incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (1 h, 1:3000, Sigma-Aldrich). Las bandas se detectaron utilizando el sustrato para Western Blotting ECL (Pierce). Las imágenes fueron tomadas con un ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

#### -Análisis histológico

La detección por inmunofluorescencia de Muscleblind en el músculo de las moscas y el análisis del área muscular en los tórax de *Drosophila* se realizaron como se ha descrito previamente (Llamusi *et al.*, 2013). Para la inmunodetección de Mbl se utilizaron criosecciones de tórax de mosca que fueron incubadas 30 min con solución de bloqueo y toda la noche a 4°C con anticuerpo anti-Mbl a una dilución 1:500. Al día siguiente se lavó el exceso de anticuerpo con PBS-T y se incubó 45 min con anticuerpo secundario contra IG de oveja conjugado con biotina a una dilución 1:200. Tras lavar el anticuerpo secundario, se incubó con solución ABC (VECTASTAIN ABC kit) 30 min, se lavó exceso de reactivo y se incubó 45 min con estreptavidina conjugada con el fluoróforo final a 1:1000. Las preparaciones se montaron en medio de montaje con DAPI.

El área muscular se determinó a partir de secciones de tórax embebidos en la resina epoxi. Brevemente, colocamos los tórax en un tubo con 200 µl de la solución 1 (¼ paraformaldehído 4 %, ¼ glutaraldehído 8 %, ¼ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M y ¼ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M) en hielo. A continuación, se añadieron 200 µl de la solución 2 (mezcla 1:1 solución 1 y tetraóxido de osmio) y se incubó 30 min en hielo. A continuación, se sustituyó la mezcla por 200 µl de la solución 2 y se incubó en hielo durante 1-2 h. Tras la fijación, se deshidrataron las muestras mediante pases de 5 min en etanol al 30%, 50% y 70% en hielo, y al 90% y 100% (2X) a temperatura ambiente. A continuación, se llevaron a cabo dos pases de 10 min en óxido de propileno. Por último, las muestras se dejaron toda la noche en una mezcla 1:1 de óxido de propileno y resina epoxi. Al día siguiente, el líquido se sustituyó por resina epoxi pura, y ésta se dejó penetrar en las muestras durante al menos 4 h. Pasado este tiempo, las moscas fueron colocadas y orientadas en moldes con resina y se dejaron polimerizar toda la noche en un horno Pasteur a 70 °C. Las

muestras fueron cortadas con una cuchilla de diamante en secciones transversales de 1,5  $\mu\text{m}$  en un ultramicrotomo. Las secciones se colocaron en portas gelatinizados con una gota de medio de montaje DPX y se cubrieron con un cubreobjetos para su posterior observación al microscopio óptico.

5 -*Detección de foci*

Los tórax de las moscas a analizar se fijaron durante una noche en paraformaldehído al 4% en PBS a 4°C, posteriormente se mantuvieron en una solución de sacarosa 30% en PBS durante 2 días. Transcurridos los 2 días, los tórax fueron embebidos en OCT y congelados en nitrógeno líquido y mantenidos a -80°C hasta su procesado, momento en el que se obtuvieron secciones transversales de 15  $\mu\text{m}$  con el criomicrotomo Leica CM 1510S. Los portaobjetos con los cortes de tórax se lavaron tres veces con PBS 1X (5 min) y se les añadió el tampón de acetilación. Tras 10 min con este, se lavaron tres veces (5 min) con PBS 1X y se prehibridaron durante 30 min con solución de hibridación (10 ml formamida desionizada, 12  $\mu\text{l}$  de 5M NaCl, 400  $\mu\text{l}$  de 1M Tris-HCl pH=8, 20  $\mu\text{l}$  0,5M EDTA pH=8, 2 g Dextrano sulfato, 400  $\mu\text{l}$  solución Denhart's 50X, 1 ml de espermatozoos de arenque (10 mg/ml), H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 20 ml. La sonda marcada (Cy3-5'CAGCAGCAGCAGCAGCAGCA3'-Cy3: SEQ ID NO:61, Sigma) tras calentarla a 65°C durante 5 min se añadió a los portaobjetos disuelta en tampón de hibridación (1/100) y se dejó hibridar a 37°C durante la noche en una cámara húmeda y oscura. Al día siguiente se lavó con SSC2X manteniendo las preparaciones a 32°C (2 x 15 min) y 3 x 5 min lavados con PBS. Finalmente se montaron los portaobjetos con Vectastain y se tomaron fotografías utilizando un microscopio confocal FLUOVIEW FV1000 con el objetivo de 40X.

-*Análisis de la tasa de supervivencia en Drosophila*

Se recogieron un total de 120 moscas recién nacidas con los genotipos adecuados y se mantuvieron a 29°C. Las moscas se transfirieron a medios nutritivos frescos nuevos cada dos días y el número de muertes se contabilizó a diario. Las curvas de supervivencia se obtuvieron utilizando el método de Kaplan-Meier y el análisis estadístico se realizó con una prueba de rango logarítmico (log-rank test, de Mantel-Cox) ( $\alpha = 0,05$ ) utilizando el software GraphPad Prism5.

30 -*Ensayos funcionales*

Los ensayos de vuelo se realizaron en el día 5 de acuerdo con lo descrito por Babcock *et al.* (Babcock *et al.*, 2014) utilizando 100 moscas macho por grupo. El ensayo consiste en lanzar un grupo de moscas, a través de un embudo, a un cilindro de aproximadamente un

metro de altura y 15 cm de diámetro. Dicho cilindro está recubierto por una lámina de plástico impregnada con un pegamento de modo que las moscas bien vuelan y se mantienen en el aire en la parte alta del cilindro, y quedan pegadas allí, o bien caen a la parte baja del mismo y quedan pegadas si vuelan deficientemente. La altura de aterrizaje se comparó entre los grupos utilizando la prueba de la t de dos colas ( $\alpha = 0,05$ ). Para evaluar la velocidad de ascensión grupos de diez machos de 5 días de edad se transfirieron a pipetas desechables (de 1,5 cm de diámetro y 25 cm de altura) después de un período de 24 h sin anestesia. Se registró con una cámara la altura alcanzada por cada mosca desde la parte inferior del vial en un período de 10 s. Para cada genotipo se probaron dos grupos de 30 moscas. Para la comparación de pares de muestras se utilizó la prueba de la t de dos colas ( $\alpha = 0,05$ ), aplicando la corrección de Welch cuando fue necesario.

*-Screening basado en librerías de microRNAs miméticos (SureFIND Transcriptome PCR Array, Qiagen)*

En este estudio se utilizó el kit "*Cancer miRNA SureFind Transcriptome PCR Array*" (Qiagen) para identificar posibles miRNAs reguladores de MBNL1 y 2. El ensayo de qPCR multiplex se llevó a cabo mediante uso de sondas Taqman comerciales (QuantiFast Probe PCR Kits, Qiagen) para cuantificar la expresión de MBNL1 y 2 (genes de interés, marcados con el marcador fluorescente FAM: fluoresceína, de ThermoFisher) y GAPDH (como gen endógeno, marcado con el fluoróforo conocido como MAX o Fluoro-Max, también de ThermoFisher). Los cambios en la expresión de MBNL1 y 2 como resultado del tratamiento con cada microRNA mimético específico fueron calculados respecto al control negativo mimético (un microRNA no existente en la naturaleza) y normalizados respecto a GAPDH. Los cambios observados fueron representados en forma de  $\log_2$  y sometidos a análisis estadístico  $\Delta\Delta Ct$  (MAD) para la selección de los miRNAs candidatos positivos.

*-Ensayo de Validación*

Células HeLa se cultivaron a 37°C en medio de cultivo DMEM con 1000 mg/L glucosa (Sigma-Aldrich), complementado con 10% suero fetal bovino y 1% penicilina/estreptomina (Sigma-Aldrich). Las células fueron sembradas a una densidad de  $4 \times 10^5$  células/pocillo en un volumen de 2 ml de medio en placa de 6 pocillos. Después de 16 horas y con las células al 80% de confluencia, éstas fueron transfectadas con el vector usando X-tremeGENE HP Reagent (Roche) de acuerdo a las indicaciones del fabricante para su uso en células HeLa.

Se transfectaron células HeLa con 2 µg de cada una de las versiones del vector para expresión de microRNAs: un vector derivado del plásmido comercial pCMV-MIR (OriGene) que contenía, en cada caso, o bien la secuencia codificante del precursor individual de uno de los 5 microRNAs (hsa-miR-7, secuencia del inserto: SEQ ID NO:5, hsa-miR-23b SEQ ID NO:6, hsa-miR-146b: SEQ ID NO:7; hsa-miR-218: SEQ ID NO:8 y hsa-miR-372: SEQ ID NO:9) operativamente unida a y, por tanto, bajo el control del promotor CMV del vector original, o bien su versión vacía, sin secuencia precursora de microRNA.

El RNA procedente de estas células fue extraído a las 48 horas post-transfección con los plásmidos, utilizando Trizol (Sigma). Un microgramo de RNA se digirió con DNasa I (Invitrogen) y se retrotranscribió con SuperScript II (Invitrogen) utilizando hexámeros al azar. La concentración de cada muestra de RNA se determinó con el espectrofotómetro NanoDrop-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). La cuantificación de la expresión de MBNL1 y 2 a nivel de transcrito mediante qPCR se llevó a cabo a partir de 10 ng de cDNA con sondas Taqman comerciales (QuantiFast Probe PCR Kits, Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante al igual que el apartado anterior.

La proteína total utilizada en los ensayos de Western blot, fue extraída a las 72 horas post-transfección mediante el uso de tampón RIPA (150 mM NaCl, 1,0% IGEPAL, 0,5% desoxicolato de sodio, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.0), más inhibidores de proteasa y fosfatasas (Roche Applied Science). Las muestras fueron cuantificadas mediante el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce). 20 ng de las muestras fueron desnaturalizadas durante 5 min a 100°C y utilizados para cargar los geles SDS-PAGE (12% acrilamida), donde se separaron las proteínas, mediante el sistema Mini-protean Electrophoresis System (Bio-Rad). La inmovilización de las proteínas en membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) se realizó por electrotransferencia en el sistema Trans-blot SD semi-dry transfer cell (Bio-Rad). La transferencia se realizó a voltaje constante (15 V) durante una hora. Tras la electroforesis las membranas se equilibraron en PBST y se bloquearon durante 1 h en solución de bloqueo (leche desnatada 5% en PBST). Posteriormente dichas membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti-MBNL1 y anti-MBNL2 (toda la noche, 1:1000, Abcam), tras lavar con PBST 3 veces, se añadió el anticuerpo secundario indicado anti-ratón-HRP y anti-conejo-HRP respectivamente (1 h, 1:5000, Sigma-Aldrich). Como control de carga se utilizó anti-β-actina (durante toda la noche, 1:5000, Sigma-Aldrich), seguido de los pertinentes lavados y del anticuerpo secundario, que en este caso fue anti-ratón-HRP (1 h, 1:5000, Sigma-Aldrich). La detección quimioluminiscente se realizó utilizando el ECL Western Blotting Substrate (Pierce). Las

imágenes se obtuvieron utilizando el sistema de documentación ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Australia Pty Ltd, Rydalmere, NSW, Australia).

*-Ensayo de validación de la actividad de miRNAs candidatos sobre la región 3' UTR (kit luciferasa dual)*

5 Células HeLa se cultivaron a 37° C en medio de cultivo DMEM con 1000 mg/L glucosa (Sigma-Aldrich), complementado con 10% suero fetal bovino y 1% penicilina / estreptomycin (P/S; Sigma-Aldrich). Las células fueron sembradas a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo en un volumen de 0,5 ml de medio en placa de 24 pocillos. Después de 16 horas y con las células al 80% de confluencia, éstas fueron co-transfectadas con los  
10 microRNAs ya mencionados con anterioridad expresándose a partir del correspondiente derivado del vector pCMV-MIR (OriGene), junto con el vector pEZX-MT05 que portaba la región 3'UTR de ambos genes MBNL1 y 2 (GeneCopoeia) usando X-tremeGENE HP reagent (Roche) de acuerdo a las indicaciones del fabricante para su uso en células HeLa. Las secuencias de la parte correspondiente a la 3' UTR, de los correspondientes  
15 fragmentos insertados en cada caso en el vector pEZX-MT05 se indican en SEQ ID NO:51 (región 3' UTR del gen MBNL1: número de producto HmiT011084-MT05) y SEQ ID NO:54 (región 3' UTR del gen MBNL2: número de producto HmiT000192-MT05).

Para todos los miRNAs que resultaron positivos para el primer estudio de actividad, se probaron tres tipos de construcciones: las construcciones de tipo salvaje (WT) que portan  
20 el 3'UTR de MBNL1 y 2 ya probadas con anterioridad, y dos construcciones nuevas: las construcciones mutadas (MUT) que se diseñaron con una delección (la de la secuencia complementaria a la región semilla, o "seed region": 6, 7 u 8 nucleótidos normalmente) en la diana predicha del microRNA, con la finalidad de impedir la unión del microRNA al 3' UTR y las construcciones con diana complementaria perfecta (PM). Todas estas  
25 construcciones fueron sintetizadas por la compañía GeneCopoeia, siguiendo las órdenes de los presentes inventores. Las partes correspondientes a las 3' UTR modificadas, se indican en SEQ ID NO:52 (constructo con delección en la zona de unión a miR-23b a la 3'UTR de MBNL1: MUT-miR-23b), SEQ ID NO:53 (constructo con complementariedad perfecta en la zona de unión a miR-23b a la 3'UTR de MBNL1: PM-miR-23b), SEQ ID  
30 NO:55 (constructo con delección en la zona de unión a miR-23b a la 3'UTR de MBNL2: MUT-miR-23b), SEQ ID NO:56 (constructo con complementariedad perfecta en la zona de unión a miR-23b a la 3'UTR de MBNL2: PM-miR-23b), SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59 (constructo con delección en las zonas de unión primera, segunda o tercera, respectivamente, de miR-218 a la 3'UTR de MBNL2: MUT1-miR-218, MUT2-miR-  
35 218, MUT3-miR-218) y SEQ ID NO:60 (constructo con complementariedad perfecta en

las 3 zonas de unión de miR-218 a la 3'UTR de MBNL2: PM-miR-218) .

En todas estas construcciones que portan el 3'UTR (WT, MUT, PM) para ambos genes, éste está situado aguas abajo de un gen reportero que expresa la luciferasa de *Gaussia* (Gluc) que es secretada al medio. Ambas secuencias, la correspondiente a la luciferasa y  
5 la correspondiente a la región 3' UTR, son transcritas conjuntamente bajo el promotor SV40 de expresión en células de mamífero, dando lugar a un mRNA quimérico. Además este vector (pEZX-MT05) cuenta con otro reportero que también es secretado al medio y de expresión constitutiva, la fosfatasa alcalina (SEAP), que se expresa bajo el control del promotor CMV y que sirve como control interno para la normalización de las lecturas  
10 obtenidas para la luciferasa de *Gaussia*.

La lectura de estos experimentos se realizó utilizando Secrete-Pair™ *Gaussia* Luciferase Dual Luminescence Assay Kits (GeneCopoeia), siguiendo las instrucciones marcadas por el fabricante, en formato de placa blanca de 96 pocillos que se introdujeron en el lector de placas (Infinite 200 PRO Microplate Reader, Tecan). De cada una de las construcciones  
15 estudiadas se hicieron tres réplicas técnicas en cada uno de los tres experimentos independientes.

*-Expresión de miRNAs candidatos en los tejidos relevantes*

La extracción de RNA total enriquecido con RNAs pequeños, procedente de tejidos de ratón (prosencéfalo, cerebelo, hipocampo, corazón, gastrocnemio y cuádriceps), biopsias  
20 musculares humanas y cultivos de fibroblastos humanos, se realizó usando el kit miRNeasy de Qiagen. A partir de 10 ng de RNA total se retrotranscribió la fracción de miRNAs con el kit Universal cDNA synthesis II de Exiqon. Para la qRT-PCR se realizaron diluciones 1/80 del cDNA, del cual se utilizaron 4 µl por réplica técnica. La amplificación por qRT-PCR de los miRNAs se realizó con cebadores comerciales específicos para  
25 cada miRNA (EXIQON) y el SyBR Green mastermix Universal RT. Las diferencias de expresión se calcularon mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

*-Prueba de transfección con antagomiRs*

Se cultivaron fibroblastos controles sanos haciéndolos crecer en Dulbecco's Modified Eagle Medium-high glucose (DMEM 4500 mg/l, Gibco) suplementado con 1% P/S y 10%  
30 de suero fetal bovino inactivado, en botellas de cultivo celular.

Las células para este ensayo fueron sembradas a una densidad de  $10^5$  cels/ml en placas de 96 pocillos (10000 células por pocillo). Transcurridas unas 16 horas después de la siembra de las células y con éstas al 80% de confluencia, se procedió a la transfección

de dichas células con los antagomiRs cuya síntesis se encargó a Creative Biogene (secuencia nucleotídica base del antagomiR-23b-3p: GGUAAUCCUGGCAAUGUGAU (SEQ ID NO:2), y del antagomiR-218-5p: ACAUGGUUAGAUCAAGCACAA (SEQ ID NO:1) usando X-tremeGENE HP reagent (Roche) de acuerdo a las indicaciones del fabricante para su uso en fibroblastos, instrucciones sobre las que se realizaron pequeñas modificaciones, pues se utilizó un volumen menor de reactivo de transfección (0,5 µl y 1 µl) del que recomienda el fabricante, ya que los antagomiRs portan una química especial incorporando colesterol en su estructura, lo que les permite atravesar mejor las membranas celulares y así favorecer la entrada de éste, no siendo necesaria tanta cantidad de reactivo de transfección lo que mejora su viabilidad.

En concreto, los antagomiRs utilizados en la presente solicitud (antagomiR-218-5p: SEQ ID NO:10, y antagomiR23b-3p: SEQ ID NO:11), tal como se refleja en la correspondiente página web de Creative Biogen sobre síntesis de agomirs y antagomiRs (<http://www.creative-biogene.com/Services/MicroRNA-Agomir-Antagomir-Synthesis-Service.html>) difieren de las secuencias oligonucleotídicas básicas representadas por SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 en que presentan las siguientes modificaciones químicas: 2 grupos fosforotioatos en el extremo 5', 4 grupos fosforotioato en el extremo 3', 4 grupos colesterol en el extremo 3' y modificaciones 2'-metoxi en la ribosas de todas las posiciones nucleotídicas, es decir, a lo largo de toda la secuencia oligonucleotídica. Las secuencias oligonucleotídicas básicas de cada uno de ellos, SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, respectivamente, son las complementarias a las de los miRNAs que se desean bloquear, es decir, las del miR-23b-3p, 5'- AUCACAUUGCCAGGGAUUACC -3' (SEQ ID NO:12), y miR-218, 5'-UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU-3' (SEQ ID NO:13).

Los experimentos de transfección se llevaron a cabo en fibroblastos provenientes de pacientes. En concreto, en los presentes ensayos se utilizaron fibroblastos de piel en los que se les ha transducido con vectores lentivirales una construcción que permite la expresión inducible, por doxiciclina, de MyoD (lo que permite transdiferenciarlos en mioblastos), y que son células inmortalizadas por expresión de hTERT. Proceden del laboratorio del Dr. Denis Furling, del Institute of Myology (<http://www.institut-myologie.org/en/>)

Ambos antagomiRs fueron transfectados en dichos fibroblastos de pacientes, utilizando cantidades crecientes de estos: 10 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM. Como control sólo se puso reactivo de transfección pero no antagomiR. Se dejó el medio de transfección junto con las células durante 4 horas y, transcurrido este tiempo, se cambió el medio por medio DMEM nuevamente. A las 48 horas post-transfección se tomaron imágenes de las células

en el microscopio con luz visible para observar la presencia y morfología de las células, y con fluorescencia para observar la distribución y presencia del antagomiR ya que éste, está marcado con el marcador fluorescente Cy3 (rojo).

*-Ensayo de toxicidad en cultivo celular*

- 5 Se cultivaron fibroblastos controles sanos haciéndolos crecer en Dulbecco's Modified Eagle Medium-high glucose (DMEM 4500 mg/l, Gibco) suplementado con 1% P/S y 10% de suero fetal bovino inactivado, en botellas de cultivo celular. Dado su crecimiento adherente, para pasar estas células se lavaban con PBS y se tripsinizaban 2 min a 37°C, y a continuación se le añadía medio fresco para inhibir la acción de la tripsina.
- 10 Las células para este ensayo fueron sembradas a una densidad de 10<sup>5</sup> cels/ml en placas de 96 pocillos (10000 células por pocillo). La placa fue sembrada siguiendo la plantilla que se representa en la Tabla 2, en la que los números de las columnas pueden encontrarse en la última fila: en el caso de la columna 1, no se siembran células, pues esta columna será el blanco del análisis de colorimetría. Las filas A a D (concentraciones subrayadas) corresponden al antagomiR de miRNA 23b-3p, mientras que las filas E a H (concentraciones subrayadas) corresponden al antagomiR del miRNA-218 (concentraciones en negrita):

Tabla 2: Plantilla de siembra para el ensayo de toxicidad en cultivo celular

A	blanco	control	<u>1</u> nM	<u>10</u> nM	<u>50</u> nM	<u>100</u> nM	<u>200</u> nM	<u>500</u> nM	<u>1000</u> nM			
B	blanco	control	<u>1</u> nM	<u>10</u> nM	<u>50</u> nM	<u>100</u> nM	<u>200</u> nM	<u>500</u> nM	<u>1000</u> nM			
C	blanco	control	<u>1</u> nM	<u>10</u> nM	<u>50</u> nM	<u>100</u> nM	<u>200</u> nM	<u>500</u> nM	<u>1000</u> nM			
D	blanco	control	<u>1</u> nM	<u>10</u> nM	<u>50</u> nM	<u>100</u> nM	<u>200</u> nM	<u>500</u> nM	<u>1000</u> nM			
E	blanco	control	<b>1</b> nM	<b>10</b> nM	<b>50</b> nM	<b>100</b> nM	<b>200</b> nM	<b>500</b> nM	<b>1000</b> nM			
F	blanco	control	<b>1</b> nM	<b>10</b> nM	<b>50</b> nM	<b>100</b> nM	<b>200</b> nM	<b>500</b> nM	<b>1000</b> nM			
G	blanco	control	<b>1</b> nM	<b>10</b> nM	<b>50</b> nM	<b>100</b> nM	<b>200</b> nM	<b>500</b> nM	<b>1000</b> nM			
H	blanco	control	<b>1</b> nM	<b>10</b> nM	<b>50</b> nM	<b>100</b> nM	<b>200</b> nM	<b>500</b> nM	<b>1000</b> nM			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Ambos antagomiRs fueron transfectados en fibroblastos de pacientes, utilizando cantidades crecientes de estos: 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM y 1000 nM (1  $\mu$ M), y como control sólo se puso reactivo de transfección pero no antagomiR. Se dejó el medio de transfección junto con las células durante 4 horas y transcurrido este tiempo se cambió por medio de transdiferenciación. Para transdiferenciar los fibroblastos a mioblastos se indujo la expresión de MyoD. Para ello, se reemplazó el medio completo por medio de diferenciación muscular (MDM) que consistía en DMEM suplementado con 1% P/S, 2% suero de caballo (Gibco), 0,1 mg/ml de apotransferrina, 0,01 mg/ml de insulina y 0,02 mg/ml de doxiciclina (Sigma) durante 60 h.

Transcurridas estas 60 horas, se reemplazó el medio de transdiferenciación por 100  $\mu$ l de medio nuevo en todos los pocillos de la placa incluida la columna 1, y se añadió 20  $\mu$ l de la solución MTS/PMS (Kit CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) a cada pocillo y se incubó 2 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se leyó el ensayo colorimétrico en el lector de placas Infinite 200 PRO Microplate Reader, Tecan, siguiendo las instrucción del fabricante. Los datos obtenidos con el lector fueron procesados y analizados con la finalidad de obtener la IC<sub>10</sub> (concentración inhibitoria del 10% de las células) e IC<sub>50</sub> (concentración inhibitoria del 50% de las células) que nos permiten saber con qué cantidad de antagomiR debemos trabajar para que no resulte tóxico en el modelo celular.

*-Ensayos de PCR cuantitativa y splicing*

Fibroblastos de pacientes DM1 y controles sanos se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle Medium-high glucose (DMEM 4500 mg/l, Gibco) suplementado con 1% P/S y 10% de suero fetal bovino inactivado, en botellas de cultivo celular. Las células se sembraron en placas de Petri de 60 mm, a una densidad de 125000 célula/placa, poniendo 10 ml de células en cada pocillo. Transcurridas unas 16 horas después de la siembra de las células y con estas al 80% de confluencia, se procedió a la transfección de las células con los antagomiRs sintetizados por encargo de los solicitantes por Creative Biogene (antagomiR-23b-3p y antagomiR-218) usando X-tremeGENE HP reagent (Roche) de acuerdo a las indicaciones del fabricante para su uso en células fibroblastos, salvo porque sólo se añadieron 5  $\mu$ l de reactivo de transfección.

Ambos antagomiRs fueron transfectados en fibroblastos de pacientes, utilizando cantidades crecientes: 50 nM, 100 nM y 200 nM. Como control solo se puso reactivo de transfección pero no antagomiR tanto en células control sanas, como en fibroblastos de

paciente. Se dejó el medio de transfección junto con las células durante 4 horas y transcurrido este tiempo se cambió por medio de transdiferenciación (DMEM suplementado con 1% P/S, 2% suero de caballo (Gibco), 0,1 mg/ml de apotransferrina, 0,01 mg/ml de insulina y 0,02 mg/ml de doxiciclina (Sigma)). Los fibroblastos fueron transdiferenciados a mioblastos durante dos tiempos: 48 horas y 96 horas.

El RNA procedente de estas células fue extraído a las 48 y 96 horas post-transfección con los antagomiRs, utilizando Trizol (Sigma). Un microgramo de RNA se digirió con DNaseI (Invitrogen) y se retrotranscribió con SuperScript II (Invitrogen) utilizando hexámeros al azar. La concentración de cada muestra de RNA se determinó con el espectrofotómetro NanoDrop-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA).

La cuantificación de la expresión de MBNL1 y 2 a nivel de transcrito mediante qPCR se llevó a cabo a partir de 10 ng de cDNA con sondas Taqman comerciales (QuantiFast Probe PCR Kits, Qiagen), para cuantificar la expresión de MBNL1 y 2 (genes de interés, marcados con el marcador fluorescente FAM: fluoresceína, de ThermoFisher); GAPDH y ACTB (como genes endógenos, marcados con el fluoróforo conocido como MAX o Fluoro-Max y TAMRA respectivamente, éstas también de ThermoFisher).

Para la amplificación de los transcritos mediante RT-PCR se utilizó la polimerasa GoTaq® DNA Polymerase (Promega). Para ello se utilizó cDNA obtenido como molde del paso anterior siguiendo las condiciones del fabricante. Los productos de PCR se separaron en gel de agarosa al 2,5%. Los cebadores utilizados para el análisis de cada evento de *splicing* estudiado, el patrón esperado en mioblastos de paciente DM1, el exón estudiado y las condiciones utilizadas se encuentran en la siguiente tabla:

Tabla 3: Condiciones de amplificación de transcritos mediante RT-PCR en el ensayo del *splicing*

Gen	Secuencia de los cebadores (5' → 3') (F: directo, R: inverso)	cDNA (µl)	Ciclos	Patrón mioblastos DM1
GAPDH	F: CATCTTCCAGGAGCGAGATC (SEQ ID NO:14)	1	29	Control endógeno
	R: GTTCACACCCATGACGAACAT (SEQ ID NO:15)			

Gen	Secuencia de los cebadores (5' → 3') (F: directo, R: inverso)	cDNA ( $\mu$ l)	Ciclos	Patrón mioblastos DM1	Exón
<i>cTNT</i>	F: ATAGAAGAGGTGGTGGAAAGAGTAC (SEQ ID NO:16)	1	27	Inclusión	5
	R: GTCTCAGCCTCTGCTTCAGCATCC (SEQ ID NO:17)				
<i>IR</i>	F: TGCTGCTCCTGTCCAAAGAC (SEQ ID NO:18)	4	30	Exclusión	11
	R: GAAGTGTTGGGGAAAGCTG (SEQ ID NO:19)				
<i>BIN1</i>	F: CTCAACCAGAACCTCAATGATGTG (SEQ ID NO:20)	1	30	Exclusión	11
	R: CTGAGATGGGGACTTGGGGAG (SEQ ID NO:21)				
<i>DMD</i>	F: GTGAGGAAGATCTTCTCAGTCC (SEQ ID NO:22)	4	30	Exclusión	79
	R: CTCCATCGCTCTGCCCAAATC (SEQ ID NO:23)				
<i>SERCA1</i>	F: GATGATCTTCAAGCTCCGGGC (SEQ ID NO:24)	4	30	Exclusión	22
	R: CAGCTCTGCCTGAAGATGTG (SEQ ID NO:25)				

- Ejemplo 1. Prueba de concepto en modelos de DM1 de *Drosophila melanogaster*.

1.1. El silenciamiento de *dme-miR-277* o *dme-miR-304* provoca sobreexpresión de *muscleblind* en el músculo de *Drosophila*

- 5 El secuestro de Muscleblind en foci de RNA y la posterior pérdida de la función de la proteína es uno de los principales factores desencadenantes de la patología molecular de la DM1. Con el fin de identificar miRNAs que reprimen *muscleblind*, los inventores seleccionaron miRNAs candidatos y procedieron al bloqueo de su actividad utilizando esponjas específicos de miRNA.
- 10 Inicialmente seleccionaron *dme-miR-92a*, *dme-miR-100* y *miR-dme-124* basándose en datos previos generados por el grupo de los presentes inventores y su relación ortológica con miRNAs humanos; para obtener esos datos se habían utilizado, entre otras herramientas, el algoritmo miRanda, desarrollado en el Centro de Biología Computacional del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (versión del 2010 descargable, entre otros,

desde la página de descargas [microRNA.org](http://www.microrna.org):

<http://www.microrna.org/microrna/getDownloads.do>; manual disponible en la dirección:

[http://cbio.mskcc.org/microrna\\_data/manual.html](http://cbio.mskcc.org/microrna_data/manual.html)). Para ampliar la búsqueda de miRNAs

candidatos, se utilizó TargetScan, un software en línea proporcionado por el Whitehead

5 Institute para la predicción de dianas de miRNAs ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)), para buscar sitios

de reconocimiento de miRNAs en la región 3' UTR de *muscleblind* y se identificaron, entre

otros, sitios para dos miRNAs: *dme-miR-277* y *dme-miR-304*. La Tabla 4 muestra los

sitios de reconocimiento de varios miRNAs predichos según diferentes algoritmos en la

región 3'UTR de *muscleblind*, así como el número de acceso tanto de sus secuencias

10 precursoras con bucles en horquilla (códigos encabezados por la abreviatura MI) como

de los miRNAs maduros (códigos encabezados por la abreviatura MIMAT) en la base de

datos de miRBase ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)).

Tabla 4.- Número de sitios de reconocimiento de varios miRNAs predichos según diferentes algoritmos en la región 3'UTR de *muscleblind*

miRNA	miRanda	TargetScan	Isoforma de <i>mbI</i>
<i>dme-miR-92a-3p</i> (SEQ ID NO:26) MI0000360 MIMAT0000334	- - - 1 sitio	- - - -	<i>mbIA</i> <i>mbIB</i> <i>mbIC</i> <i>mbID</i>
<i>dme-miR-100-5p</i> (SEQ ID NO:27) MI0000378 MIMAT0000357	- - - -	- - - -	<i>mbIA</i> <i>mbIB</i> <i>mbIC</i> <i>mbID</i>
<i>dme-miR-124-3p</i> (SEQ ID NO:28) MI0000373 MIMAT0000351	1 sitio - - 1 sitio	- - - -	<i>mbIA</i> <i>mbIB</i> <i>mbIC</i> <i>mbID</i>
<i>dme-miR-277-3p</i> (SEQ ID NO:29) MI0000360 MIMAT0000338	1 sitio 2 sitios - 2 sitios	- - - 1 sitio	<i>mbIA</i> <i>mbIB</i> <i>mbIC</i> <i>mbID</i>
<i>dme-miR-304-5p</i> (SEQ ID NO:30) MI0000411 MIMAT0000390	- - 1 sitio -	- - - 1 sitio	<i>mbIA</i> <i>mbIB</i> <i>mbIC</i> <i>mbID</i>

15

Para validar miRNAs que regulan *Muscleblind*, se dirigió la expresión de las construcciones esponja (Fulga *et al.*, 2015), *UAS-miR-XSP*, a los músculos de *Drosophila* mediante la línea *Mhc-Gal4*, abreviaturas de los elementos “promotor del gen de la cadena pesada de la miosina” (*myosin heavy chain*) y región codificante del gen *Gal4* correspondiente a la proteína activadora de la transcripción de levaduras Gal4, de la cual se conoce que actúa como activador de la transcripción en distintos organismos, incluida *Drosophila*. En este sistema, los elementos UAS (*upstream activation sequence*: secuencia de activación aguas arriba) actúan como potenciadores de la transcripción, pues la proteína GAL4 se une específicamente a ellos para activar la transcripción de genes, mientras que el hecho de que la región codificante del gen *Gal4* se encuentre operativamente unida al promotor endógeno del gen *Mhc* dirige la expresión de las esponjas de miRNAs al músculo. Los niveles de transcripción de *muscleblind* se analizaron por qRT-PCR, utilizando cebadores específicos para amplificar una región del exón 2 de *muscleblind*, que es compartida por todas las isoformas de transcripción conocidas hasta la fecha. Como control, se utilizó una línea con una secuencia al azar (*UAS-scrambled-SP*).

No se detectó ningún aumento significativo en el nivel de expresión de *muscleblind* en las moscas que expresan el miR-92aSP, miR-100SP o miR-124SP bajo el control de MHC-Gal4. En contraste, los niveles de transcritos *muscleblind* aumentaron significativamente en las moscas que expresaban el miR-277SP o miR-304SP en el músculo, en comparación con los controles de Scrambled-SP (Fig. 1a). Los niveles de RNA *muscleblind* fueron 14 veces más altos cuando el miRNA bloqueado fue *dme-miR-227*, mientras que el silenciamiento de *dme-miR-304* dio como resultado un aumento de 6 veces. Por lo tanto, estos resultados demuestran que el silenciamiento de *dme-miR-277* o *dme-miR-304* provoca la sobreexpresión de *muscleblind*.

### 1.2. *dme-miR-277* y *dme-miR-304* regulan diferentes isoformas de *Muscleblind*

El gen *muscleblind* de *Drosophila melanogaster* es un gen grande, que abarca más de 110 kb, que da lugar a varios transcritos diferentes mediante *splicing* alternativo (Begeman *et al.*, 1997; Irion *et al.*, 2012). La evidencia experimental sugiere que las isoformas de *muscleblind* no son funcionalmente redundantes (Vicente *et al.*, 2007). Para determinar qué isoformas de *muscleblind* están reguladas por *dme-miR-277* o *dme-miR-304*, se utilizó el algoritmo MiRanda (Enright *et al.*, 2003) para identificar sitios de reconocimiento de *dme-miR-277* y *dme-miR-304* en la región 3'UTRs de las isoformas de *muscleblind* (Tabla 4). Es importante destacar que MiRanda realiza la búsqueda en los transcritos de *mbIA*, *mbIB*, *mbIC* y *mbID*, siguiendo la denominación utilizada por

Begemann *et al.* 1997 en la referencia antes mencionada, pero no incluye las isoformas identificadas recientemente, *mbIH*, *mbIH'*, *mbIJ* y *mbIK* (Irion *et al.*, 2012).

Se encontró un sitio de reconocimiento potencial de *dme-miR-277* en la isoforma *mbIA* y dos en *mbIB* y *mbID*. Los análisis de qRT-PCR determinaron que el nivel de *mbIB* aumentó significativamente cuando se bloqueó/agotó *dme-miR-277*. Los niveles de expresión de *mbID* se redujeron en las moscas *Mhc-Gal4 miR-277SP* y no se detectaron diferencias significativas en lo que respecta a *mbIA* cuando se comparó con las moscas control que expresaban los Scrambled-SP (Fig. 1b). Curiosamente, los niveles de expresión de *mbIC*, una isoforma para la que no se habían predicho sitios de reconocimiento para *dme-miR-277*, se redujeron significativamente en las moscas *Mhc-Gal4 miR-277SP*.

Para *dme-miR-304*, se encontró un sitio de reconocimiento en la región 3'UTR de *mbIC* y *mbID*, y se detectó una regulación al alza significativa de las dos isoformas en moscas *Mhc-Gal4 miR-304SP* (Fig. 1b). En particular, el bloqueo/agotamiento de *dme-miR-304* en el músculo provocó un fuerte aumento en los niveles de *mbIC*, la isoforma más expresada en moscas adultas (Vicente *et al.*, 2007).

El hecho de que el silenciamiento de *dme-miR-277* y *dme-miR-304* originen cambios en los niveles de expresión específicos de cada isoforma de *muscleblind* sugiere una regulación directa de los transcritos de *muscleblind* mediante estos miRNAs.

Teniendo en cuenta que un miRNA puede actuar típicamente a nivel de estabilidad del mRNA o del bloqueo de su traducción, se decidió analizar los niveles de la proteína Muscleblind para validar a los miRNAs reguladores candidatos. Con este objetivo, se utilizó un anticuerpo anti-Mbl para detectar la regulación al alza de las proteínas MblA, MblB y MblC. Los análisis de transferencia Western revelaron un aumento en los niveles de la proteína Muscleblind sólo en las moscas *Mhc-Gal4 miR-304SP* (Fig. 1c). Consistentemente con las determinaciones por qRT-PCR, la banda detectada en la transferencia Western correspondía a la proteína MblC. Debe mencionarse que el anticuerpo utilizado sólo ha funcionado previamente en experimentos de sobreexpresión (Houseley *et al.*, 2005; Vicente-Crespo *et al.*, 2008).

A fin de analizar el efecto del silenciamiento de *dme-miR-277* o *dme-miR-304*, se tiñeron secciones longitudinales de los músculos indirectos de vuelo (los IFMs) para ver la distribución de Muscleblind: la señal anti-Mbl se detectó en verde, mientras que los núcleos aparecían contrateñidos en azul con DAPI. El grupo de los presentes inventores había demostrado previamente que la proteína endógena Muscleblind se localiza

principalmente en las bandas sarcoméricas Z y H del músculo (Llamusi *et al.*, 2013). En consonancia con ello, las imágenes confocales obtenidas de dichas secciones permitieron detectar proteínas Muscleblind preferentemente en las bandas de los sarcómeros musculares en las moscas control que expresaban la construcción de los Scrambled-SP, obteniéndose una baja señal en algunos núcleos de dichas células. Curiosamente, la reducción en la función de *dme-miR-277* y *dme-miR-304* tuvo diferentes efectos sobre la distribución de las proteínas: mientras el silenciamiento de *dme-miR-277* aumentó la señal de la proteína Muscleblind citoplásmica, particularmente en las bandas sarcoméricas, en las moscas *Mhc-Gal4 miR-304SP* se detectó una fuerte localización nuclear.

Tomados conjuntamente, estos resultados demuestran que las isoformas endógenas de Muscleblind pueden ser reguladas al alza mediante el bloqueo de la actividad inhibidora de *dme-miR-277* y *dme-miR-304*.

1.3. La disminución de función de *dme-miR-277* o *dme-miR-304* favorece la expresión de Muscleblind en un modelo de DM1 en *Drosophila*

Los modelos previos de DM1 en *Drosophila* tenían foci ribonucleares en las células musculares que contenían proteínas Muscleblind (Garcia-Lopez *et al.*, 2008; Picchio *et al.*, 2013). Para probar el efecto de silenciamiento específico de los miRNA represores de *muscleblind* en un modelo de DM1 de *Drosophila*, se estudió la expresión de Muscleblind en moscas que expresan 480 repeticiones CTG interrumpidas (“i(CTG)480”) con el promotor de la cadena pesada de la miosina como conductor determinante específico de la expresión en músculo con la expresión simultánea de construcciones esponja (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-miR-XSP*).

Los análisis de los niveles de transcritos mbl por qRT-PCR mostraron que el silenciamiento de *dme-miR-277* o *dme-miR-304* dio lugar a una expresión aumentada de *muscleblind* en las moscas modelo de DM1 (Fig. 2a). Es importante destacar que la regulación positiva de *muscleblind* fue más fuerte en moscas modelo de DM1 que en las moscas que sólo expresaban construcciones esponja (compárense las Fig. 1a y Fig. 2a). Los niveles de los transcritos de *muscleblind* fueron 19 veces más elevados en las moscas que expresaban tanto i(CTG)480 como *miR-277SP* y 7 veces más elevados en las moscas *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-miR-304SP* en comparación con los controles. Por otra parte, en consonancia con el análisis de proteínas realizado en presencia de distintas construcciones esponja (Fig. 1c), el silenciamiento de *dme-miR-*

304 provocó un incremento de los niveles de la proteína MbIC en las moscas modelo de DM1 (Fig. 2b).

Para estudiar el efecto del silenciamiento de *dme-miR-277* o *dme-miR-304* en la localización subcelular de Muscleblind en moscas modelo de DM1, se analizó la distribución de proteínas Muscleblind mediante inmunodetección en IFMs (Fig. 2c-f). Tanto la expresión de *miR-277SP* (Fig. 2e) como la de *miR-304SP* (Fig. 2f) en moscas modelo de DM1 liberó a Muscleblind de los foci ribonucleares y aumentó el nivel de proteínas, tanto en los núcleos y como en el citoplasma. En el caso de las moscas modelo que expresaban el *miR-277SP*, la distribución de Muscleblind en las bandas sarcoméricas del músculo, que es característica de las moscas control que no expresan las repeticiones, fue rescatada por completo. Del mismo modo, la expresión de *miR-304SP* condujo a un aumento detectable de Muscleblind dispersa en núcleos y citoplasma. Por lo tanto, el silenciamiento de *dme-miR-277* o *dme-miR-304* regula al alza los niveles de Muscleblind y rescata su distribución subcelular en músculos de moscas modelo de DM1.

#### 1.4. El silenciamiento de *dme-miR-304* rescata alteraciones en el *splicing* y en los niveles globales de expresión de genes en un modelo de DM1 en *Drosophila*

La espliceopatía es el principal hito bioquímico de la DM1 y el único que ha sido vinculado directamente con los síntomas. Para probar si el aumento de Muscleblind, provocado por el silenciamiento de *dme-miR-277* o *dme-miR-304*, era suficiente para rescatar las alteraciones en el *splicing* en las moscas modelo de DM1, se estudiaron eventos de *splicing* característicamente alterados. Dichos eventos fueron:

- la exclusión del exón 16' del gen *Fhos* en moscas modelo de DM1, que los presentes inventores han identificado, comprobando que está regulado por Muscleblind;
- la inclusión del exón 13 del gen *Serca*, lo cual es un evento de *splicing* regulado por Muscleblind.

También se comprobó qué sucedía con otra función molecular descrita para *mbi*: la regulación de los niveles globales de expresión de genes. Concretamente, se amplificó el exón 2 del gen *CyP6W1*, para comprobar los niveles de expresión de dicho gen, para el cual se ha descrito aumento en su expresión en moscas modelo de DM1 (Picchio *et al.*, 2013).

En las moscas modelo de DM1, se confirmó un aumento de 2 veces de la inclusión del exón 16' de *Fhos* y una reducción de 2,4 veces de los transcritos de *Serca* con el exón 13, así como un aumento de 3 veces de los transcritos de *CyP6W1*, en comparación con las moscas control que no expresan las repeticiones.

- 5 La expresión de *miR-304SP* en estas moscas consiguió un rescate completo del exón 16' de *Fhos* y de la expresión normal del gen *CyP6W1* y un incremento significativo del 20% de los transcritos de *Serca* que incluyen el exón 13 (Fig. 2g-i, l). Es destacable que el silenciamiento de *dme-miR-304* en el músculo provocó un fuerte aumento en los niveles de *mbIC* (Fig. 2b), una isoforma que previamente se ha demostrado que actúa como
- 10 regulador del *splicing* (Vicente *et al.*, 2007). Por el contrario, la expresión de *miR-277SP*, que rescató la expresión *Muscleblind* en el citoplasma, y redujo los niveles de expresión de *mbIC*, no modificó estos eventos de *splicing*. Como control, se confirmó que el patrón de *splicing* de los exones 3-5 de *Tnt*, que no está alterado en moscas adultas modelo de DM1 (Garcia-Lopez *et al.*, 2008), no resultó modificado ni por la expresión de las
- 15 construcciones esponja ni por las alteraciones en la expresión de *muscleblind* (Fig. 2j, Fig. 2k).

Estos resultados muestran que el nivel de desrepresión de *muscleblind* conseguido mediante esponjas de miRNAs es suficiente para desencadenar, potencialmente, rescates moleculares significativos.

- 20 1.5. El silenciamiento de *dme-miR-277* o *dme-miR-304* rescata la atrofia muscular y la función motora en un modelo de DM1 en *Drosophila*

- Para evaluar la relevancia funcional del aumento de *Muscleblind* alcanzado por la expresión de las construcciones esponja específicas, se estudió el efecto del silenciamiento de *dme-miR-277* o *dme-miR-304* sobre la atrofia muscular, cuya alteración
- 25 es uno de los rasgos que caracterizan a los individuos con DM1. Para el estudio de la atrofia muscular primero se midió el área del músculo en secciones dorsoventrales de los IFMs en las moscas control que expresaban o bien *miR-277SP* o bien *miR-304SP* en el músculo (Fig. 3a-d). La disminución de la función de *dme-miR-277* indujo una reducción del 15% en el área de IFM, en comparación con las moscas que expresaban *Scrambled-*
- 30 *SP* como control. Es importante destacar que la expresión de *miR-304SP* no tuvo ningún efecto sobre este parámetro.

El grupo investigador de los presentes inventores había informado anteriormente de la existencia de atrofia muscular en moscas que expresan *i(CTG)480* en la musculatura. En estas moscas modelo de DM1, se encontró que el silenciamiento específico de tejido de

*dme-miR-277* o *dme-miR-304* fue suficiente para rescatar el porcentaje de área muscular de forma significativa (Fig. 3e-h). En comparación con las moscas control que no expresaban las repeticiones CUG, el área media de los IFMs en las moscas modelo que expresaban el *scrambled-SP* se redujo significativamente al 40%. La expresión  
 5 simultánea de las repeticiones CUG y uno cualquiera de entre *miR-277SP* o *miR-304SP* dio lugar a un aumento del 20% del área del músculo en estas moscas. Además, los ensayos de hibridación *in situ* de cortes transversales de musculatura de moscas (Fig. 3i-k) mostraron cómo la expresión de *miR-277SP* (Fig. 3j) y *miR-304SP* (Fig. 3k) dio como resultado una reducción significativa de un parámetro histopatológico típico de la  
 10 enfermedad, los foci ribonucleares del modelo de DM1 en mosca (Fig. 3i), que eran prácticamente inapreciables tras la expresión *miR-304SP*. Estos datos confirman que la regulación al alza de diferentes isoformas de *muscleblind* fue suficiente para rescatar la atrofia muscular y la formación de foci ribonucleares en *Drosophila*.

Para evaluar la correlación entre el área muscular y la actividad locomotora se analizó la  
 15 capacidad de ascenso y vuelo de moscas de diferentes genotipos. La expresión de *miR-277SP* en el músculo dio como resultado una reducción de la altura media de aterrizaje de alrededor del 10% en comparación con las moscas control que expresaban el *scrambled-SP*, lo que indica que la reducción de área del músculo que se encuentra en estas moscas tiene una correlación funcional (Fig. 4a). Sin embargo, la atrofia muscular  
 20 fue aparentemente específica de los IFMs, ya que la velocidad de ascenso por superficies se mantuvo sin cambios en estas moscas (Fig. 4b). Por el contrario, el silenciamiento de *dme-miR-304* en el músculo no afectó a la actividad de locomoción de las moscas (Fig. 4a, b). En las moscas modelo de DM1, en comparación con las moscas control que no expresaban las repeticiones, la expresión simultánea de las repeticiones CUG y la  
 25 construcción *scrambled-SP* dio como resultado una reducción drástica de la altura media de aterrizaje y de la velocidad de ascenso por superficies (Fig 4e, f). Sin embargo, la expresión de uno cualquiera de entre *miR-277SP* o *miR-304SP* en las moscas modelo dio como resultado el rescate de todos estos parámetros a niveles similares (Fig 4e, f). Por lo tanto, estos resultados demostraron que el silenciamiento específico de miRNAs  
 30 que regulan *muscleblind* puede rescatar la atrofia muscular y el fenotipo funcional característico de DM1.

1.6. El agotamiento funcional de *dme-miR-277* o *dme-miR-304* extiende la tasa de supervivencia de las moscas modelo de DM1

La reducción de la función muscular, particularmente del sistema respiratorio, es la causa  
 35 principal de muerte en DM1. El grupo de los presentes inventores había informado

anteriormente de que las moscas que expresan *i(CTG)480* en la musculatura tienen una tasa y un promedio de supervivencia reducida en comparación con las moscas control (García-López *et al.*, 2008). Para estudiar si el silenciamiento de *dme-miR-277* o *dme-miR-304* rescatan la tasa de supervivencia de las moscas modelo de DM1, se llevaron a  
 5 cabo análisis de las curvas de supervivencia en moscas de diferentes genotipos. Es importante destacar que las curvas de supervivencia de las moscas que expresaban miR-277SP o miR-304SP en el músculo no fueron diferentes a las de las tratadas como *scrambled-SP*, lo que indica que el silenciamiento de *dme-miR-277* o *dme-miR-304* no alteró la tasa de supervivencia (Fig. 4c, d). La tasa de supervivencia de las moscas  
 10 modelo de DM1 que expresaban los *scrambled-SP* se redujo significativamente en comparación con las moscas control que no expresaban las repeticiones CTG (Fig. 4 g, h). La expresión de miR-277SP o miR-304SP en las moscas modelo incrementó la tasa de supervivencia y supervivencia media. El silenciamiento de *dme-miR-277* aumentó la supervivencia media en ocho días, mientras que se detectó un incremento de seis días  
 15 para las moscas modelo de DM1 que expresan miR-304SP (Fig. 4 g, h). Por lo tanto, la regulación positiva de *muscleblind* provocada por la disminución de la función de *dme-miR-277* o *dme-miR-304* mejora la supervivencia de las moscas modelo de DM1.

Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que el silenciamiento de miRNAs específicos en *Drosophila* provoca un aumento de los niveles de *muscleblind* que es  
 20 suficiente para rescatar varias características moleculares y fisiológicas, incluyendo un aumento de la supervivencia. Por tanto, suponen un apoyo para plantearse recurrir a la represión de miRNAs de los homólogos de *Muscleblind* como una estrategia potencial para el tratamiento de la DM1 en seres humanos y otros mamíferos.

Por ello, los presentes inventores pasaron a identificar miRNAs represores de MBNL1 y/o  
 25 2 y, de entre ellos, buscar aquellos que se expresaran en tejidos donde se manifiestan síntomas de DM1 y cuyo bloqueo sea eficaz para rescatar características moleculares de DM1 y, con ello, mejorar síntomas de la enfermedad.

- Ejemplo 2: Identificación, validación y caracterización de miRNAs represores de MBNL1 y/o MBNL2

30 2.1. Cribado (*screening*) de identificación de miRNAs que regulan negativamente MBNL1 o MBNL2

Se comenzó realizando un *screening* inicial basado en librerías de miRNAs miméticos, empleando el kit comercial *SureFIND Transcriptome PCR array*, de Qiagen, tal como se ha descrito en la sección metodológica previa. Dicho estudio permitió la identificación

inicial, en células HeLa, de 18 miRNAs como potenciales represores de MBNL1 y 9 microRNAs potenciales represores de MBNL2 en células HeLa, por mostrar una represión de la expresión de los citados genes un mínimo de 4 veces respecto al control, *GAPDH*. Cuatro de dichos miRNA parecían inicialmente capaces de inhibir la expresión  
5 de ambos.

## 2.2. Confirmación de la acción represora

Puesto que se trataba de un gran número de microRNAs a validar, se acotó el número de microRNAs con los que continuar los ensayos a un total de 6, basando la elección en el número de predicciones bioinformáticas recogidas en las bases de datos mirDIP  
10 (<https://omictools.com/mirdip-tool>) y miRecords (<https://omictools.com/mirecords-tool>), las cuales recogen la información de un total de 9 programas de predicción proporcionando información de la existencia de las dianas de un microRNA concreto en los transcritos de un gen dado, lo que sugiere que exista una regulación.

Para realizar los ensayos de confirmación de los resultados iniciales comprobando la  
15 posible modulación por regulación directa, se seleccionaron inicialmente varios miRs, entre los que se incluían tanto potenciales reguladores de ambos genes, como represores específicos de MBNL1 o MBNL2. miR-146b y miR-23b como potenciales reguladores tanto de MBNL1 como MBNL2; y miR-218 y miR-372 como represores específicos de MBNL2.

20 Los resultados anteriores, se confirmaron para algunos miRNAs, mediante la transfección en células HeLa de plásmidos de expresión derivados de pCMV-MIR (Origene) que expresaban precursores de los miRNAs seleccionados, junto con el plásmido pCMV-MIR vacío y miR-7 como controles negativos, este último por no haber sido identificado como inhibidor de MBNL1 o MBNL2 en el *screening* inicial. Se procedió entonces a la  
25 cuantificación de la expresión de MBNL1 o MBNL2 a nivel de mRNA y proteína, tal como se describe en la parte dedicada a los “Ensayos de validación” en la sección metodológica previa. En la Fig. 5 se muestran los resultados obtenidos para miR-146b y miR-23b (inicialmente identificados como potenciales reguladores tanto de MBNL1 como MBNL2), así como para miR-218 y miR-372 (inicialmente identificados como represores  
30 específicos de MBNL2).

Efectivamente, se observó tanto en el caso de MBNL1 (Fig. 5a) como en el caso de MBNL2 (Fig. 5b), que los microRNAs seleccionados ejercían un efecto represor sobre el mensajero de los genes para los que inicialmente se había detectado un efecto represor aunque el efecto represor provocado por miR-146b era menos acusado.

En cuanto a la cuantificación de proteínas, se observó una disminución a nivel de proteína MBNL1 en caso de miR-23b (Fig. 5c), a las 72 horas post-transfección, mientras que en el caso de MBNL2 (Fig. 5d), esta disminución a nivel de proteína ocurría tanto con el microRNA miR-23b como con miR-218. La disminución provocada por miR-372 era  
 5 mucho menor que con los dos microRNAs anteriores.

Por tanto, los datos obtenidos confirmaron que miR-23b regula a la baja, a nivel de proteína, tanto *MBNL1* como *MBNL2*, mientras que miR-218 reprime *MBNL2*.

### 2.3. Identificación de las secuencias diana de miRNAs y demostración de la relevancia funcional de la potencial interacción miRNA-mRNA

10 A continuación se procedió a identificar las secuencias concretas a las que los miRNAs tienen que unirse para ejercer su acción represora. Esto es necesario para diseñar inhibidores del tipo de los “blockmiRs” y para confirmar la unión directa del miRNA a su diana, descartando que la regulación sea indirecta.

Para ello, se realizó una predicción bioinformática de las dianas de los miRNAs  
 15 preseleccionados tras el *screening*, utilizando las aplicaciones miRanda y TargetScan ya utilizadas en los ensayos realizados en *Drosophila*. Las Figs. 6A y 6F muestran una representación esquemática, a escala, de los sitios de unión predichos por los programas anteriormente citados sobre las regiones 3’UTR de MBNL1 y MBNL2, respectivamente. En ambos caso, ninguna de las isoformas de dichos genes, resultantes de *splicing*  
 20 alternativo, afecta a la presencia en el correspondiente transcrito de las dianas predichas.

Para demostrar la relevancia funcional de una interacción potencial miRNA-mRNA, se recurrió a la utilización de sensores que demostraran que, en efecto, los microRNAs  
 preseleccionados se unen a sus dianas predichas en las 3’UTR de ambos genes. Esto se demostró experimentalmente generando una construcción en la que los extremos 3’UTR  
 25 de MBNL1 o MBNL2 se fusionan a una secuencia codificante de luciferasa como gen reportero, de modo que la eventual regulación represora resultante de sobreexpresar el miRNA se observa como reducción en la cantidad de luciferasa detectada. En concreto, se recurrió a la metodología detallada en la sección “Ensayo de unión al 3’UTR (*kit luciferasa dual*)”.

30 Tal como se explica en esa misma sección metodológica, en este ensayo, una menor señal de la luciferasa de Gaussia (GluC) indica unión del microRNA a la 3’UTR, pues la unión de éste a la 3’UTR impide la traducción del reportero y, por ende una disminución

de la Gluc liberada al medio (véase los esquemas ofrecidos en la página específica de GeneCopoeia, <http://www.genecopoeia.com/product/mirna-targets/>).

De las lecturas observadas 48 horas tras la co-transfección tanto del plásmido a partir del cual se expresa el microRNA en ensayo como del vector pEZX-MT05 (que porta la región  
5 3'UTR de ambos genes, MBNL1 y MBNL2, aguas debajo de la secuencia codificante de la luciferasa de Gaussia), se observó que todos los microRNAs en ensayo, a excepción del miR-146b y del control negativo, miR-7, ejercen un efecto represor sobre el reportero, de lo que se infiere su unión específica de secuencia al 3'UTR de su gen diana (véanse las Figs 6B y 6E).

10 Una vez realizado el experimento anterior, se pasó a comprobar que la unión observada era directa, lo que indica una regulación directa del microRNA sobre la 3'UTR. Para ello, se diseñaron versiones adicionales de la construcción con el sensor 3'UTR para cada miRNA candidato, donde la secuencia diana predicha estaba mutada (mut) por delección, y también otra versión donde dicha diana predicha en la 3'UTR se había mutado dando  
15 lugar a una diana complementaria perfecta (PM) del correspondiente miRNA, diana perfecta a la que microRNAs se unen de forma completa y con la mayor eficiencia. Como se explica en la sección metodológica antes citada, la unión de los diferentes microRNAs a las 3'UTR mutadas y con dianas PM se expresó en unidades relativas de luciferasa de Gaussia, normalizadas respecto al control interno de la fosfatasa alcalina SEAP  
20 (Gluc/SEAP). Estos ensayos de mutagénesis de dianas se realizaron para miR-23b en MBNL1 (Figs. 6C) y para miR-218 y miR-23b en MBNL2 (Figs. 6F y 6G).

En el caso de MBNL1, la unión directa del microRNA miR-23b se aprecia a partir de la Fig.6B, pues al transfectar células HeLa con las versiones mutadas (mut) de las construcciones reporteras MBNL1 y miR-23b (Fig 6C), dicho miRNA dejó de reprimir,  
25 observándose un aumento en la luciferasa similar a lo que ocurre con el control, donde es transfectada la construcción sensora con el vector vacío pCMV-MIR. También se transfectaron junto a los microRNAs las construcciones con la versión perfecta (PM) de la diana de unión, lo que permite saber cuán efectiva es la unión de un microRNA a la 3'UTR natural (WT: *wild type*) del gen en cuestión respecto a unión perfecta que vemos  
30 con el PM. Estos ensayos son muy útiles pues son una base importante en el diseño de los blockmiRs. En todos los casos, se observó una disminución de la señal de la luciferasa superior a la observada con la diana natural.

En el caso de MBNL2, se demostró que hay una unión directa de los microRNAs miR-23b y miR-218, pues al transfectar células HeLa con las construcciones con las versiones

mutadas (mut) de las dianas junto con los diferentes microRNAs miR-23b (Fig 6F), y miR-218 (Fig 6G), se perdía la represión del reportero, observándose de nuevo un aumento en la luciferasa similar a lo que ocurre con el control, donde fue tranfectada la construcción sensora con el vector vacío pCMV-MIR. De nuevo se transfectaron también  
 5 junto a los microRNAs las construcciones con la versión perfecta (PM) de la diana de unión. En los dos casos, se observó una disminución de la señal de la luciferasa superior a la observada con la diana natural.

#### 2.4. Expresión de miRNAs candidatos en tejidos relevantes

Además de la comprobación de la capacidad represora, es importante confirmar si los  
 10 miRNAs sobre los que se desea actuar se expresan en tejidos relevantes para la enfermedad (corazón, músculo y cerebro, entre otros), para que la actuación sobre los mismos pueda tener un efecto paliativo de síntomas de la enfermedad asociados a dichos tejidos. Por tanto, esto es importante, porque si se identifica un represor, pero no se expresa en los tejidos relevantes, bloquearlo no tendrá ningún efecto.

15 Se procedió a comprobar la expresión de los miRNAs candidatos en biopsias musculares humanas de individuos sanos y pacientes de DM1, en cultivos de fibroblastos humanos procedentes también o de individuos sanos o de pacientes de DM1 y en tejidos de ratón (prosencéfalo, cerebelo, hipocampo, corazón, gastrocnemio y cuádriceps), según se describe en la sección metodológica “Expresión de miRNAs candidatos en los tejidos  
 20 relevantes”.

Los resultados obtenidos en ratón (Fig. 7A) fueron coherentes con los datos previos de expresión de los que disponían los presentes inventores, bien procedentes de bases de datos públicas o datos propios, que indicaban que determinados miRNAs se expresan en tejidos relevantes para la enfermedad (corazón, músculo, cerebro). Son especialmente  
 25 relevantes los resultados obtenidos con miR-23b y miR-218, especialmente con el primero, donde la expresión relativa en todos los tejidos era muy superior a la del microRNA miR-146b y, particularmente, a la de miR-372, con el que no se detectó expresión.

En consonancia con ello, los resultados obtenidos en biopsias musculares de individuos  
 30 humanos (Fig. 7C) muestran un aumento significativo de la expresión de *miR-218* y una tendencia clara, aunque no significativa con los datos del experimento realizado, para *miR-23b* en las muestras de pacientes con DM1, muy superior a la observada para el *miR-146*. Incluso en los ensayos realizados con fibroblastos humanos (Fig. 7B), la expresión relativa del *miR-218* es muy superior en el caso de los fibroblastos procedentes

de pacientes con DM1 con respecto a los fibroblastos de individuos control no aquejados de la enfermedad.

- Ejemplo 3. Efectos de la transfección de antagomiRs de los miR-218 y miR-23b

Tomando en conjunto los ensayos de confirmación de potencial represor de la expresión de mRNAs y proteínas, los de confirmación de acción directa sobre los mRNAs de MBNL1 y/o MBNL2 y los datos de expresión en diferentes tejidos, se decidió concentrarse en diseñar bloqueadores o inhibidores del miR-23b y miR-218, que eran los dos microRNAs con más expresión en estos tejidos implicados en la patología.

Se optó por los inhibidores de naturaleza oligorribonucleotídica del tipo antagomiRs que, como se explicó previamente, son análogos de RNAs con una química particular que hacen más estable su unión al miRNA, los hace menos susceptibles a la degradación y aumenta su capacidad para atravesar membranas celulares (es habitual, como sucede en el presente caso, que incluyan colesterol).

El proveedor de los antagomiRs concretos con los que se realizaron los siguientes ensayos ha sido: <http://www.creative-biogene.com/Services/MicroRNA-AgomiR-AntagomiR-Synthesis-Service.html>. Tal como se ha descrito previamente, los antagomiRs a los que se denomina en la presente memoria, de forma abreviada, antagomiR-218 (antagomiR-218-5p: SEQ ID NO:10) y antagomiR-23b (antagomiR-23b-3p: SEQ ID NO:11), que difieren de las secuencias básicas SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 (complementarias, respectivamente, de los microRNAs humanos miR-218-5p y miR-23b-5p) en las modificaciones detalladas en el listado de secuencias y la sección metodológica "Prueba de transfección con antagomiRs".

### 3.1. Ensayos de transfección de los antagomiRs

Tal como se describe en dicha sección, se comenzó realizando un ensayo de transfección de fibroblastos de pacientes con DM1 con concentraciones crecientes (10 nM, 50 nM, 100 nM) de cada uno de los antagomiRs, marcados con el fluoróforo Cy3, (que emite una señal roja) y dos concentraciones diferentes del reactivo de transfección XtremGene (0,5 µl y 1 µl).

Este experimento de prueba de transfección de los fibroblastos, se realizó con la finalidad de determinar la concentración umbral a la que es detectable el antagomiR dentro de las células, así como la cantidad de reactivo de transfección a utilizar, tratando de usar la mínima cantidad posible, pues dicho reactivo es altamente tóxico para fibroblastos humanos.

Debido a la presencia de Cy3 en su estructura, cuando el antagomiR entra en las células éstas se ven de color rojo al microscopio de fluorescencia, lo que indica presencia del antagomiR.

A la concentración de 10 nM apenas se detectó señal roja, lo que indicó que la presencia de cualquiera de los antagomiRs era escasa en las células, siendo necesarias concentraciones de 50 nM o superiores para que las señales fueran intensas. Por eso, son las que se usaron en los posteriores ensayos realizados con los antagomiRs.

### 3.2. Ensayos de toxicidad

Una primera aproximación fue realizar un ensayo de toxicidad celular dosis-respuesta para establecer a qué umbral de concentración de antagomiR estos empezaban a ser tóxicos para su trabajo en células, pues siempre que se trabaja con compuestos en un modelo celular es conveniente trabajar a una concentración inferior a la IC10.

Se obtuvieron los perfiles de toxicidad de ambos antagomiRs en mioblastos humanos sanos a las 60 h de su adición al medio (Fig. 8a), tal como se describe en la sección “Ensayo de toxicidad en cultivo celular”. El ensayo colorimétrico realizado permitió una cuantificación rápida y sensible de la proliferación y viabilidad celular, ante la adición de concentraciones crecientes del antagomiR. Con los datos obtenidos se calcularon la IC10 (que muestra la concentración a la que el 10% de las células han muerto por la toxicidad asociada al compuesto) y la IC50 (que es la concentración a la que el 50 % de las células han muerto debido a la toxicidad). Los valores obtenidos fueron:

	antagomiR-23b	antagomiR-218
IC10	654,7 nM	347,0 nM
IC50	32281 nM	1968 nM

Se calculó también el valor del factor Z, pues un factor Z positivo indica que el ensayo de toxicidad se está realizando de forma adecuada. En este caso fue: 0,46.

Una vez realizado el estudio se decidió proseguir con tres concentraciones (50 nM, 100 nM y 200 nM) con las que realizar los siguientes ensayos, pues se trata de concentraciones por debajo de la IC10.

### 3.3. Ensayos de respuesta a dosis de los antagomiRs en células de pacientes con DM1

Con las concentraciones arriba mencionadas, se realizaron ensayos de transfección de fibroblastos transdiferenciados a mioblastos de pacientes con DM1, con el antagomiR-23 o el antagomiR-218, tal como se describe en la sección metodológica de “Ensayos de

*splicing*” y se comenzó realizando ensayos de cuantificación del RNA de MBNL1 y MBNL2. Como puede verse en la Fig. 9, se observó que tanto el antagomiR miR-23b como el antagomiR miR-218 aumentaron la expresión de MBNL1 y MBNL2 a nivel de mRNA mediante qPCR y que este aumento responde a la dosis del antagomiR (mediante  
5 transfección). Esto se hizo a 48 y 96 h.

También se comprobó si podía conseguirse el rescate de algunos sucesos de *splicing* alternativo típicamente alterados en DM1, en mioblastos de pacientes, en presencia del antagomiR23b o el antagomiR218, siguiendo la metodología descrita en la sección “Ensayos de *splicing*”. Estos experimentos se hicieron a 48 h (Figs. 10A, C, D, E, F, G) y  
10 96 h (Figs. 10 B, H, I, J, K, L) tras la transfección del antagomiR.

Como puede verse en dichas figuras, el tratamiento de células DM1 con antagomiRs mejoró la inclusión del **exón 11 de BIN1** con ambos antagomiRs, a todas las concentraciones y a los dos tiempos tras las transfección.

El tratamiento con los antagomiRs aumenta el porcentaje de inclusión del **exón 79 de DMD** tal y como se ve reflejado en el gel (banda superior), con ambos antagomiRs y a  
15 todas las concentraciones en el ensayo realizado a 48 h. En cambio, en el ensayo realizado a 96 h, no se observó ningún cambio en el *splicing* aberrante de DMD.

En el ensayo realizado a las 48 h, no se observó ningún cambio con los antagomiRs a ninguna concentración sobre el *splicing* aberrante de SERCA1, mientras que en el  
20 ensayo de 96 h el tratamiento con ambos antagomiRs y a todas las concentraciones da lugar a un aumento del porcentaje de inclusión del exón 22 de SERCA1; este aumento fue notablemente más visible con el antagomiR-23b.

El ensayo a las 48 h desde la transfección no dio lugar a ningún cambio sobre el *splicing* aberrante de IR. La inclusión del exón 11 de IR sólo mejoró de una forma parecida a lo  
25 que se ve en el caso de mioblastos sanos a la concentración menor del antagomiR-23b (50 nM) a las 96 h y a la concentración más alta del antagomiR-218 (200 nM).

No se observó ningún cambio con los antagomiRs a ninguna concentración sobre el *splicing* aberrante de cTNT.

## Referencias Bibliográficas

- Altschul, S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**:403-410 (1990)
- Babcock, D. T. & Ganetzky, B. An improved method for accurate and rapid measurement of flight performance in *Drosophila*. *J Vis Exp*, e51223, doi:10.3791/51223 (2014)
- Batra, R. *et al.* Loss of MBNL leads to disruption of developmentally regulated alternative polyadenylation in RNA-mediated disease. *Mol Cell* **56**, 311-322, doi:10.1016/j.molcel.2014.08.027 (2014)
- Begemann, G. *et al.* muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development* **124**, 4321-4331 (1997)
- Chamberlain, C. M. & Ranum, L. P. Mouse model of muscleblind-like 1 overexpression: skeletal muscle effects and therapeutic promise. *Hum Mol Genet* **21**, 4645-4654, doi:10.1093/hmg/dds306 (2012)
- Davis, B. M., McCurrach, M. E., Taneja, K. L., Singer, R. H. & Housman, D. E. Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7388-7393 (1997)
- Dixon, D.M. *et al.* Loss of muscleblind-like 1 results in cardiac pathology and persistence of embryonic splice isoforms. *Sci Rep* **5**, 9042, doi:10.1038/srep09042 (2015).
- Du, H. *et al.* Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 187-193, doi:10.1038/nsmb.1720 (2010)
- Enright, A. J. *et al.* MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol* **5**, R1, doi:10.1186/gb-2003-5-l-rl (2003)
- Fernandez-Costa, J. M. *et al.* Alternative splicing regulation by Muscleblind proteins: from development to disease. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **86(4)**, 947-58, (2011).
- Fulga, T. A. *et al.* A transgenic resource for conditional competitive inhibition of conserved *Drosophila* microRNAs. *Nat Commun* **6**, 7279, doi:10.1038/ncomms8279 (2015)
- Gagnon, C. *et al.* Towards an integrative approach to the management of myotonic dystrophy type 1. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **78**, 800-806 (2007)
- Garcia-Casado, M. Z., Artero, R. D., Paricio, N., Terol, J. & Perez-Alonso, M. Generation of GAL4-responsive muscleblind constructs. *Genesis* **34**, 111-114, doi:10.1002/gene.10147 (2002)
- Garcia-Lopez, A. *et al.* Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity model in *Drosophila*. *PLoS One* **3**, e1595, doi:10.1371/journal.pone.0001595 (2008)
- Harper, P. *Myotonic dystrophy*. (Saunders, 2001)
- Houseley, J. M. *et al.* Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to *Drosophila*. *Hum Mol Genet* **14**, 873-883, doi:10.1093/hmg/ddi080 (2005)
- Huin, V. *et al.* MBNL1 gene variants as modifiers of disease severity in myotonic dystrophy type 1. *J Neurol* **260**, 998-1003, doi:10.1007/s00415-012-6740-y (2013)

- Irion, U. *Drosophila* muscleblind codes for proteins with one and two tandem zinc finger motifs. *PLoS One* **7**, e34248, doi:10.1371/journal.pone.0034248 (2012)
- Kalsotra, A., *et al.* The Mef2 transcription network is disrupted in myotonic dystrophy heart tissue, dramatically altering miRNA and mRNA expression. *Cell Rep.* **6(2)**: 336-345. (2014). doi: 10.1016/j.celrep.2013.12.025. Epub 2014 Jan 9
- Kanadia, R. N. *et al.* A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* **302**, 1978-1980, doi:10.1126/science.1088583 (2003)
- Kanadia, R.N. *et al.* Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11748-11753, doi:10.1073/pnas.0604970103 (2006)
- Kino, Y. *et al.* Nuclear localization of MBNL1: splicing-mediated autoregulation and repression of repeat-derived aberrant proteins. *Hum Mol Genet* **24**, 740-756, doi:10.1093/hmg/ddu492 (2015)
- Klein, A.F., *et al.* Therapeutic Approaches for Dominant Muscle Diseases: Highlight on Myotonic Dystrophy. *Curr. Gene Ther.* **15(4)**, 329-337 (2015).
- Kole, R., *et al.* RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nature Reviews* **11**, 125-140 (2012)
- Landford, R. E., *et al.* Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* **327(5962)**: 198-201 (2010). Doi:10.1126/science.1178178
- Lee, K. Y. *et al.* Compound loss of muscleblind-like function in myotonic dystrophy. *EMBO Mol Med* **5**, 1887-1900, doi:10.1002/emmm.201303275 (2013)
- Lin, X. *et al.* Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* **15**, 2087-2097, doi:10.1093/hmg/ddl132 (2006)
- Llamusi, B. *et al.* Muscleblind, BSF and TBPH are mislocalized in the muscle sarcomere of a *Drosophila* myotonic dystrophy model. *Dis Model Mech* **6**, 184-196, doi:10.1242/dmm.009563 (2013)
- Needleman, S.B., Wunsch, C.D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins., *J. Mol. Biol.* **48**:443-453 (1970)
- Pascual, M., *et al.*, The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing. *Differentiation* **4(2-3)**:65-80 (2006).
- Pearson, W.R., Lipman, D.J. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**:2444-2448 (1988)
- Picchio, L., Plantie, E., Renaud, Y., Poovthumkadavil, P. & Jagla, K. Novel *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression. *Hum Mol Genet* **22**, 2795-2810, doi:10.1093/hmg/ddt127 (2013)
- Rottiers, V. *et al.* Pharmacological inhibition of a microRNA family in non-human primates by a seed-targeting 8-mer antimiR. *Sci Transl Med.* **5(212)**, 212ra162, doi: 10.1126/scitranslmed.3006840 (2013)
- Smith, T.F., Waterman, M.S. Comparison of biosequences. *Adv. Appl. Math.* **2**:482 (1981);

- Terenzi, F. & Ladd, A. N. Conserved developmental alternative splicing of muscleblind-like (MBNL) transcripts regulates MBNL localization and activity. *RNA Biol* **7**, 43-55 (2010)
- Thornton, C. A. Myotonic dystrophy. *Neurol Clin* **32**, 705-719, viii, doi:10.1016/j.ncl.2014.04.011 (2014)
- Vicente, M., *et al.* Muscleblind isoforms are functionally distinct and regulate alpha-actinin splicing. *Differentiation* **75**, 427-440, doi:10.1111/j.1432-0436.2006.00156.x (2007)
- Vicente-Crespo, M. *et al.* Drosophila muscleblind is involved in troponin T alternative splicing and apoptosis. *PLoS One* **3**, e1613, doi:10.1371/journal.pone.0001613 (2008)
- Wang, X.W., *et al.* MicroRNAs in liver disease. *Gastroenterology* **142(7)**, 1431-1443 (2012)
- Yanava, R. S., *et al.* TWEAK Regulates Muscle Functions in a Mouse Model of RNA Toxicity. *PLoS One*. 22;11(2):e0150192. doi: 10.1371/journal.pone.0150192 (2016). eCollection 2016.

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica y/o un análogo de oligorribonucleótido que es un antagonista de un microRNA que regula a la baja la expresión del gen humano *MBNL1* y/o *MBNL2*, o a una mezcla de dos o más de dichas moléculas.

2. Una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica y/o un análogo de oligorribonucleótido según la reivindicación 1, que es un antagonista de un microRNA que se expresa al menos en uno o más órganos seleccionados del grupo de cerebro, cerebelo, hipocampo, músculo esquelético y corazón, o en una o más células de un cultivo primario de uno de dichos órganos o de una línea celular establecida derivada de uno de dichos órganos o células madre suyas.

3. Una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica y/o un análogo de oligorribonucleótido según la reivindicación 1 ó 2, que comprende un fragmento de secuencia de unidades de ribonucleótidos, o de análogos de ribonucleótidos, en el que la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de ribonucleótidos o de análogos de ribonucleótidos es complementaria al menos en un 50% a la secuencia de las bases nitrogenadas del fragmento de la molécula endógena (el microRNA o el RNA mensajero) al que ha de unirse.

4. Una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica y/o un análogo de oligorribonucleótido según la reivindicación 3, que comprende un fragmento de secuencia de unidades de ribonucleótidos, o de análogos de ribonucleótidos, en el que la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de ribonucleótidos o de análogos de ribonucleótidos es complementaria al menos en un 55%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100%, a la secuencia de las bases nitrogenadas del fragmento de la molécula endógena al que ha de unirse.

5. Una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica y/o un análogo de oligorribonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un antagonista del microRNA-218-5p humano o del microRNA-23b-3p humano.

6. Una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica y/o un análogo de oligorribonucleótido según la reivindicación 5, que comprende un fragmento compuesto por una sucesión de unidades de ribonucleótidos, o de análogos de ribonucleótidos, en el

que la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de ribonucleótidos o de análogos de ribonucleótidos es idéntica al menos en un porcentaje seleccionado del grupo de 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 100%, a la secuencia de las bases nitrogenadas del oligorribonucleótido de SEQ ID NO:1  
5 o del oligorribonucleótido de SEQ ID NO:2.

7. Una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica y/o un análogo de oligorribonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es un antagomiR, un blockmiR, un antimir o una esponja de microRNA.

10

8. Una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica y/o un análogo de oligorribonucleótido según la reivindicación 7, que es un análogo de oligorribonucleótido de tipo antagomiR cuya secuencia es complementaria a la secuencia del microRNA-218-5p humano o del microRNA-23b-3p humano, o que comprende un fragmento de unidades  
15 de ribonucleótidos, o de análogos de ribonucleótidos, en el que la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de ribonucleótidos o de análogos de ribonucleótidos es idéntica al menos en un 80% a la secuencia de las bases nitrogenadas del oligorribonucleótido de SEQ ID NO:1 o del oligorribonucleótido de SEQ ID NO:2.

9. Una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica y/o un análogo de oligorribonucleótido según la reivindicación 8, que es un análogo de oligorribonucleótido de tipo antagomiR en el que

a. al menos una de las unidades monoméricas que lo componen es un análogo de ribonucleotido que presenta una o más modificaciones  
25 químicas en el resto de la ribosa, en el enlace fosfato o en ambos,

b. la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades monoméricas de ribonucleótidos o análogos de ribonucleótidos es idéntica a la secuencia de bases nitrogenadas de las unidades monoméricas de ribonucleótidos del oligorribonucleótido de SEQ ID NO:1 o del oligorribonucleótido de SEQ ID NO:2, y que,

c. optativamente, presenta en el extremo 5' y/o en el extremo 3' uno o más restos adicionales que no son restos de desoxirribonucleótido o ribonucleótidos.

10. Una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica y/o un análogo de oligorribonucleótido según la reivindicación 8, que es un análogo de oligorribonucleótido de tipo antagomiR en el que

35

- a. todas las unidades monoméricas análogas de ribonucleótidos comprendidas en su estructura presentan modificaciones 2'-O-metil (2'-metoxi) en el resto de la ribosa,
- b. las dos primeras unidades monoméricas análogas de ribonucleótidos de su extremo 5' y las cuatro últimas unidades monoméricas análogas de ribonucleótidos de su extremo 3' están unidas al siguiente resto componente de la molécula por grupos fosforotioato en lugar de grupos fosfato,
- c. presenta 4 restos de colesterol en el extremo 3', unidas a la última unidad monomérica análoga de ribonucleótido de dicho extremo 3',
- d. la secuencia de las bases nitrogenadas de sus unidades monoméricas análogas de ribonucleótidos es idéntica a la secuencia de bases nitrogenadas de las unidades monoméricas de ribonucleótidos del oligorribonucleótido de SEQ ID NO:1 (antagomiR-218-5p) o del oligorribonucleótido de SEQ ID NO:2 (antagomiR-23b-3p),

11. Una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica y/o un análogo de oligorribonucleótido según la reivindicación 9 o 10, que es un análogo de oligorribonucleótido tipo antagomiR representado por SEQ ID NO:10 (antagomiR-218-5p) o el análogo de oligorribonucleótido tipo antagomiR representado por SEQ ID NO:11 (antagomiR-23b-3p).

12. Una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica y/o un análogo de oligorribonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende un fragmento complementario a la región semilla del microRNA del que es antagonista o que comprende un fragmento compuesto por una sucesión de unidades de ribonucleótidos o de análogos de ribonucleótidos en el que la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de ribonucleótidos o de análogos de ribonucleótidos es complementaria en un 100% a la secuencia de las bases nitrogenadas de la región semilla del microRNA del que es antagonista.

13. Una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica y/o un análogo de oligorribonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es un blockmiR que comprende un fragmento compuesto por una sucesión de unidades de ribonucleótidos o de análogos de ribonucleótidos en el que la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de ribonucleótidos o de análogos de ribonucleótidos es

complementaria al menos en un 80% a la secuencia de las bases nitrogenadas de la región de un RNA mensajero diana reconocida por el microRNA del que el blockmiR es antagonista.

5           14. Una composición que comprende al menos una de las moléculas de naturaleza oligorribonucleotídica o un análogo de oligorribonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, una mezcla de dos o más de ellas, o un vector de expresión que comprende la secuencia codificante de al menos una de dichas moléculas de naturaleza oligorribonucleotídica.

10

15           15. Una composición según la reivindicación 14, que adicionalmente comprende un vehículo y/o uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

16           16. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15 ,  
15 que comprende el análogo de oligorribonucleótido tipo antagomiR representado por SEQ ID NO:10 (antagomiR-218-5p) o el análogo de oligorribonucleótido tipo antagomiR representado por SEQ ID NO:11 (antagomiR-23b-3p) o una mezcla de los mismos.

20           17. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15,  
20 que comprende un vector de expresión que comprende la secuencia codificante de una esponja de microRNA que comprende múltiples sitios colocados en tándem complementarios al microRNA-218-5p humano o al microRNA-23b-3p humano o una mezcla de múltiples sitios de unión colocados en tándem complementarios a cada uno de ellos.

25

25           18. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en la que la molécula de naturaleza oligorribonucleotídica o análogo de oligorribonucleótido está en una concentración de 50 nM a 200 nM, ambas incluidas

30           19. Uso de una de las moléculas de naturaleza oligorribonucleotídica o un análogo de oligorribonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, una mezcla de dos o más de ellas, o una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia miotónica tipo 1.

35

35           20. El uso según la reivindicación 19, en el que el tratamiento es un tratamiento paliativo de uno o más síntomas de la distrofia miotónica tipo 1.

21. El uso según la reivindicación 20, en el que el tratamiento es un tratamiento paliativo de una o más de las alteraciones musculares que forman parte de los síntomas de la distrofia miotónica tipo 1.

5

22. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que la molécula de naturaleza oligorribonucleotídica o análogo de oligorribonucleótido es un inhibidor del microRNA-218-5p humano o del microRNA-23b-3p humano.

10

23. El uso según la reivindicación 22, en el que la molécula de naturaleza oligorribonucleotídica o análogo de oligorribonucleótido es el inhibidor del microRNA-218-5p tipo antagomiR representado por SEQ ID NO:10 o el inhibidor del microRNA-23b-3p humano tipo antagomiR representado por SEQ ID NO:11.

15

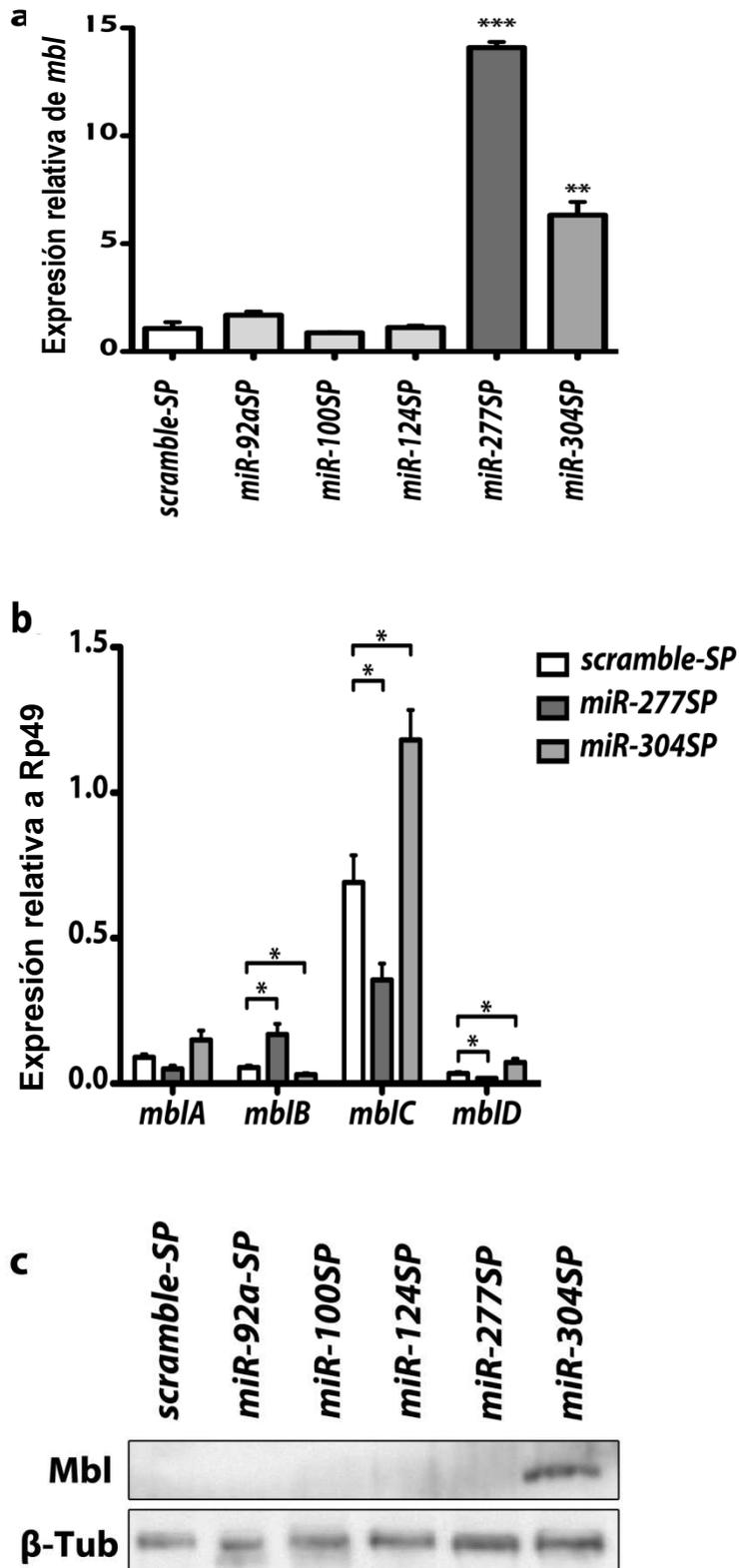
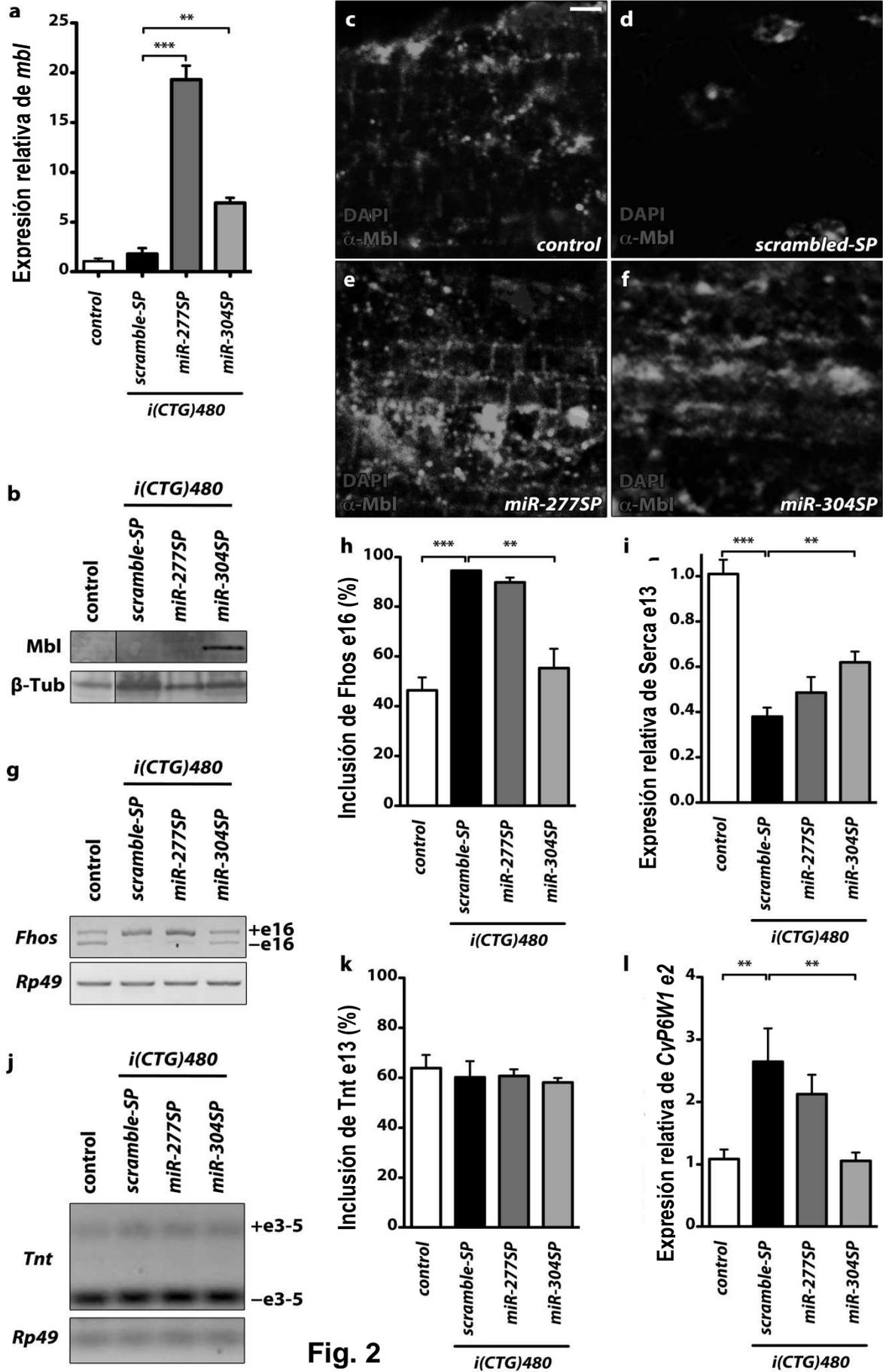


Fig. 1



**Fig. 2**

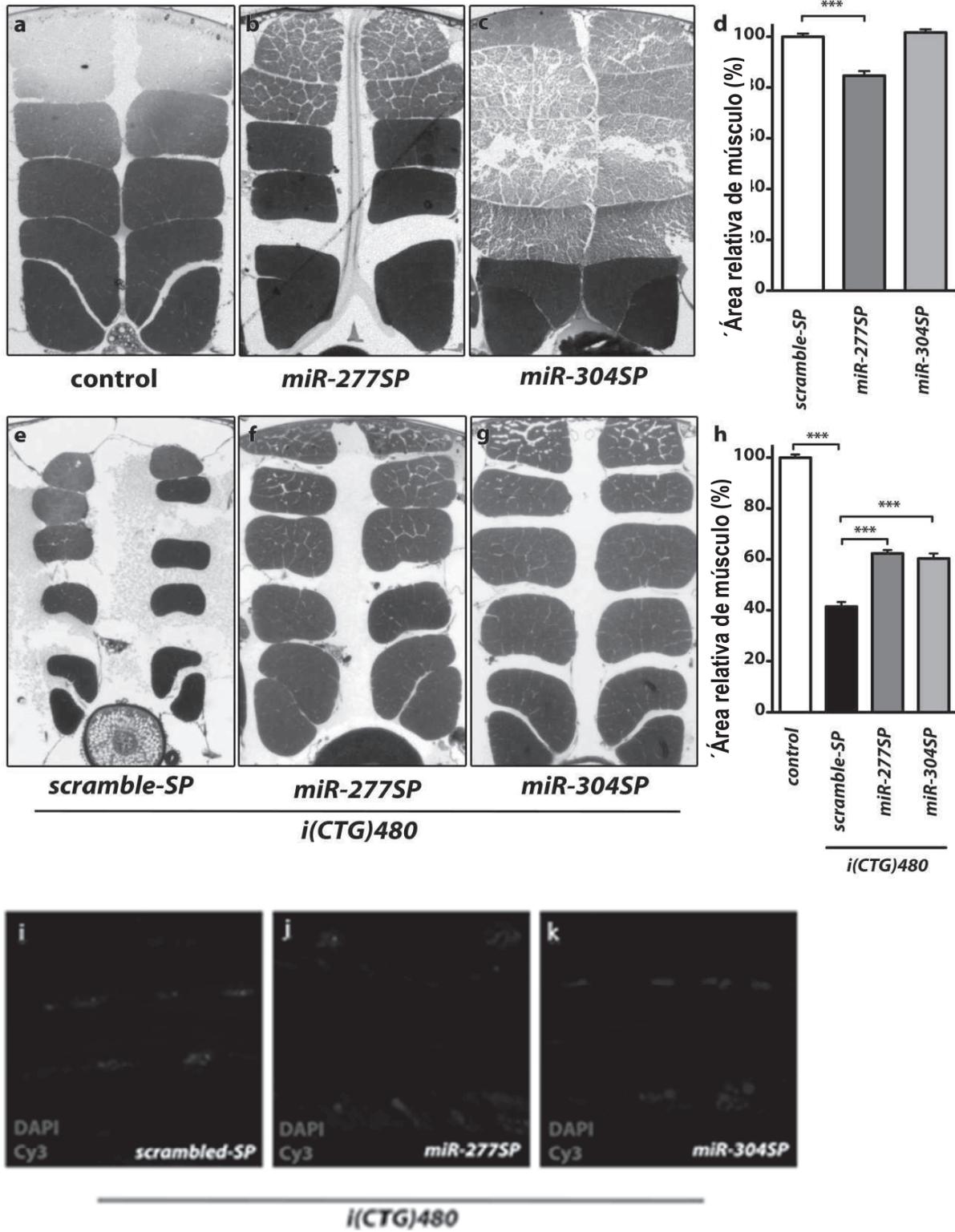


Fig. 3

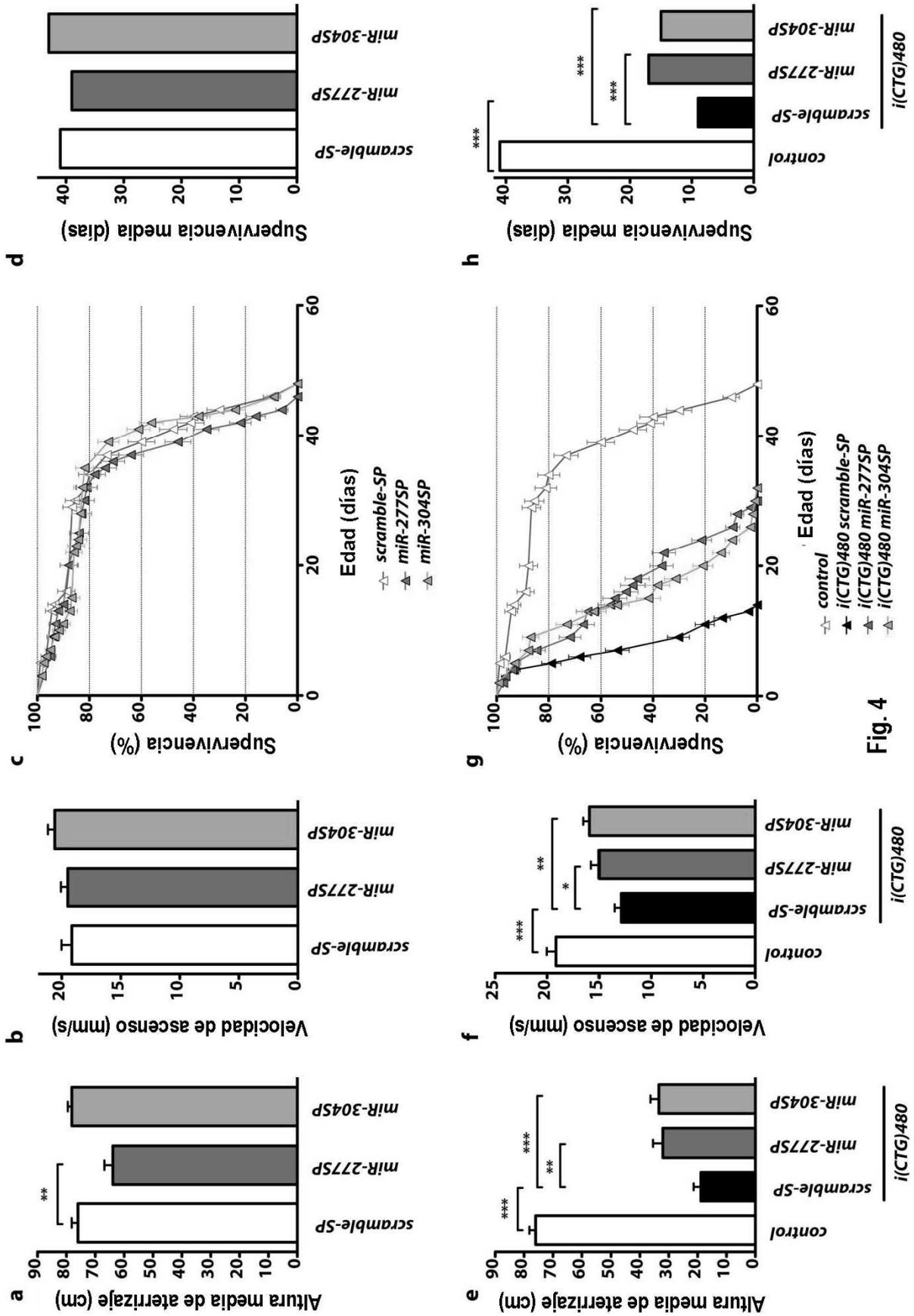
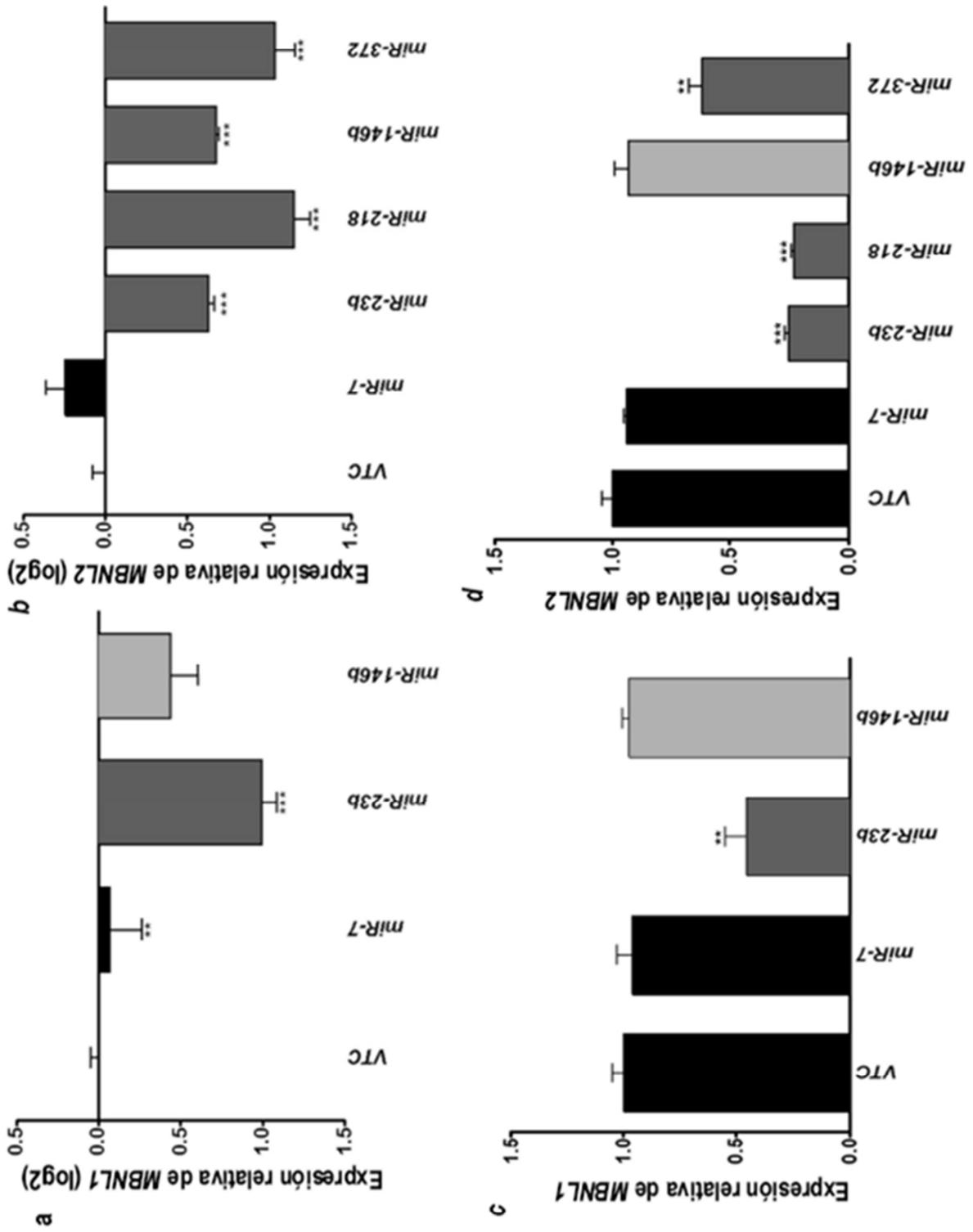


Fig. 4

Fig 5



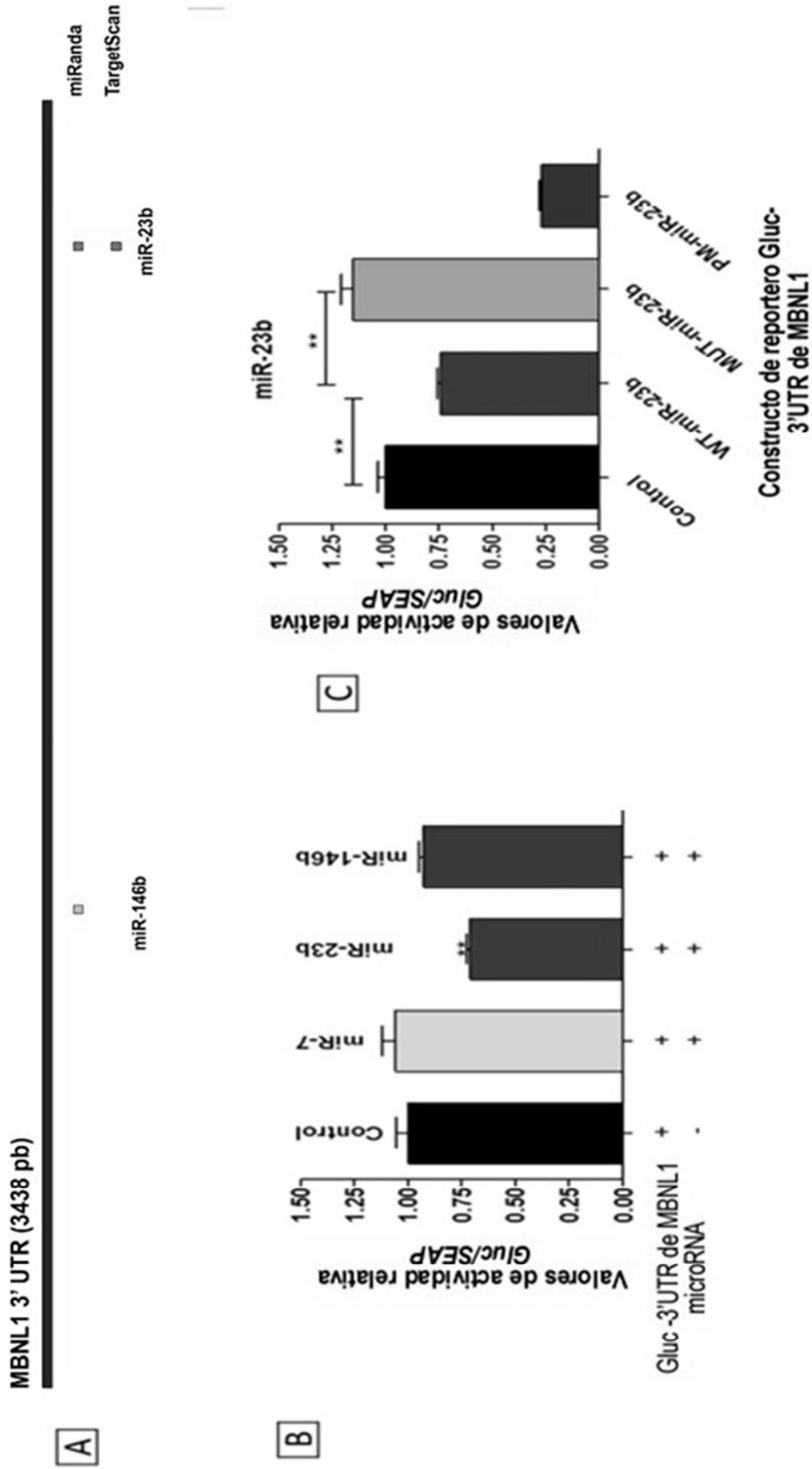
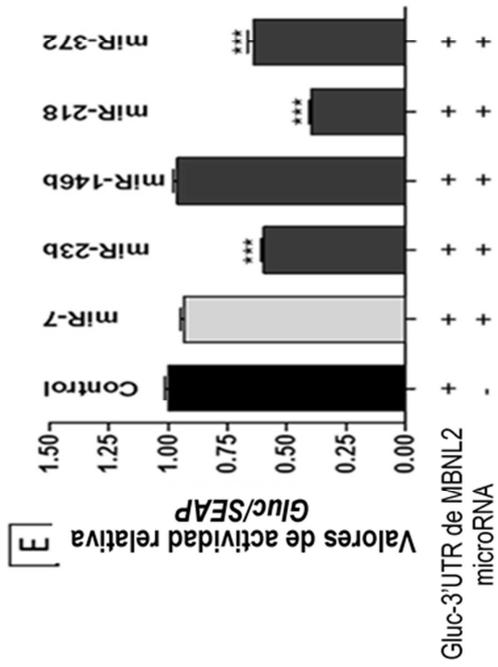


Fig. 6

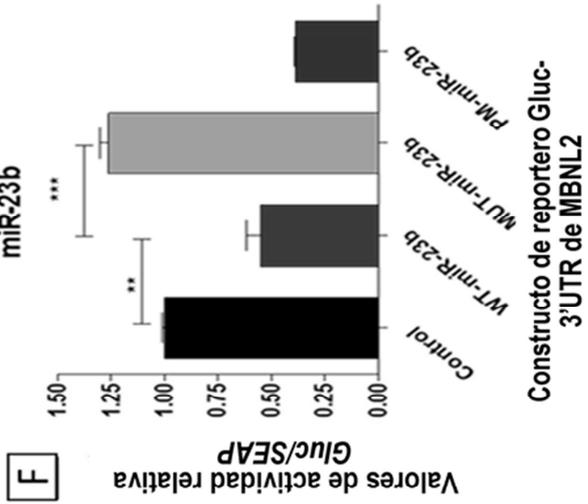
**MBNL2 3' UTR (2784 pb)**



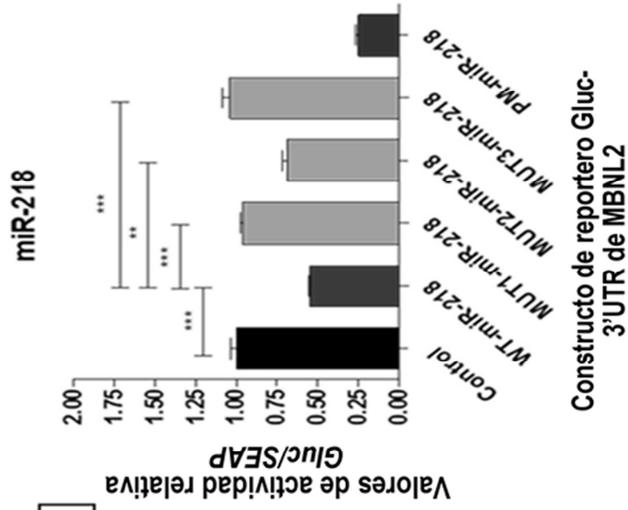
**D**



**E**



**F**



**G**

**Fig. 6 (cont.)**

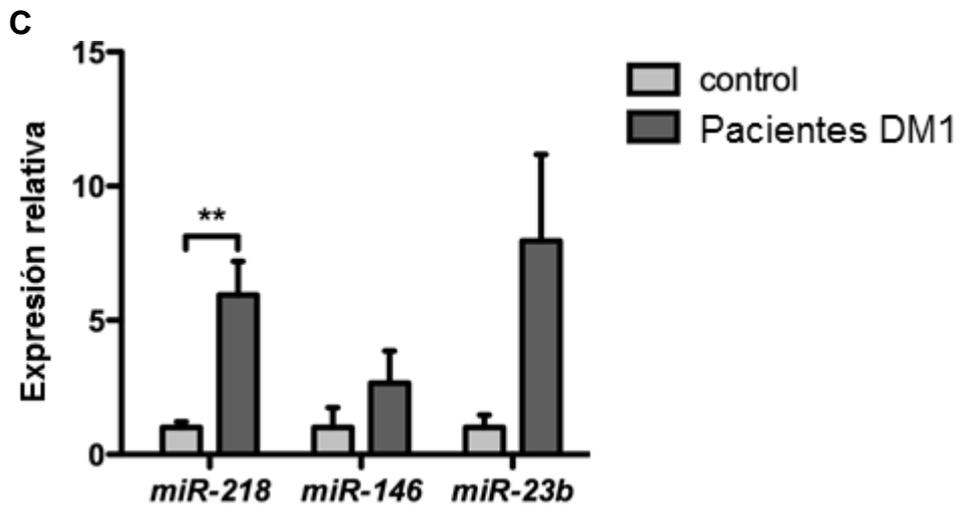
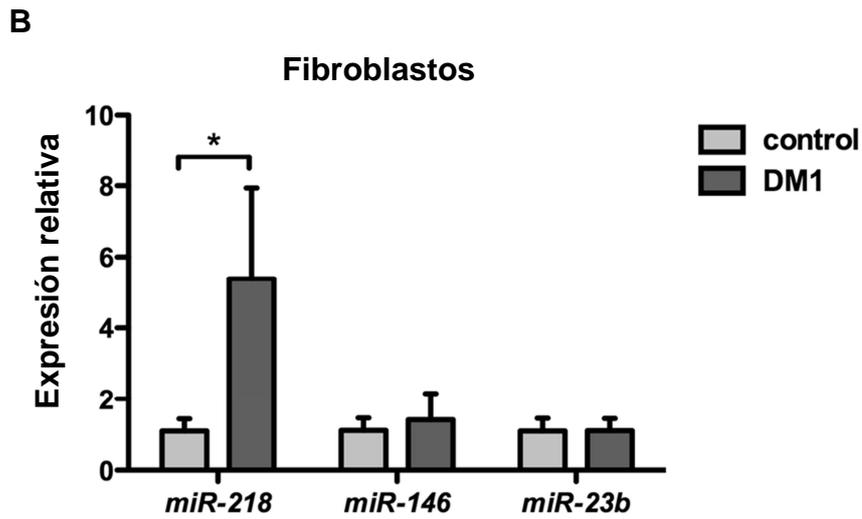
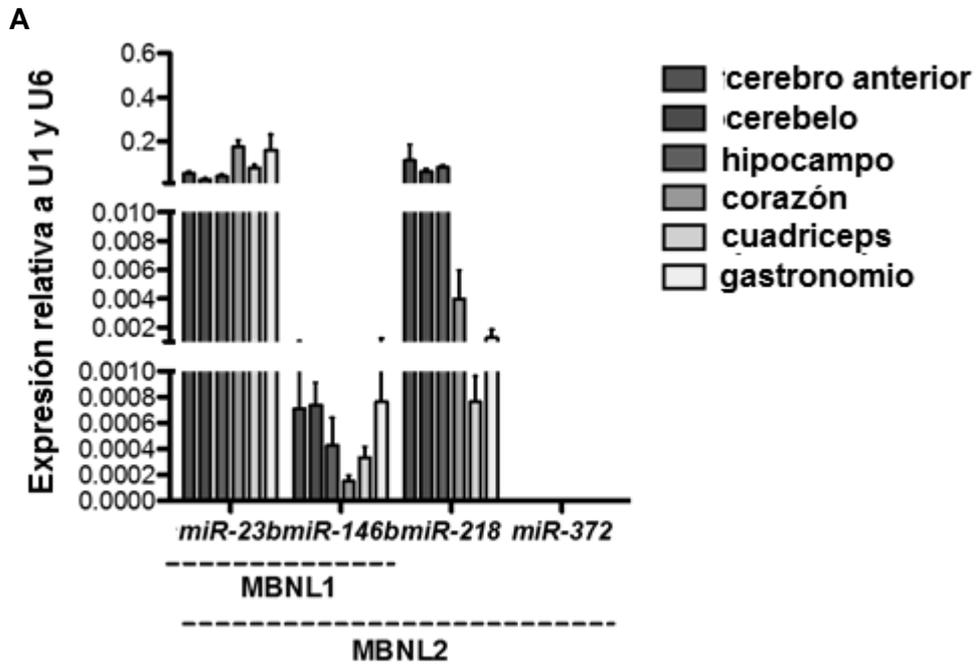
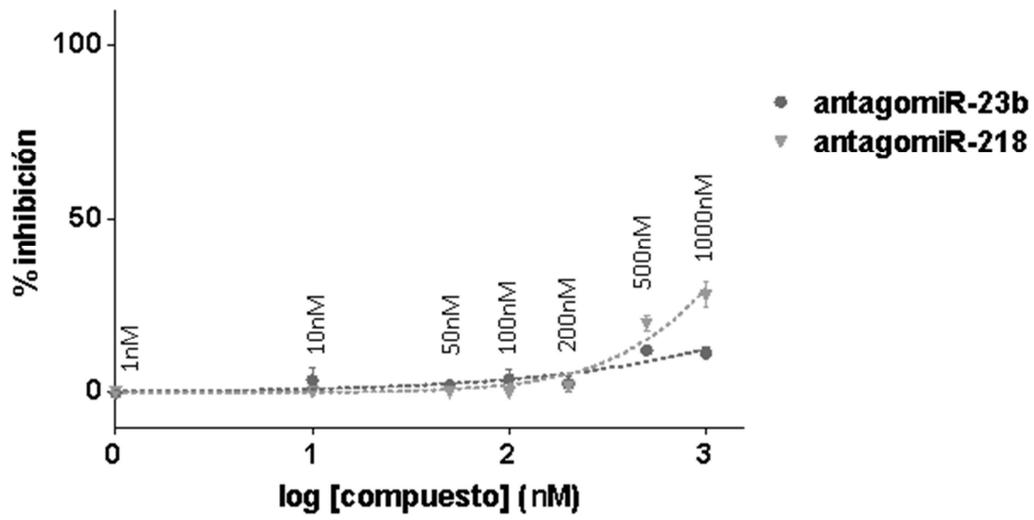


Fig. 7

**Mioblastos 60 h control**

**Z-factor= 0.46**

**curvas dosis respuesta**



**Fig. 8**

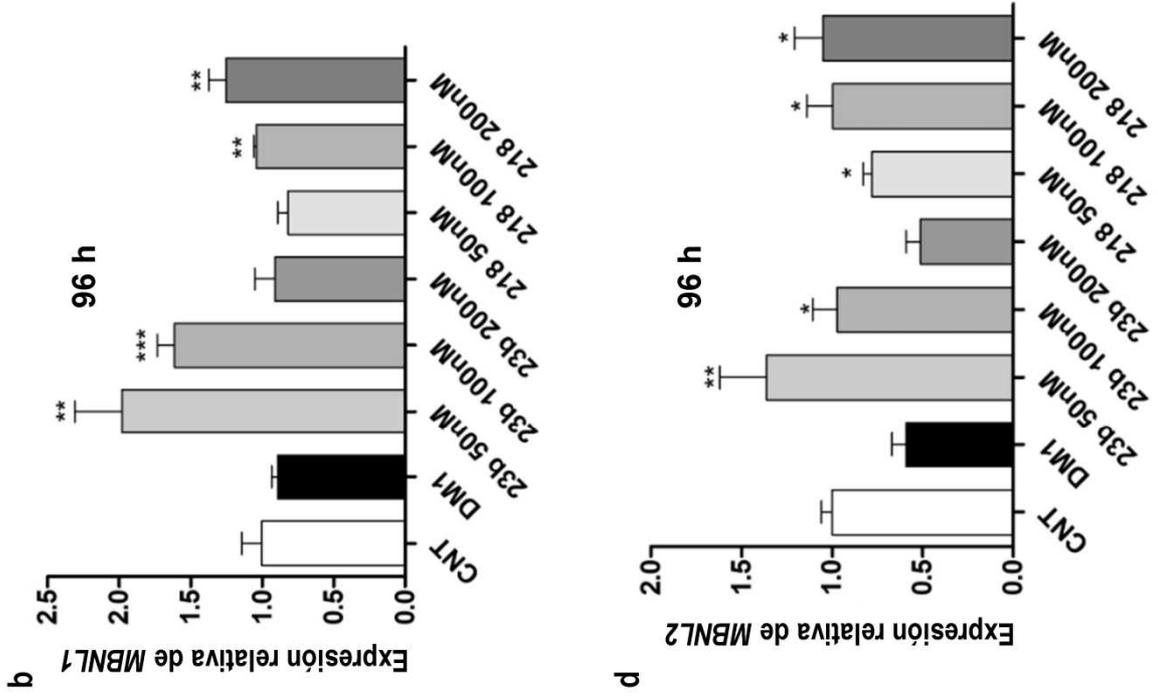
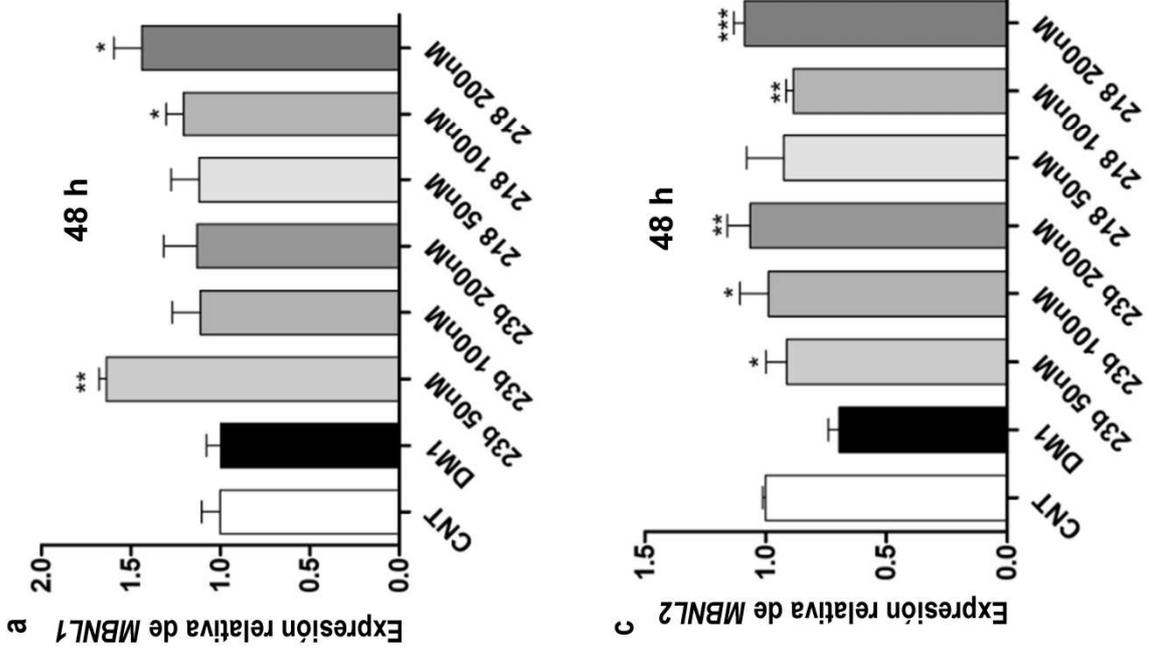


Fig. 6



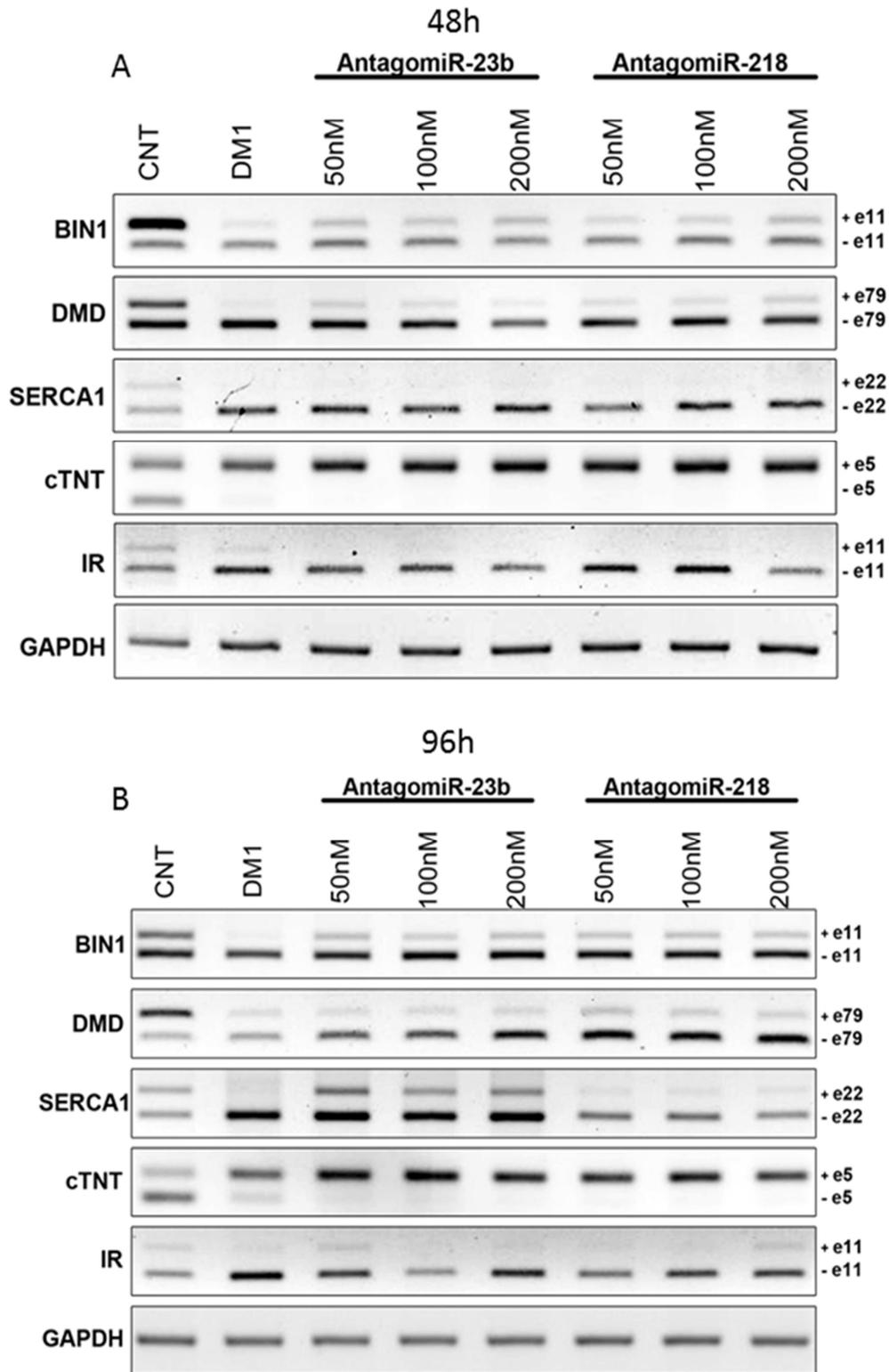


Fig. 10

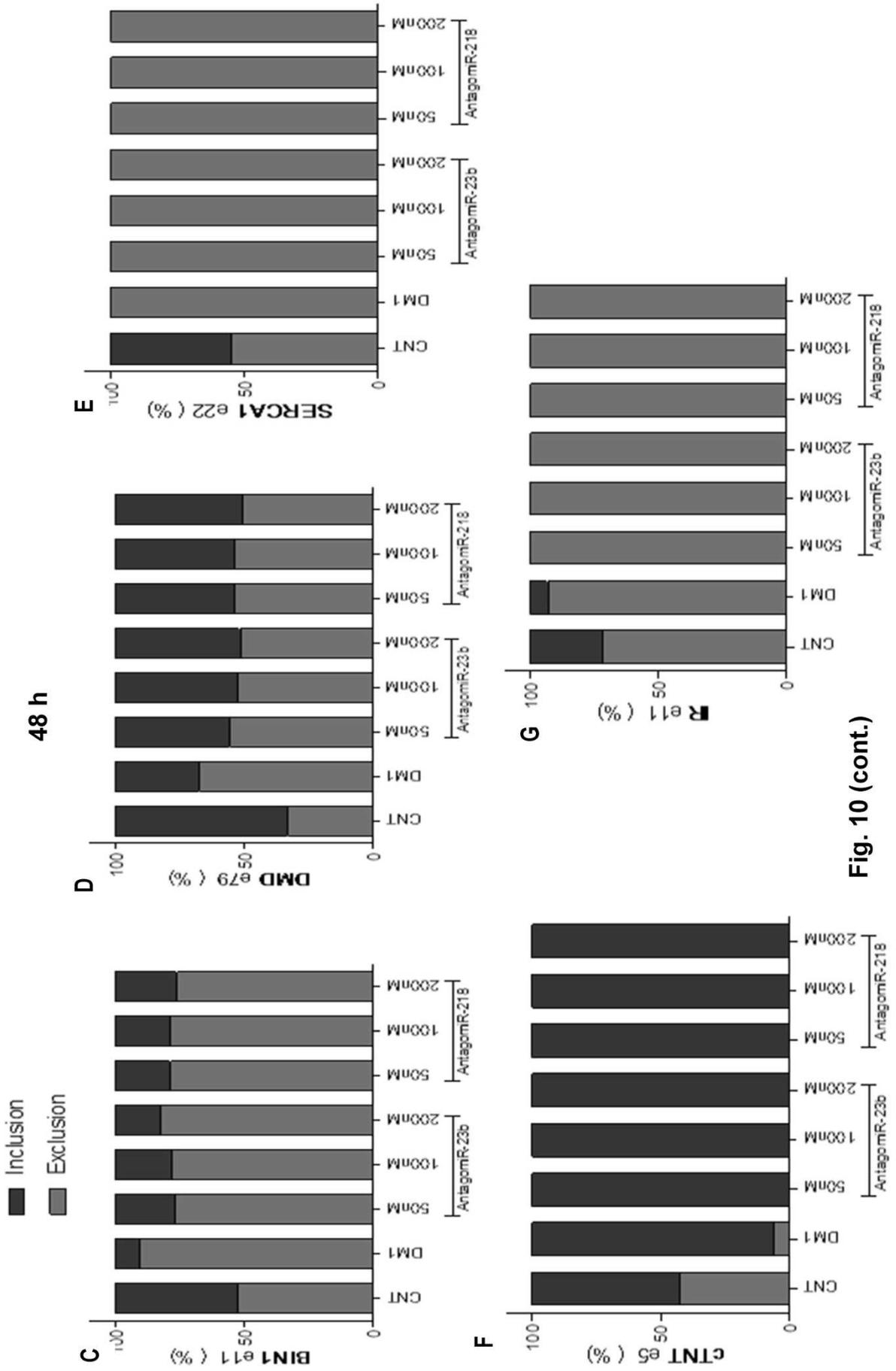


Fig. 10 (cont.)

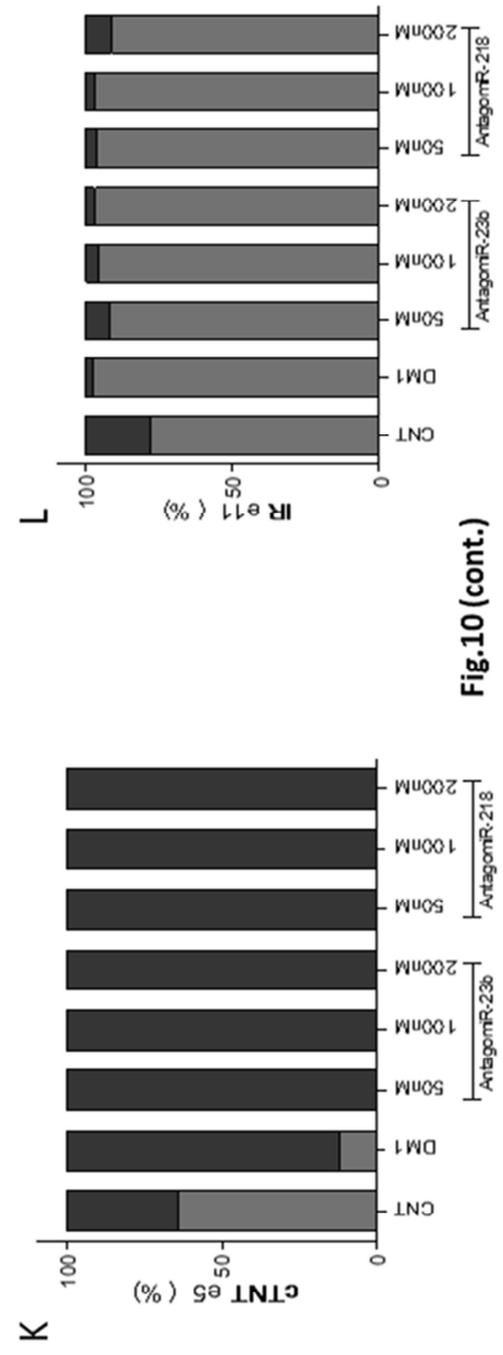
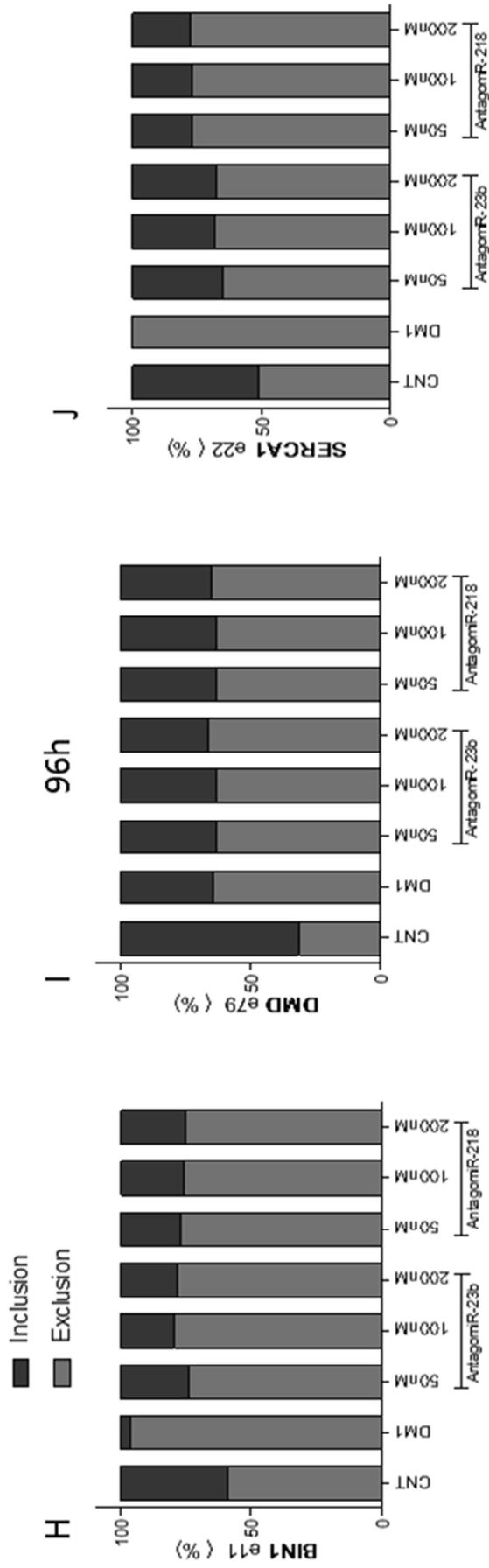


Fig.10 (cont.)

# ES 2 659 845 A1

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSITAT DE VALENCIA

<120> Modulación de microRNAs contra la distrofia miotónica tipo 1 y antagonistas de microRNAs para ello

<130> P-101442

<160> 66

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia complementaria al miR-218-5p humano, base para generación de inhibidores del mismo

<400> 1  
acaugguuag aucaagcaca a 21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia complementaria al miR-23b-3p, base para generar inhibidores del mismo

<400> 2  
gguaaucccu ggcaauguga u 21

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> RNA\_misceláneo

<222> (1)..(21)

<223> microRNA humano maduro miR-218-5p

<220>

<221> RNA\_misceláneo

<222> (2)..(8)

<223> Región semilla

<400> 3  
uugugcuuga ucuaccaug u 21

<210> 4

<211> 21

# ES 2 659 845 A1

<212> RNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> RNA\_misceláneo  
<222> (1)..(21)  
<223> microRNA humano maduro miR-23b-3p

<220>  
<221> RNA\_misceláneo  
<222> (2)..(8)  
<223> Región semilla

<400> 4  
aucacauugc cagggauuac c

21

<210> 5  
<211> 699  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Inserto del plásmido (nº producto SC400649) que codifica el RNA hsa-miR7 (MI0000265) con bucle en horquilla que origina el hsa-miR-7-5p

<220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (293)..(402)  
<223> Secuencia correspondiente al RNA hsa-miR-7 (MI0000265) con bucle en horquilla que origina el hsa-miR-7-5p

<220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (324)..(346)  
<223> Parte correspondiente al hsa-miR-7-5p maduro (MIMAT0000252)

<400> 5  
ctggagtgag ctgtgattgc accactgcac tacagcctgg gtgacagagc aagaccctgt 60  
ctcaccaaaa caaaacaaaa caactgtgtc cattatagaa agtagaacac tccagaaaaa 120  
agggaaaagt aagaaaaaat aatttctcca ggggaattctg aggtgaggag aggtgttcaa 180  
agatgaactt agtaatagga gcggagacaa cgcctcgcct gaaggagcat ccagaccgct 240  
gacctggtgg cgaggggagg ggggtggtcc tcgaacgcct tgcagaactg gcctggatac 300  
agagtggacc ggctggcccc atctggaaga ctagtgattt tgttggtgtc ttactgcgct 360  
caacaacaaa tcccagtcta cctaattgtg ccagccatcg cagcgggggtg caggaaatgg 420  
gggcagcccc cttttttggc tatecttcca cgtgttcttt tttgtatott ttgtgtttcc 480  
tagaaaacat ctcaggtcac caccctaac acccatcggc agactcttcc agaaacatgg 540  
acaaactatg gtgtgagcag ggaagtgggg cagggctctct gttttcaggg agcagtgagg 600  
tgcttcata cctactctg aagggcaggg ggagaaaaac cctccttaat tactaattcc 660

# ES 2 659 845 A1

cccaacaatc actttggggc acctataatg gaggcacct 699

<210> 6  
 <211> 650  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Inserto del plásmido (nº producto SC400295) que codifica el RNA hsa-miR-23b (MI0000439) con bucle en horquilla que origina el hsa-miR-23b-3p maduro

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (281)..(377)  
 <223> Parte correspondiente al RNA hsa-miR-23b (MI0000439) con bucle en horquilla que origina el hsa-miR-23b-3p maduro

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (299)..(320)  
 <223> Parte correspondiente al hsa-miR-23b-3p maduro (MIMAT0000418)

<400> 6  
 gaggcagtaa actaatagca aggacagctg cctttagcaa ttgtgtgtgt cgcattggccg 60  
 gtccttgcatt ttttcttcag ttccaaagct gcaactggcat ttttatggtc atctctggag 120  
 tccctttgat tcaagaaatt atacctctag gatgccaact aaacgaacaa caaacagaaa 180  
 ctccacctgt ttgctagcat aacaggcgtg aaggcggcag tgtcgccggc gtccttccgc 240  
 ggaagcccag tgtgtgcaga cagcacgggg tggcgtgct ctcaggtgct ctggctgctt 300  
 gggttcctgg catgctgatt tgtgacttaa gattaatac acattgccag ggattaccac 360  
 gcaaccacga ccttggctgc tcctccagaa accgtggctc cgctcactgc agattggaga 420  
 acaggtgcat ctgtagctc ttctttggaa acaaaagaag ccaccagctg aggaagatgc 480  
 tcaccggtca ccgtcccttt atttatgcc agcgtatgacc tctctaaca ggtgcagagc 540  
 ttagctgatt ggtgaacagt gattggtttc cgctttgttc acagtggcta agttctgcac 600  
 ctgaagagaa ggtgagatgg ggacagttaa gttggagccg ctggggcaga 650

<210> 7  
 <211> 665  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Inserto del plásmido (nº producto SC400179) que codifica el RNA hsa-miR-146b (MI0003129) con bucle en horquilla que origina el hsa-miR-146b

<220>

## ES 2 659 845 A1

<221> característica\_misclánea  
 <222> (294)..(366)  
 <223> Parte correspondiente al RNA hsa-miR-146b (MI0003129) con bucle en horquilla que origina el hsa-miR-146b

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (302)..(323)  
 <223> Parte correspondiente al hsa-miR-146b maduro (MIMAT0002809)

<400> 7  
 aacacatctg ggcaggaagc gacagatgga tccctgccat ggccctgagc cccctcccct 60  
 cttaacctac tccaattcct gttggaattt atggaactcc tgtccatttc cttagctgtg 120  
 ggccccatt ttcagctcca agctcagacc ctccctggaa taggagttct cttggtatca 180  
 caagttcctt atgtgacca tcctgggcct caacttactc atcctgggaa cgggagacga 240  
 ttcacagaag aaagcatgca agagcagcgt ccaggctgaa agaactttgg ccacctggca 300  
 ctgagaactg aattccatag gctgtgagct ctagcaatgc cctgtggact cagttctggt 360  
 gccggcagt gctacaacat caatgccaag gccgtggggc agctgatggt ttgggctccc 420  
 aacttcccag ccaggtgctt ctgcaggccc acatcttgcc cactggccaa acctttaaat 480  
 aactttgact cgggctactc ttatgctcaa agacgtcagg ggctctccca aatctcttta 540  
 cctgcccaga aagtcttcta tagtacggcc tccacttagc tttcacgct gatcttccat 600  
 cgcacctctg tcataacctg ccactagtga acccctgctg ctccggctcc acacttctca 660  
 tgctg 665

<210> 8  
 <211> 702  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Inserto del plásmido (nº producto SC400283) que codifica el RNA hsa-miR-218 (MI0000295) con bucle en horquilla que origina el hsa-miR-218-5p

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (299)..(408)  
 <223> Parte correspondiente al RNA hsa-miR-218 (MI0000295) con bucle en horquilla que origina el hsa-miR-218-5p

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (324)..(343)  
 <223> Parte correspondiente al hsa-miR-218-5p maduro (MIMAT0000275)

<400> 8  
 gtgataggat cacagatgtc tgagtgttct ttctttcctt ggaaggaac catgctgtcc 60

# ES 2 659 845 A1

```

tgaagctccc gagtatgggc atccagtgat ttccctcccg ttctttctccc ttccctactgt      120
gtctccctgg ggtggggcac aagggcagca gggctgcaat cttcggaagt gttccagtgg      180
aaccctactc ctgatactaa tcacgctcag tgggggcctg ctccggcttc cgctttctcca      240
cgctgcttcc tctgagcgct cctgtcctct ctctgacgct gcttcctgac cttgactctg      300
accagtcgct gcggggcttt cctttgtgct tgatctaacc atgtggtgga acgatggaaa      360
cggaacatgg ttctgtcaag caccgcggaa agcaccgtgc tctcctgcag catggcccgc      420
caccgcgcc accaccgctg gacacctctc ctctgctctg gagcaccgca gccaccacc      480
tgccagacc acctctcca gtctcaactc accaaaggca ggagggtagg agtctcaaag      540
gatgcagata cagagggaaa tgggtctgga gaagcacctt ggggaaagag atctgtatcc      600
acatctcttt cccaaaatgg agtcaccctc ccccaaactt agtctggatg tcagacaagg      660
agtaataact aggttcaagc tcagaaacta ctgtgtctct tc      702

```

```

<210> 9
<211> 625
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> Inserto del plásmido (nº producto SC400368) que codifica el
      RNA hsa-miR-372 (MI0000780) con bucle en horquilla que
      origina el hsa-miR-372

```

```

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (278)..(344)
<223> Parte correspondiente al RNA hsa-miR-372 (MI0000780) con bucle en
      horquilla que origina el hsa-miR-372-3p

```

```

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (319)..(341)
<223> Parte correspondiente al hsa-miR-372-3p maduro (MIMAT0000724)

```

```

<400> 9
gcctcttctg atgggtaagt gcttccactt gcgatcgccg ccttgccgca tcccctcagc      60
ctgtggcact caaactgtgg gggcactttc tgctctctgg tgaaagtgcc gccatctttt      120
gagtgttacc gcttgagaag actcaacctg cggagaagat accatthttga ttgggtgagg      180
gggcgggtag caggatggcc ctagaccctg cctatggccg tttcctcgtg atataaattt      240
cttgccgggg gctcttgca gtaggagctgc tcaccctgtg ggccctcaaat gtggagcact      300
attctgatgt ccaagtggaa agtgctgca catttgagcg tcaccggtga cgcctatc      360
aacggatgcc gtggagctcg gtcttctgca ggaactaaag agcctgtggt ttcgattccc      420
agccggaac tgtcttgggt acaggtccct tacagcgtct ggctgtaatg gctccggaaa      480

```

ES 2 659 845 A1

acctggggaa ggaaggggg cctcctgggc tctcacctga cacaactaag ggaatctggg 540  
 ttagatggtg aaaggaagag aaggttcaga gggcggctgt gcgcctgcgc cgggcgcggc 600  
 ggctcacacc tgtaatccca gcacg 625

<210> 10  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia base del antagomiR-218-5p, que incluye nucleótidos modificados

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (1)..(21)  
 <223> Nucleótido con modificación 2'-O-metil (2'-metoxi)

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (1)..(2)  
 <223> Nucleótido unido al siguiente por grupo fosforotioato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (18)..(20)  
 <223> Nucleótido unido al siguiente por enlace fosforotioato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Nucleótido unido a 4 grupos colesterol; el enlace del nucleótido al primer grupo colesterol es mediante un grupo fosforotioato

<400> 10  
 acaugguuag aucaagcaca a 21

<210> 11  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia del antagomir23b-5p

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (1)..(21)  
 <223> Nucleótido con modificación 2'-O-metil (2'-metoxi)

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (1)..(2)  
 <223> Nucleótido unido al siguiente por grupo fosforotioato

## ES 2 659 845 A1

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (18)..(20)  
 <223> Nucleótido unido al siguiente por enlace fosforotioato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Nucleótido unido a 4 grupos colesterol; el enlace del nucleótido al primer grupo colesterol es mediante un grupo fosforotioato

<400> 11  
 gguaaucccu ggcaauguga u 21

<210> 12  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> RNA\_misceláneo  
 <222> (1)..(21)  
 <223> microRNA-23b: hsa-miR-23b-3p maduro (MIMAT0000418)

<400> 12  
 aucacauugc cagggauuac c 21

<210> 13  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> RNA\_misceláneo  
 <222> (1)..(21)  
 <223> microRNA-218: hsa-miR-218-5p maduro (MIMAT0000275)

<400> 13  
 uugugcuuga ucuaaccaug u 21

<210> 14  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador directo de amplificación de transcrito de PCR del gen GAPDH

<400> 14  
 catcttcag gagcgagatc 20

<210> 15  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

# ES 2 659 845 A1

<220>  
<223> Cebador inverso de amplificación de transcrito de PCR del gen GAPDH

<400> 15  
gttcacaccc atgacgaaca t 21

<210> 16  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de amplificación de transcrito de PCR del gen cTNT

<400> 16  
atagaagagg tgggtgaaga gtac 24

<210> 17  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de amplificación de transcrito de PCR del gen cTNT

<400> 17  
gtctcagcct ctgcttcagc atcc 24

<210> 18  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de amplificación de transcrito de PCR del gen IR

<400> 18  
tgctgctcct gtccaaagac 20

<210> 19  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de amplificación de transcrito de PCR del gen IR

<400> 19  
gaagtgttgg ggaaagctg 19

<210> 20

## ES 2 659 845 A1

<211> 24  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de amplificación de transcrito de PCR del gen  
BIN1

<400> 20  
ctcaaccaga acctcaatga tgtg 24

<210> 21  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de amplificación de transcrito de PCR del gen  
BIN1

<400> 21  
ctgagatggg gacttgggga g 21

<210> 22  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de amplificación de transcrito de PCR del gen  
DMD

<400> 22  
gtgaggaaga tcttctcagt cc 22

<210> 23  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de amplificación de transcrito de PCR del gen  
DMD

<400> 23  
ctccatcgct ctgcccaat c 21

<210> 24  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de amplificación de transcrito de PCR del gen  
SERCA1

## ES 2 659 845 A1

<400> 24  
 gatgatcttc aagctccggg c 21

<210> 25  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador inverso de amplificación de transcrito de PCR del gen SERCA1

<400> 25  
 cagctctgcc tgaagatgtg 20

<210> 26  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Drosophila melanogaster

<220>  
 <221> RNA\_misceláneo  
 <222> (1)..(22)  
 <223> microRNA maduro dme-mR-92a-3p (MIMAT0000334)

<400> 26  
 caugcacuu gucccggccu au 22

<210> 27  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Drosophila melanogaster

<220>  
 <221> RNA\_misceláneo  
 <222> (1)..(22)  
 <223> MicroRNA maduro dme-miR-100-5p (MIMAT0000357)

<400> 27  
 aaccguaaa uccgaacuug ug 22

<210> 28  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Drosophila melanogaster

<220>  
 <221> RNA\_misceláneo  
 <222> (1)..(23)  
 <223> microRNA maduro dme-miR-124-3p (MIMAT0000351)

<400> 28  
 uaaggcacgc ggugaaugcc aag 23

## ES 2 659 845 A1

<210> 29  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Drosophila melanogaster  
  
 <220>  
 <221> RNA\_misceláneo  
 <222> (1)..(23)  
 <223> microRNA maduro dme-miR-277-3p (MIMAT0000338)  
  
 <400> 29  
 uaaaugcacu aucugguacg aca 23

<210> 30  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Drosophila melanogaster  
  
 <220>  
 <221> RNA\_misceláneo  
 <222> (1)..(23)  
 <223> microRNA maduro dme-miR-304-5p (MIMAT0000390)  
  
 <400> 30  
 uaaucucaau uuguaaaugu gag 23

<210> 31  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo de qRT-PCR de mbl  
  
 <400> 31  
 ttgaatcaaa attatagccc aagct 25

<210> 32  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de qRT-PCR de mbl  
  
 <400> 32  
 cgattttgct cgttagcgtt t 21

<210> 33  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo de qRT-PCR de mblA

# ES 2 659 845 A1

<400> 33 cagacaccga aatactctct acaaaca	27
<210> 34 <211> 30 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Cebador inverso de qRT-PCR de mb1A	
<400> 34 aaaatcagga gtaaacaat acacgtagac	30
<210> 35 <211> 26 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Cebador directo de qRT-PCR de mb1B	
<400> 35 cacacatcca gatatgctac ttacca	26
<210> 36 <211> 22 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Cebador inverso de qRT-PCR de mb1B	
<400> 36 tgagcgattt cgattgattt tg	22
<210> 37 <211> 23 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Cebador directo de qRT-PCR de mb1C	
<400> 37 cagcaaacac acatcaccta cca	23
<210> 38 <211> 23 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Cebador inverso de qRT-PCR de mb1C	

# ES 2 659 845 A1

<400> 38 ctatcgagca ggaggatgaa gag	23
<210> 39 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Cebador directo de qRT-PCR de mb1D	
<400> 39 gcctctggaa aatgctgcaa	20
<210> 40 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Cebador inverso de qRT-PCR de mb1D	
<400> 40 cagcaaccgc aaaagagctt	20
<210> 41 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Cebador directo de qRT-PCR de Serca	
<400> 41 gcagatgttc ctgatgtcg	19
<210> 42 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Cebador inverso de qRT-PCR de Serca	
<400> 42 cgtcctcctt cacattcac	19
<210> 43 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Cebador directo de qRT-PCR de Cyp6w1	

## ES 2 659 845 A1

<p>&lt;400&gt; 43 ttgcgcaaa aatctctcc</p>	20
<p>&lt;210&gt; 44 &lt;211&gt; 20 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Cebador inverso de qRT-PCR de Cyp6w1</p>	
<p>&lt;400&gt; 44 gtcctgcaag ttctttcaa</p>	20
<p>&lt;210&gt; 45 &lt;211&gt; 26 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Cebador directo de qRT-PCR de Rp49</p>	
<p>&lt;400&gt; 45 ggatcgatat gctaagctgt cgcaca</p>	26
<p>&lt;210&gt; 46 &lt;211&gt; 24 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Cebador inverso de qRT-PCR de Rp49</p>	
<p>&lt;400&gt; 46 ggtgcgcttg ttcgatccgt aacc</p>	24
<p>&lt;210&gt; 47 &lt;211&gt; 20 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Cebador directo de qRT-PCR de Fhos</p>	
<p>&lt;400&gt; 47 gtcatggagt cgagcagtga</p>	20
<p>&lt;210&gt; 48 &lt;211&gt; 20 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Cebador inverso de qRT-PCR de Fhos</p>	

# ES 2 659 845 A1

```

<400> 48
tgtgatgcgg gtatctacga 20

<210> 49
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de qRT-PCR de Tnt

<400> 49
cgacgatgaa gactacac 18

<210> 50
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de qRT-PCR de Tnt

<400> 50
actcggatgat gtattctttc ag 22

<210> 51
<211> 3438
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> 3'UTR
<222> (1)..(3438)
<223> Región 3'UTR del transcrito del gen MBNL1 (NM_207297.1) insertada
en el plásmido pEZX-MT05

<220>
<221> unión_misclánea
<222> (3130)..(3150)
<223> Región de unión del miR-23b

<400> 51
ccacaagtat gttaccaga tgtagaattt tcatcactaa acaatcatgc taaagaggaa 60
aggacagtgt gcttggttag agtaaaggac gaggtcatta gccatattgt atatatcgtc 120
aagcaacaca cacaaaagtt cctcagccac aagacatcca catattgcat gttaaccaga 180
agaaaagaca acattttccg gaaatccact gcacactggt gcctatacac tttgtacatt 240
taattgatat ttgtgctgag gtgatattcc tgtctaaaag aacaacattg tctttctttt 300
ctagcacaga gttatgcatt caaagatgca tacctagtta gtttctata tattcatgcc 360
atcttgaaaa gacagactat ggtgtaacca tgattctatt atgtattggt acgtctgtag 420

```

# ES 2 659 845 A1

accaagatat	aatTTTTTtaa	aaataagttt	atTtctttca	aggTtttaca	ataacaaagg	480
tgcaccttgt	atTtaaaatt	gccattatag	atgagagcgt	gcatgcacag	tcatttttgt	540
ttaagagtaa	tattttttaa	gtaatagatt	gtaagacgtg	gtgagggagg	gatctgacag	600
agatgaatgt	gccaagcaaa	accacaactg	tgtatatttt	aaagcacatc	atggctttaa	660
gtaccatggt	gttaaggatt	ctcatgaagt	gccatagact	gtacatcaaa	ttagagtatt	720
atTtcttcag	tgTtattggt	ttcagagcca	cattttgttg	catatttgct	agtactaatc	780
agtcaaaggg	caccattctt	TTTTTTTTT	ttTgaaacca	aagctgtctc	agaaatggcc	840
aatttaactt	tacagtaaca	atagacagca	caacacaaac	tctctcaata	cagataaact	900
cacacatact	ggagatatat	atataataga	tatatataaa	attatTTTtaa	tgcattgtag	960
tgtaatattt	atgcatacta	tactgtataa	catgttattc	aaaagggatt	gccatttctg	1020
agacacagta	acaaaaaaaa	gaggaaatta	ttTtgcttct	atTtatagcc	tctgtcaaaa	1080
gtcaaaagac	tataaatgct	ttgcaaaaat	ggTttcacgt	ttgcttaa	gcttcatcac	1140
agtcacattc	aaaatagtga	ctctaaacaa	agaagaaagc	agcactgtca	tcagatgcat	1200
gataaaccaa	aatatgaaaa	tgggaaatgt	ttaattaacc	tagtaattgg	gtgggttaag	1260
tacatgggtg	aatTttatat	gtgattTttg	ttTtgTttTg	ttTtgTtcag	attaactgct	1320
tatagcctta	gaaagccttt	tacaaaatta	aaaaaaaaat	agatgtgcat	tcagTttTta	1380
agaatggaat	catccaaagg	aattcctttt	ttTgaggttt	ggatgttgca	gctagtaaag	1440
gatattTttg	ctctgttcag	cagTtctaaa	aattgctgaa	gtaggggcca	ggTcactggT	1500
agTtatagta	tggaaatggga	gaagtgaag	ttcagTtata	gaaactTtcca	tactTtccaag	1560
ttTactgcaa	gtTtttatgc	ttgagagaga	tgctTtctaa	tataagactg	atgtgttgat	1620
ttTactgatt	gtactgtaca	tctattaaag	ccttagatta	ttacattacg	ggTtggaaacc	1680
cataccaatg	taatttcaat	cgtgttaaga	aagtaatggT	gactTcacat	gttattgtag	1740
ttagttacat	tatagaatat	tacttatttt	tcttgTtaaa	atgtagTttt	tcattTccta	1800
catttattag	atTttcattt	tctattaaaca	attgaatacc	atTtcagTtt	atagactTgt	1860
ttTattagat	ttTaccaatg	aatTtttcaa	aatacaaaaa	aaagtagTtt	ttcctTcata	1920
acatactcag	ttTtgaatta	catgtagtgt	cacatgaata	ttcgtattgt	taactaaatg	1980
atTtatattt	tactgattta	atattacagt	gtaagaatgt	cagTcattgt	tagTtcttgt	2040
ctagTtttca	tTaaaagaac	aaagatcttt	tatatggata	tctTataaat	atataatcat	2100
tgctaagtaa	gaagttaagt	tgTtgctatc	gcaacaatcc	tggcagacaa	ttgagtaata	2160
ttTtgatgat	ttatTttggt	tgtaattagt	tattataaga	agatctagat	cctagatatt	2220

# ES 2 659 845 A1

```

agaataaaat ttatcttctc ctgtatccat ttcaaagtgt aaaatattgt ttaatatttt      2280
tgaaatccct gagtatcagg ccttggtata aataagctgc ataatacaata aatagaacaa      2340
gggacttttt gttgataatc caaataactca aagtttacgt aatgaaaatt atagcgtgtg      2400
tgcaaaactct tgagggttga ttatgctgca atttagcatg ttggaacgtc tagggagaag      2460
gttgactttt tgcacttctg tatatagtca aaagagagaa acctgtataa tagtaagatc      2520
ttatcttgaa taaaaacgtc tataattaca aggagttttg ttaaggctaa tacaatgaca      2580
gactgagcaa aattgcttgc aaaagtggca cagagtttagc actccatacc ccttcaaaca      2640
tgttgctttg ctttcttgtg gacagcttgt agtttgccag gattttttca gctggaaaga      2700
tacgccatcc tttcaaacc ccatgactga caaaaactcc atggggccaa atctgctga      2760
agatcattac caaaaatagc aggtacttct accattaagg tgaaatcatg gatcagatat      2820
tccttacatt tttcaaaact actgcatggt taaaacttca acaaaaaaag agagaaagaa      2880
ctatactaag aacatatatt attcagatca gtttctgcca atttcagtgg tttattgttc      2940
acaaaaaat cttcaaaaca agtattgact ttcacaaaat ttaaatcata aacaggcaaa      3000
ccaaacagca cactgtagct atagttgtta tgtgattggt ttttaattgc tgtaggatcc      3060
tgttctttca gcagggtgaaa aataaaacgc agttcaaatt tcatggtttt aattttcaac      3120
tcagaagcac tcaaaaatgc aaaatgtgat aatgggcact tgtttaaaag aattagtgtg      3180
tccagccttc actccagctg gttaaaaatg ttgcacttat cagcaaccct accactttca      3240
tctgctgaaa ggacaaatgt gcttggtttt actattatgt aatcacaact tactttctgc      3300
ttgtagttgc ttaaaattat gtattttgtc ttgggctgca atttgtttta tgcttatttt      3360
attattactg cagtagttga ctttgctgta tggaaaaata aagtgaaatt gccctaataa      3420
aacttctctt tcttaagt                                     3438

```

```

<210> 52
<211> 3430
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> 3'UTR de MBNL1 con región semilla de miR-23b deletcionada (3'UTR
MUT-23b)

```

```

<220>
<221> característica_misclánea
<222> (3142)..(3143)
<223> Nucleótidos flanqueantes del fragmento de la región semilla
deletcionado

```

```

<400> 52
ccacaagtat gttaccaga tgtagaattt tcatcactaa acaatcatgc taaagaggaa      60

```

# ES 2 659 845 A1

aggacagtgt gcttggttag agtaaaggac gaggtcatta gccatattgt atatatcgtc	120
aagcaacaca cacaaaagtt cctcagccac aagacatcca catattgcat gttaaccaga	180
agaaaagaca acatthttccg gaaatccact gcacactggt gcctatacac tttgtacatt	240
taattgatat ttgtgctgag gtgatattcc tgtctaaaag aacaacattg tctttctttt	300
ctagcacaga gttatgcatt caaagatgca tacctagtta gtttcctata tattcatgcc	360
atcttgaaaa gacagactat ggtgtaacca tgattctatt atgtattggt acgtctgtag	420
accaagatat aatthtttaa aaataagttt atthctttca aggtttacaa ataacaaagg	480
tgcacctgtt atthaaaatt gccattatag atgagagcgt gcatgcacag tcathtttgt	540
ttaagagtaa tathtttaat gtaatagatt gtaagacgtg gtgagggagg gatctgacag	600
agatgaatgt gccaaagcaa accacaactg tgtatathtt aaagcacatc atggctthta	660
gtaccatggt gttaaaggatt ctcatgaagt gccatagact gtacatcaaa ttagagtatt	720
atthcttcag tgttattggt ttcagagcca cathttgttg catathttgct agtactaatc	780
agtcaaaggg caccattctt thttthtttt tttgaaacca aagctgtctc agaaatggcc	840
aatthaaactt tacagtaaca atagacagca caacacaaac tctctcaata cagataaaact	900
cacacatact ggagatatat atataataga tatatataaa atthttthta tgcattgtag	960
tgtaatathtt atgcatacta tactgtataa catgttathc aaaagggatt gccathttctg	1020
agacacagta acaaaaaaat gaggaaatta tthtgcttct atthtatagcc tctgtcaaaa	1080
gtcaaaagac tataaatgct ttgcaaaaat ggtthcacgt ttgctthaaat gcttcatcac	1140
agtcacathc aaaatagtga ctctaaacaa agaagaaagc agcactgtca tcagatgcat	1200
gataaaccaa aatatgaaaa tgggaaatgt ttaattaacc tagtaattgg gtgggttaag	1260
tacatgggtg aatthttatat gtgathtttg tthtgthttg tthtgthtcag atthaaactgct	1320
tatagcctta gaaagcctth tacaaaatta aaaaaaaat agatgtgcat tcagthttta	1380
agaatggaat catccaaagg aathctthtt tthgaggtth ggatgttgca gctagtaaa	1440
gatathtttg ctctgttcag cagthctaaa aathgctgaa gtaggggcca ggtcactggt	1500
agttatagta tggaatggga gaagtgaaag thcagttata gaactthcca tactthcaa	1560
thtactgcaa gthtttatgc ttgagagaga tgctthctaa tataagactg atgtgttgat	1620
thtactgatt gtactgtaca tctathaaag cthtagatta ttacathacg ggttggaacc	1680
cataccaatg taaththcaat cgtgttaaga aagtaatggt gactthcacat gttathgtag	1740
ttagttacat tatagaatat tactthathtt tctthgtthaa atgtagthtt tcaththccta	1800
caththattag atththcath tctathaaaca atthgaatacc atthcagthtt atagactthgt	1860

## ES 2 659 845 A1

tttattagat tttaccaatg aatTTTTcaa aatacaaaaa aaagtagttt ttccttcata	1920
acataactcag ttttgaatta catgtagtgt cacatgaata ttcgtattgt taactaaatg	1980
atttatattt tactgattta atattacagt gtaagaatgt cagtcattgt tagttcttgt	2040
ctagttttca ttaaaagaac aaagatcttt tatatggata tcttataaat atataatcat	2100
tgctaagtaa gaagttaagt tgttgctatc gcaacaatcc tggcagacaa ttgagtaata	2160
ttttgatgat ttattttggt tgtaattagt tattataaga agatctagat cctagatatt	2220
agaataaaat ttatttttcta ctgtatccat ttcaaagtgt aaaatattgt ttaatatttt	2280
tgaaatccct gagtatcagg ccttgttata aataagctgc ataatacaata aatagaacaa	2340
gggacttttt gttgataatc caaatactca aagtttacgt aatgaaaatt atagcgtgtg	2400
tgcaaaactct tgaggggttga ttatgctgca atttagcatg ttggaacgtc tagggagaag	2460
gttgactttt tgcacttctg tatatagtca aaagagagaa acctgtataa tagtaagatc	2520
ttattttgaa taaaaacgtc tataattaca aggagttttg ttaaggctaa tacaatgaca	2580
gactgagcaa aattgcttgc aaaagtggca cagagttagc actccatacc ccttcaaaca	2640
tgttgctttg ctttcttgtg gacagcttgt agtttgccag gattttttca gctggaaaga	2700
tacgccatcc tttcaaacc ccatgactga caaaaactcc atggggccaa atctgcttga	2760
agatcattac caaaaatagc aggtacttct accattaagg tgaaatcatg gatcagatat	2820
tccttacatt tttcaaaact actgcatggt taaaacttca acaaaaaaag agagaaagaa	2880
ctatactaag aacatatatt attcagatca gtttctgcca atttcagtggt tttattgttc	2940
acaaaaaat cttcaaaca agtattgact ttcacaaaat ttaaatcata aacaggcaaa	3000
ccaaacagca cactgtagct atagttgtta tgtgattggt ttttaattgc tgtaggatcc	3060
tgttctttca gcaggtgaaa aataaaacgc agttcaaatt tcatggtttt aattttcaac	3120
tcagaagcac tcaaaaatgc aaaatgggca cttgtttaaa agaattagtg tatccagcct	3180
tactccagc tggttaaaaa tgttgactt atcagcaacc ctaccacttt catctgctga	3240
aaggacaaat gtgcttggtt ttactattat gtaatcacia cttactttct gcttgtagtt	3300
gcttaaaatt atgtattttg tcttgggctg caatttggtt tatgcttatt ttattattac	3360
tgcagtagtt gactttgctg tatggaaaaa taaagtgaaa ttgccctaataaaaacttctc	3420
tttcttaagt	3430

<210> 53  
 <211> 3438  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

# ES 2 659 845 A1

```

<220>
<223> Inserto del plásmido pEZX-MT05 con la 3'UTR de MBNL1 modificada
      (3'UTR PM-23b)

<220>
<221> unión_misclánea
<222> (3130)..(3150)
<223> Región modificada para tener complementariedad perfecta con
      miR-23b

<400> 53
ccacaagtat gttaccaga tgtagaat tcatcactaa acaatcatgc taaagaggaa      60
aggacagtgt gcttggttag agtaaaggac gaggtcatta gccatattgt atatatcgtc      120
aagcaacaca cacaaaagtt cctcagccac aagacatcca catattgcat gttaaccaga      180
agaaaagaca acattttccg gaaatccact gcacactggt gcctatacac tttgtacatt      240
taattgatat ttgtgctgag gtgatattcc tgtctaaaag aacaacattg tctttctttt      300
ctagcacaga gttatgcatt caaagatgca tacctagtta gtttcctata tattcatgcc      360
atcttgaaaa gacagactat ggtgtaacca tgattctatt atgtattggt acgtctgtag      420
accaagatat aattttttta aaataagttt atttctttca aggtttacaa ataacaaagg      480
tgcaccttgt atttaaaatt gccattatag atgagagcgt gcatgcacag tcatttttgt      540
ttaagagtaa tatttttaat gtaatagatt gtaagacgtg gtgagggagg gatctgacag      600
agatgaatgt gccaaagcaa accacaactg tgtatatttt aaagcacatc atggctttta      660
gtaccatggt gttaaggatt ctcatgaagt gccatagact gtacatcaaa ttagagtatt      720
atctcttcag tgttattggt ttcagagcca cattttggtg catatttgct agtactaatc      780
agtcaaaggg caccattctt tttttttttt tttgaaacca aagctgtctc agaaatggcc      840
aatttaactt tacagtaaca atagacagca caacacaaac tctctcaata cagataaact      900
cacacatact ggagatatat atataataga tatatataaa attattttta tgcattgtag      960
tgtaatattt atgcatacta tactgtataa catgttattc aaaagggatt gccatttctg      1020
agacacagta acaaaaaaat gaggaaatta ttttgcttct atttatagcc tctgtcaaaa      1080
gtcaaaagac tataaatgct ttgcaaaaat ggtttcacgt ttgcttaaat gcttcatcac      1140
agtcacattc aaaatagtga ctctaaacaa agaagaaagc agcactgtca tcagatgcat      1200
gataaaccaa aatatgaaaa tgggaaatgt ttaattaacc tagtaattgg gtggggttaag      1260
tacatgggtg aattttatat gtgatttttg ttttgttttg ttttgttcag attaactgct      1320
tatagcctta gaaagccttt tacaaaatta aaaaaaaaaat agatgtgcat tcagttttta      1380
agaatggaat catccaaagg aattcctttt tttgaggttt ggatgttgca gctagtaaag      1440

```

# ES 2 659 845 A1

gatatTTTTg ctctgttcag cagttctaaa aattgctgaa gtaggggccca ggtcactggt	1500
agttatagta tggaatggga gaagtgaaag ttcagttata gaactttcca tacttccaag	1560
tttactgcaa gtttttatgc ttgagagaga tgctttctaa tataagactg atgtgttgat	1620
tttactgatt gtactgtaca tctattaaag ccttagatta ttacattacg ggttggaacc	1680
cataccaatg taatttcaat cgtgttaaga aagtaatggt gacttcacat gttattgtag	1740
ttagttacat tatagaatat tacttatttt tcttgttaaa atgtagtttt tcatttccta	1800
catttattag attttcattt tctattaaaca attgaatacc atttcagttt atagacttgt	1860
tttattagat tttaccaatg aatTTTTcaa aatacaaaaa aaagtagttt ttccttcata	1920
acatactcag ttttgaatta catgtagtgt cacatgaata ttcgtattgt taactaaatg	1980
atztatattt tactgattta atattacagt gtaagaatgt cagtcattgt tagttcctgt	2040
ctagttttca ttaaaagaac aaagatcttt tatatggata tcttataaat atataatcat	2100
tgctaagtaa gaagttaagt tgttgctatc gcaacaatcc tggcagacaa ttgagtaata	2160
ttttgatgat ttattttggt tgtaattagt tattataaga agatctagat cctagatatt	2220
agaataaaat ttattttcta ctgtatccat ttcaaagtgt aaaatattgt ttaatatttt	2280
tgaaatccct gagtatcagg ccttgttata aataagctgc ataatacaata aatagaacaa	2340
gggacttttt gttgataatc caaatactca aagtttacgt aatgaaaatt atagcgtgtg	2400
tgcaaaactct tgagggttga ttatgctgca atttagcatg ttggaacgtc tagggagaag	2460
gttgactttt tgcacttctg tatatagtca aaagagagaa acctgtataa tagtaagatc	2520
ttattttgaa taaaaacgtc tataattaca aggagttttg ttaaggctaa tacaatgaca	2580
gactgagcaa aattgcttgc aaaagtggca cagagttagc actccatacc ccttcaaaca	2640
tgttgctttg ctttcttgtg gacagcttgt agtttgccag gattttttca gctggaaaga	2700
tacgccatcc tttcaaacc tcatgactga caaaaactcc atggggccaa atctgcctga	2760
agatcattac caaaaatagc aggtacttct accattaagg tgaaatcatg gatcagatat	2820
tccttacatt tttcaaaact actgcatggt taaaacttca acaaaaaaag agagaaagaa	2880
ctatactaag aacatatatt attcagatca gtttctgcca atttcagtgg tttattgttc	2940
acaaaaaat cttcaaaca agtattgact ttcacaaaat ttaaatcata aacaggcaaa	3000
ccaacagca cactgtagct atagttgtta tgtgattggt ttttaattgc tgtaggatcc	3060
tgttctttca gcaggtgaaa aataaaacgc agttcaaatt tcatggtttt aatTTTcaac	3120
tcagaagcag gtaatccctg gcaatgtgat aatgggcact tgtttaaaag aattagtgta	3180
tccagccttc actccagctg gttaaaaatg ttgcacttat cagcaacct accactttca	3240

# ES 2 659 845 A1

```

tctgctgaaa ggacaaatgt gcttgggtttt actattatgt aatcacaact tacttttctgc      3300
ttgtagttgc ttaaaattat gtattttgtc ttgggctgca atttgtttta tgcttatttt      3360
attattactg cagtagttga ctttgctgta tggaaaaata aagtgaaatt gccctaataa      3420
aacttctctt tcttaagt                                                    3438

```

```

<210> 54
<211> 2783
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> 3'UTR
<222> (1)..(2783)
<223> Región 3'UTR del gen MBNL2 (NM_144778.2 ) insertada en el
plásmido pEZX-MT05

```

```

<220>
<221> unión_misclánea
<222> (582)..(601)
<223> Región 1 de unión del miR-218

```

```

<220>
<221> unión_misclánea
<222> (646)..(665)
<223> Región de unión del miR-23b

```

```

<220>
<221> unión_misclánea
<222> (1368)..(1388)
<223> Región 2 de unión del miR-218

```

```

<220>
<221> unión_misclánea
<222> (2085)..(2105)
<223> Región 3 de unión del miR-218

```

```

<400> 54
tcagcagaaa cggaatggaa tgccaagaat ctgcattgag aataactaaa cattgttact      60
gtacatacta tcctgtttcc tcctcaatag aattgccaca aactgcatgc taaataaaga      120
tgtagttctt ctggacagac cacaactcta agaagctagt gctgctatct catatatgag      180
tattaaatat ggtatgctta gtatattcca acctaagata gttaactacc tgagaccagc      240
tgtgatgttt aaagacataa aggataaagt ttacttttaa agggtttcta aacatagttt      300
ctgtcctagg aatattgtct tatctccata actatagctg atgcagaaag tccagccagt      360
ttactcattt cgattcagaa tatttcaaat ttagcaataa acaattagca ttagttaaaa      420
aagaaacata ttccaagggc aggttcgatt ctagctctaa ttactgtcat gtcatttacc      480
cactggatca aagggtatgt ttcacttctt gacaatataa atgctgcagc aaagatgaga      540
ggtgaagtaa aaccgatacc tgtcctgcag gtctaaaatt tgaatggaaa ttcaagcaca      600

```

# ES 2 659 845 A1

agtactgggg acacatcaaa gtgtgggtgtt tggtttgctt ggagatgccca cgttgaatca	660
tgtgattcta gattaacatt aatagattg aaaaagaaac tttgcacggt atgagcttca	720
taccccaacca aacaaagtct tgaaggtatt attttacaag tatatTTTTa aagttgTTTT	780
ataagagaga cttttagtaa gtgcctagat tttgccagac ttcattccagc ttgacaagat	840
tgagaggccc atgccaacag tctaattctaa gagattagtc tttcaaactc accatccagt	900
tgctgtttac agaataactc ttcttaacta aaaacctagt caaacaagga agctgtaggt	960
gaggagatct gtataatatt ctaattttaag taagtttgag ttttagtcaact gcaaatttga	1020
ctgtgacttt aatctaaatt actatgtaaa caaaaagtag atagtttcac tttttaaaaa	1080
atccattact gttttgcatt tcaaaagttg gattaaaggg ttgtaactga ctacagcatg	1140
gaaaaaaata gttcttttaa ttctttcacc ttaaagcata ttttatgtct caaaagtata	1200
aaaaacttta atacaagtac atacatatta tatatacaca tacatatata tactatatat	1260
ggatgaaaca tattttaatg ttgtttactt ttttaatac ttggttgatc ttcaaggtaa	1320
tagcgataca attaaatttt gttcagaaag tttgttttaa agtttatTTT aagcactatc	1380
gtaccaaata tttcatatTT cactttttat atgttgcaca tagcctatac agtacctaca	1440
tagtttttaa attattgTTT aaaaaacaaa acagctgtta taaatgaata ttatgtgtaa	1500
ttgtttcaaa catccatttt ctttgtgaac atattagtgga ttgaagtatt ttgacttttg	1560
agattgaatg taaaatattt taaatttggg atcatcgctt gttctgaaaa ctagatgcac	1620
caaccgtatc attatttgTT tgaggaaaaa aagaaatctg cattttaatt catgttggtc	1680
aaagtccaat tactatctat ttatcttata tcgtagatct gataacccta tctaaaagaa	1740
agtcacacgc taaatgtatt cttacatagt gcttgtatcg ttgcatttgt tttaatTTgt	1800
ggaaaagtat tgtatctaac ttgtattact ttggtagttt catctttatg tattattgat	1860
atTTgtaatt ttctcaacta taacaatgta gttacgctac aacttgctta aaacattcaa	1920
acttgTTTTc ttttttctgt ttttttcttt gttaattcat ttaaactcat tgaaaacata	1980
gtatacatta ctaaaaggta aattatggga atcactgaaa tatttttgta gattaattgt	2040
tgtaacattg tctttctttt ttttcttttg tttcatgatt ttgattttta aaattattag	2100
cacacaacta ttttcagccc ttttaataatg gagcatcaaa aacatcacct gtaaccccaa	2160
gcaaatatag aagactgtat tttttactat gatatccatt ttccagaatt gtgattacaa	2220
tatgcaaaga gtcataaata tgccatttac aataaggagg aggcaaggca aatgcataga	2280
tgtacaaata tatgtacaac agattttgct ttttatTTat ttataatgta atTTtataga	2340
ataattctgg gatttgagag gatctaaaac tatttttctg tataaatatt atTTgccaaa	2400

# ES 2 659 845 A1

```

agtttgttta tattcagaag tctgactatg atgaataaat cttaaagtct ttgtttaatt      2460
aaaaaacaaa aatcaccaat atccaagaca tgaagatatc agttcaacaa atactgtagt      2520
taagagacta actctccact tgtatgggaa ctacatttca ctcttggttt tcaggatata      2580
acagcacttc accgaaatat tctttcagcc ataccactgg taacatttct actaaatctt      2640
tctgtaacac ttaaagaatt ccctcattca ttaccttaca gtgtaaacag gagtctaatt      2700
tgtatcaata ctatgttttg gttgtaatat tcagttcact cacccaatgt acaaccaatg      2760
aaataaaaga agcatttaaa agg                                             2783

```

```

<210> 55
<211> 2777
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> 3'UTR de MBNL2 con región semilla de miR-23b deletcionada (3'UTR
MUT-23b)

```

```

<220>
<221> característica_misclánea
<222> (659)..(660)
<223> Nucleótidos flanqueantes del fragmento de la región semilla del
miR-23b deletcionada

```

```

<400> 55
tcagcagaaa cggaatggaa tgccaagaat ctgcattgag aataactaaa cattggttact      60
gtacatacta tcctgtttcc tcctcaatag aattgccaca aactgcatgc taaataaaga      120
tgtagtcttt ctggacagac cacaactcta agaagctagt gctgctatct catatatgag      180
tattaaatat ggtatgctta gtatattcca acctaagata gttactacc tgagaccagc      240
tgtgatgttt aaagacataa aggataaagt ttacttttaa agggtttcta aacatagttt      300
ctgtcctagg aatattgtct tatctccata actatagctg atgcagaaaag tccagccagt      360
ttactcattt cgattcagaa tttttcaaat ttagcaataa acaattagca ttagttaaaa      420
aagaaacata ttccaagggc aggttcgatt ctagctctaa ttactgtcat gtcatttacc      480
cactggatca aagggatgtt ttcacttctt gacaatataa atgctgcagc aaagatgaga      540
ggtgaagtaa aaccgatacc tgtcctgcag gtctaaaatt tgaatggaaa ttcaagcaca      600
agtactgggg acacatcaaa gtgtgggtgtt tggtttgctt ggagatgcca cgttgaatct      660
tctagattaa cattaatag attgaaaaag aaactttgca cggtatgagc ttcatacccc      720
accaaacaaa gtcttgaagg tattatttta caagtatatt tttaaagttg ttttataaga      780
gagactttgt agaagtgcct agattttgcc agacttcatc cagcttgaca agattgagag      840

```

# ES 2 659 845 A1

gccccatgccacacagtctaactaagagattagtcctttcaactcaccatccagttgcctg	900
ttacagaataactccttcttaactaaaaaccagtcaaacaaggagctgtaggtaggag	960
atctgtataatattctaatttaagtaagttgagtttagtcactgcaaatttgactgtga	1020
ctttaatcta aattactatg taaacaaaa gtagatagtt tcacttttta aaaaatccat	1080
tactgttttg catttcaaaa gttggattaa agggttgtaa ctgactacag catggaaaa	1140
aatagttctt ttaattcttt caccttaaag catattttat gtctcaaaag tataaaaaac	1200
tttaatacaa gtacatacat attatatata cacatacata tatatactat atatggatga	1260
aacatatttt aatgttgttt acttttttaa atacttggtt gatcttcaag gtaatagcga	1320
tacaattaa ttttgttcag aaagtttggt ttaaagttta ttttaagcac tategtacca	1380
aatatttcat atttcacatt ttatatgttg cacatagcct atacagtacc tacatagttt	1440
ttaaattatt gtttaaaaa caaacagct gttataaatg aatattatgt gtaattgttt	1500
caaacatcca ttttctttgt gaacatatta gtgattgaag tattttgact tttgagattg	1560
aatgtaaaat attttaaatt tgggatcacc gcctgttctg aaaactagat gcaccaaccg	1620
tatcattatt tgtttgagga aaaaaagaaa tctgcatttt aattcatggt ggtcaaagtc	1680
gaattactat ctatttatct tatatcgtag atctgataac cctatctaaa agaaagtcac	1740
acgctaaatg tattcttaca tagtgcttgt atcgttgcat ttgttttaatt ttgtggaaaa	1800
gtattgtatc taacttgat tactttggta gtttcatctt tatgtattat tgatatttgt	1860
aattttctca actataacaa tgtagttacg ctacaacttg cctaaaacat tcaaacttgt	1920
tttctttttt ctgttttttt ctttgttaat tcattttaaac tcattgaaaa catagtatac	1980
attactaaaa ggtaaattat gggaaactcact gaaatatttt tgtagattaa ttgttgtaac	2040
attgtctttc ttttttttct tttgtttcat gattttgatt tttaaaatta ttagcacaca	2100
actattttca gccctttaat aatggagcat caaaaacatc acctgtaacc ccaagcaaat	2160
atagaagact gtatttttta ctatgatatc cattttccag aattgtgatt acaatatgca	2220
aagagtcata aatagccat ttacaataag gaggaggcaa ggcaaatgca tagatgtaca	2280
aatatatgta caacagattt tgctttttat ttatttataa tgtaatttta tagaataatt	2340
ctgggatttg agaggatcta aaactatttt tctgtataaa tattatttgc caaaagtttg	2400
tttatattca gaagtctgac tatgatgaat aaatcttaaa tgctttgttt aattaaaaaa	2460
caaaaatcac caatatccaa gacatgaaga tatcagttca acaataactg tagttaagag	2520
actaactctc cacttgatg ggaactacat ttcactcttg gttttcagga tataacagca	2580
cttcaccgaa atattctttc agccatacca ctggtaacat ttctactaaa tctttctgta	2640

# ES 2 659 845 A1

```

acacttaaag aattccctca ttcattacct tacagtgtaa acaggagtct aatttgtatc      2700
aatactatgt tttggttgta atattcagtt cactcaccca atgtacaacc aatgaaataa      2760
aagaagcatt taaaagg                                     2777

<210> 56
<211> 2783
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Inserto del plásmido pEZX-MT05 con la 3'UTR de MBNL2 modificada
para tener complementariedad perfecta con miR-23b (3'UTR PM-23b)

<220>
<221> unión_miscelánea
<222> (646)..(666)
<223> Región modificada para tener complementariedad perfecta con el
miR23b

<400> 56
tcagcagaaa cggaatggaa tgccaagaat ctgcattgag aataactaaa cattggttact      60
gtacatacta tcctgtttcc tcctcaatag aattgccaca aactgcatgc taaataaaga      120
tgtagttctt ctggacagac cacaactcta agaagctagt gctgctatct catatatgag      180
tattaaatat ggtatgctta gtatattcca acctaagata gttaactacc tgagaccagc      240
tgtgatgttt aaagacataa aggataaagt ttacttttaa agggtttcta aacatagttt      300
ctgtcctagg aatattgtct tatctccata actatagctg atgcagaaaag tccagccagt      360
ttactcattt cgattcagaa tatttcaaat ttagcaataa acaattagca ttagttaaaa      420
aagaaacata ttccaagggc aggttcgatt ctagctctaa ttactgtcat gtcatttacc      480
cactggatca aagggatgtt ttcacttctt gacaatataa atgctgcagc aaagatgaga      540
ggtgaagtaa aaccgatacc tgtcctgcag gtctaaaatt tgaatggaaa ttcaagcaca      600
agtactgggg acacatcaaa gtgtggtggt tggtttgctt ggagaggtaa tccctggcaa      660
tgtgattcta gattaacatt aatagattg aaaaagaaac tttgcacggt atgagcttca      720
taccacacca aacaaagtct tgaaggtatt attttacaag tatattttta agttggtttt      780
ataagagaga cttttagtaa gtgcctagat tttgccagac ttcattccagc ttgacaagat      840
tgagaggccc atgccaacag tctaactctaa gagattagtc tttcaaactc accatccagt      900
tgctgtttac agaataactc ttcttaacta aaaacctagt caaacaagga agctgtaggt      960
gaggagatct gtataatatt ctaatttaag taagtttgag tttagtcact gcaaatttga      1020
ctgtgacttt aatctaaatt actatgtaaa caaaaagtag atagtttcac tttttaaaaa      1080
atccattact gttttgcatt tcaaaagttg gattaaaggg ttgtaactga ctacagcatg      1140

```

# ES 2 659 845 A1

gaaaaaata gttcttttaa ttctttcacc ttaaagcata ttttatgtct caaaagtata	1200
aaaaacttta atacaagtac atacatatta tatatacaca tacatatata tactatatat	1260
ggatgaaaca tattttaatg ttgtttactt ttttaatac ttggttgatc ttcaaggtaa	1320
tagcgataca attaaatfff gttcagaaaag tttgttttaa agtttatttt aagcactatc	1380
gtaccaaata tttcatatff cacatffttat atgttgcaca tagcctatac agtacctaca	1440
tagtttttaa attattgtff aaaaaacaaa acagctgtta taaatgaata ttatgtgtaa	1500
ttgtttcaaa catccatfff ctttgtgaac atattagtga ttgaagtatt ttgacttttg	1560
agattgaatg taaaatattt taaatffggg atcatcgcct gttctgaaaa ctagatgcac	1620
caaccgtatc attatttgff tgaggaaaaa aagaaatctg cattttaatt catgttggtc	1680
aaagtccaat tactatctat ttatcttata tcgtagatct gataacccta tctaaaagaa	1740
agtcacacgc taaatgtatt cttacatagt gcttgtatcg ttgcatttgt tttaatffgt	1800
ggaaaagtat tgtatctaac ttgtattact ttggtagfff catctfftatg tattattgat	1860
atffgtaatt ttctcaacta taacaatgta gttacgctac aacttgcta aaacattcaa	1920
acttgffffc ttttttctgt ttttttctff gttaatfcac ttaaactcat tgaaaacata	1980
gtatacatta ctaaaaggta aattatggga atcactgaaa tattffttgta gattaattgt	2040
tgtaacattg tctttctfff ttttctfftg tttcatgatt ttgattffta aaattattag	2100
cacacaacta ttttcagccc tffaataatg gagcatcaaa aacatcacct gtaaccccaa	2160
gcaaatatag aagactgtat tttttactat gatatccatt ttccagaatt gtgattacaa	2220
tatgcaaaga gtcataaata tgccatffac aataaggagg aggcaaggca aatgcataga	2280
tgtacaaata tatgtacaac agatffttgct ttttattffat ttataatgta atffttataga	2340
ataattctgg gatfftgagag gatctaaaac tattffttctg tataaatatt atfftgccaaa	2400
agffttgffta tattcagaag tctgactatg atgaataaat cttaaatgct ttgtfftaatt	2460
aaaaaacaaa aatcaccaat atccaagaca tgaagatatc agffccaaca atactgtagt	2520
taagagacta actctccact tgtatgggaa ctacatffca ctcttgfftt tcaggatata	2580
acagcacttc accgaaatat tctttcagcc ataccactgg taacatffct actaaatctt	2640
tctgtaacac ttaaagaatt ccctcattca ttaccttaca gtgtaaacag gagtctaatt	2700
tgtatcaata ctatgffttg gfftgtaatat tcagfftcact cacccaatgt acaaccaatg	2760
aaataaaaga agcattffaa agg	2783

<210> 57  
 <211> 2776

# ES 2 659 845 A1

<212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Zona del inserto del plásmido pEZX-MT05 con 3'UTR de MBNL2 con  
 región semilla de miR-218 deletcionada (3'UTR MUT1-218)

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (593)..(594)  
 <223> Nucleótidos flanqueantes de la deletción en la región semilla del  
 miR-218

<400> 57  
 tcagcagaaa cggaatggaa tgccaagaat ctgcattgag aataactaaa cattgttact 60  
 gtacatacta tcttgtttcc tcttcaatag aattgccaca aactgcatgc taaataaaga 120  
 tgtagtctct ctggacagac cacaactcta agaagctagt gctgctatct catatatgag 180  
 tattaaatat ggtatgctta gtatattcca acctaagata gttactacc tgagaccagc 240  
 tgtgatgttt aaagacataa aggataaagt ttacttttaa agggtttcta aacatagttt 300  
 ctgtcctagg aatattgtct tatctccata actatagctg atgcagaaaag tccagccagt 360  
 ttactcattt cgattcagaa ttttcaaat ttagcaataa acaattagca ttagttaaaa 420  
 aagaaacata ttccaagggc aggttcgatt ctagctctaa ttactgtcat gtcatttacc 480  
 cactggatca aagggtatgt ttcacttctt gacaatataa atgctgcagc aaagatgaga 540  
 ggtgaagtaa aaccgatacc tgtcctgcag gtctaaaatt tgaatggaaa ttcagtactg 600  
 gggacacatc aaagtgtggt gtttggtttg cctggagatg ccacgttgaa tcatgtgatt 660  
 ctagattaac attaaataga ttgaaaaaga aactttgcac ggtatgagct tcatacccca 720  
 ccaaacaag tcttgaaggt attattttac aagtatattt ttaaagttgt tttataagag 780  
 agactttgta gaagtgccta gattttgcca gacttcatcc agcttgacaa gattgagagg 840  
 cccatgccaa cagtctaate taagagatta gtctttcaaa ctcaccatcc agttgcctgt 900  
 tacagaataa ctcttcttaa ctaaaaacct agtcaaaca ggaagctgta ggtgaggaga 960  
 tctgtataat attctaattt aagtaagttt gagtttagtc actgcaaatt tgactgtgac 1020  
 tttaatctaa attactatgt aaacaaaaag tagatagttt cactttttta aaaatccatt 1080  
 actgttttgc atttcaaaag ttggattaaa gggttgtaac tgactacagc atggaaaaaa 1140  
 atagttcttt taattctttc accttaaagc atattttatg tctcaaaagt ataaaaaact 1200  
 ttaatacaag tacatacata ttatatatac acatacatat atatactata tatggatgaa 1260  
 acatatttta atgttgttta ctttttttaa tacttggttg atcttcaagg taatagcgat 1320  
 acaattaaat tttgttcaga aagtttgttt taaagtttat ttttaagcact atcgtaccaa 1380

## ES 2 659 845 A1

```

atatttcata tttcacattt tatatgttgc acatagccta tacagtacct acatagtttt 1440
taaattattg tttaaaaaac aaaacagctg ttataaatga atattatgtg taattgtttc 1500
aacatccat tttctttgtg aacatattag tgattgaagt attttgactt ttgagattga 1560
atgtaaaata ttttaaattt gggatcatcg cctgttctga aaactagatg caccaaccgt 1620
atcattattt gtttgaggaa aaaaagaaat ctgcatttta attcatgttg gtcaaagtcg 1680
aattactatc tatttatctt atacgtaga tctgataacc ctatctaaaa gaaagtcaca 1740
cgctaaatgt attcttacat agtgcttgta tcgttgcatt tgttttaatt tgtggaaaag 1800
tattgtatct aacttgtatt actttggtag tttcatcttt atgtattatt gatatttgta 1860
attttctcaa ctataacaat gtagttacgc tacaacttgc ctaaaacatt caaacttggt 1920
ttcttttttc tgtttttttc tttgttaatt catttaaact cattgaaaac atagtataca 1980
ttactaaaag gtaaattatg ggaatcactg aaatatTTTT gtagattaat tgtttgtaaca 2040
ttgtctttct tttttttctt ttgtttcatg attttgattt ttaaaattat tagcacacaa 2100
ctattttcag ccctttaata atggagcatc aaaaacatca cctgtaacco caagcaaata 2160
tagaagactg tattttttac tatgatatcc attttccaga attgtgatta caatatgcaa 2220
agagtcataa atatgccatt tacaataagg aggaggcaag gcaaatgcat agatgtacaa 2280
atatatgtac aacagatttt gctttttatt tatttataat gtaattttat agaataattc 2340
tgaggattga gaggatctaa aactattttt ctgtataaat attatttgcc aaaagtttgt 2400
ttatattcag aagtctgact atgatgaata aatcttaaat gctttgttta attaaaaaac 2460
aaaaatcacc aatatccaag acatgaagat atcagttcaa caaatactgt agttaagaga 2520
ctaactctcc acttgtatgg gaactacatt tcaactctgg ttttcaggat ataacagcac 2580
ttcacgaaa tattctttca gccataccac tggtaacatt tctactaaat ctttctgtaa 2640
cacttaaaga attccctcat tcattacctt acagtgtaaa caggagtcta atttgtatca 2700
atactatggt ttggttgtaa tattcagttc actcacccaa tgtacaacca atgaaataaa 2760
agaagcattt aaaagg 2776

```

```

<210> 58
<211> 2776
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> Zona del inserto del plásmido pEZX-MT05 con 3'UTR de MBNL2 con
región semilla de miR-218 delecionada (3'UTR MUT2-218)

```

```

<220>
<221> característica_miscelánea

```

# ES 2 659 845 A1

<222> (1370)..(1371)

<223> Nucleótidos flanqueantes de la región semilla de unión de miR-218  
delecionada

<400> 58

tcagcagaaa cggaatggaa tgccaagaat ctgcattgag aataactaaa cattgttact	60
gtacatacta tcctgtttcc tcctcaatag aattgccaca aactgcatgc taaataaaga	120
tgtagtctct ctggacagac cacaactcta agaagctagt gctgctatct catatatgag	180
tattaaatat ggtatgctta gtatattcca acctaagata gttaactacc tgagaccagc	240
tgtgatgttt aaagacataa aggataaagt ttacttttaa agggtttcta aacatagttt	300
ctgtcctagg aatattgtct tatctccata actatagctg atgcagaaaag tccagccagt	360
ttactcattt cgattcagaa ttttcaaat ttagcaataa acaattagca ttagttaaaa	420
aagaaacata ttccaagggc aggttcgatt ctagctctaa ttactgtcat gtcatttacc	480
cactggatca aagggtatgt ttcacttctt gacaatataa atgctgcagc aaagatgaga	540
ggtgaagtaa aaccgatacc tgcctgcag gtctaaaatt tgaatggaaa ttcaagcaca	600
agtactgggg acacatcaaa gtgtggtgtt tggtttgctt ggagatgcca cgttgaatca	660
tgtgattcta gattaacatt aaatagattg aaaaagaaac tttgcacggt atgagcttca	720
tacccacca aacaaagtct tgaaggtatt attttacaag tatattttta aagttgtttt	780
ataagagaga cttttagaa gtgcctagat tttgccagac ttcattccagc ttgacaagat	840
tgagaggccc atgccaacag tctaactctaa gagattagtc tttcaaactc accatccagt	900
tgctgttac agaataactc ttcttaacta aaaacctagt caaacaagga agctgtaggt	960
gaggagatct gtataatatt ctaatttaag taagtttgag tttagtact gcaaatttga	1020
ctgtgacttt aatctaaatt actatgtaa caaaaagtag atagtttcac tttttaaaaa	1080
atccattact gttttgcatt tcaaaagttg gattaaaggg ttgtaactga ctacagcatg	1140
gaaaaaata gttcttttaa ttctttcacc ttaaagcata ttttatgtct caaaagtata	1200
aaaaacttta atacaagtac atacatatta tatatacaca tacatatata tactatatat	1260
ggatgaaaca tattttaatg ttgtttactt ttttaatac ttggttgatc ttcaaggtaa	1320
tagcgataca attaaatfff gttcagaaag tttgttttaa agtttatttt atcgtaccaa	1380
atatttcata tttcacattt tatatgttgc acatagccta tacagtacct acatagtttt	1440
taaattattg tttaaaaaac aaaacagctg ttataaatga atattatgtg taattgtttc	1500
aaacatccat tttctttgtg aacatattag tgattgaagt attttgactt ttgagattga	1560
atgtaaaata ttttaaatff gggatcatcg cctgttctga aaactagatg caccaaccgt	1620
atcattattt gtttgaggaa aaaaagaaat ctgcatttta attcatgttg gtcaaagtcg	1680

ES 2 659 845 A1

aattactatc tatttatctt atacgtaga tctgataacc ctatctaaaa gaaagtcaca 1740  
 cgctaaatgt attccttcat agtgcttgta tcgttgcatt tgttttaatt tgtggaaaag 1800  
 tattgtatct aacttgtatt actttggtag tttcatcttt atgtattatt gatatttgta 1860  
 attttctcaa ctataacaat gtagttacgc tacaacttgc ctaaaacatt caaacttgtt 1920  
 ttcttttttc tgtttttttc tttgttaatt catttaaact cattgaaaac atagtataca 1980  
 ttactaaaag gtaaattatg ggaatcactg aaatatTTTT gtagattaat tgttgtaaca 2040  
 ttgtctttct tttttttctt ttgtttcatg attttgattt ttaaaattat tagcacacaa 2100  
 ctattttcag ccctttaata atggagcatc aaaaacatca cctgtaacct caagcaaata 2160  
 tagaagactg tattttttac tatgatatcc attttccaga attgtgatta caatatgcaa 2220  
 agagtcataa atatgccatt tacaataagg aggaggcaag gcaaatgcat agatgtacaa 2280  
 atatatgtac aacagatttt gctttttatt tatttataat gtaattttat agaataattc 2340  
 tgggatttga gaggatctaa aactatTTTT ctgtataaat attatttgcc aaaagtttgt 2400  
 ttatattcag aagtctgact atgatgaata aatcttaaat gctttgttta attaaaaaac 2460  
 aaaaatcacc aatatccaag acatgaagat atcagttcaa caaatactgt agttaagaga 2520  
 ctaactctcc acttgtatgg gaactacatt tcaactctgg ttttcaggat ataacagcac 2580  
 ttcaccgaaa tattctttca gccataccac tggtaacatt tctactaaat ctttctgtaa 2640  
 cacttaaaga attccctcat tcattacctt acagtgtaaa caggagtcta atttgtatca 2700  
 atactatggt ttggttgtaa tattcagttc actcacccaa tgtacaacca atgaaataaa 2760  
 agaagcattt aaaagg 2776

<210> 59  
 <211> 2777  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Zona del inserto del plásmido pEZX-MT05 con 3'UTR de MBNL2 con  
 región semilla de miR-218 deletcionada (3'UTR MUT3-218)

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (2088)..(2089)  
 <223> Nucleótidos flanqueantes de la zona de la región semilla del  
 mir-218 deletcionada

<400> 59  
 tcagcagaaa cggaatggaa tgccaagaat ctgcattgag aataactaaa cattgttact 60  
 gtacatacta tcctgtttcc tcctcaatag aattgccaca aactgcatgc taaataaaga 120

## ES 2 659 845 A1

tgtagttctt ctggacagac cacaactcta agaagctagt gctgctatct catatatgag	180
tattaaatat ggtatgctta gtatattcca acctaagata gttaactacc tgagaccagc	240
tgtgatgttt aaagacataa aggataaagt ttacttttaa agggtttcta aacatagttt	300
ctgtcctagg aatattgtct tatctccata actatagctg atgcagaaaag tccagccagt	360
ttactcattt cgattcagaa tatttcaaat ttagcaataa acaattagca ttagttaaaa	420
aagaaacata ttccaagggc aggttcgatt ctagctctaa ttactgtcat gtcatttacc	480
cactggatca aagggtatgt ttcacttctt gacaatataa atgctgcagc aaagatgaga	540
ggtgaagtaa aaccgatacc tgtcctgcag gtctaaaatt tgaatggaaa ttcaagcaca	600
agtactgggg acacatcaaa gtgtgggtgtt tggtttgctt ggagatgcc a gtttgaatca	660
tgtgattcta gattaacatt aatagattg aaaaagaaac tttgcacggt atgagcttca	720
taccccacca aacaaagtct tgaaggtatt attttacaag tatattttta aagttgtttt	780
ataagagaga cttttagtaa gtgcctagat tttgccagac ttcattccagc ttgacaagat	840
tgagaggccc atgccaacag tctaactctaa gagattagtc tttcaaactc accatccagt	900
tgcttgttac agaataactc ttcttaacta aaaacctagt caaacaagga agctgtaggt	960
gaggagatct gtataatatt ctaatttaag taagtttgag tttagtcaact gcaaatttga	1020
ctgtgacttt aatctaaatt actatgtaaa caaaaagtag atagtttcac tttttaaaaa	1080
atccattact gttttgcatt tcaaaagttg gattaaaggg ttgtaactga ctacagcatg	1140
gaaaaaata gttcttttaa ttctttcacc ttaaagcata ttttatgtct caaaagtata	1200
aaaaacttta atacaagtac atacatatta tatatacaca tacatatata tactatatat	1260
ggatgaaaca tattttaatg ttgtttactt ttttaaacac ttggttgatc ttcaaggtaa	1320
tagcgataca attaaatfff gttcagaaaag tttgttttaa agtttatfff aagcactatc	1380
gtaccaaata tttcatatff cacatfffat atgttgcaca tagcctatac agtacctaca	1440
tagtttttaa attattgfff aaaaaacaaa acagctgtta taaatgaata ttatgtgtaa	1500
ttgtttcaaa catccatfff ctttgtgaac atattagtga ttgaagtatt ttgacttttg	1560
agattgaatg taaaatatff taaatffggg atcatcgcct gttctgaaaa ctagatgcac	1620
caaccgtatc attatffgff tgaggaaaaa aagaaatctg cattttaatt catgttggtc	1680
aaagtcgaat tactatctat ttatcttata tcgtagatct gataacccta tctaaaagaa	1740
agtcacagc taaatgtatt cttacatagt gcttgtatcg ttgcatttgt tttaatffgt	1800
ggaaaagtat tgtatctaac ttgtattact ttggtagfff catctffatg tattattgat	1860
atfftgaaft ttctcaacta taacaatgta gttacgctac aactfgccta aaacattcaa	1920

# ES 2 659 845 A1

```

acttgttttc ttttttctgt ttttttcttt gttaattcat ttaaactcat tgaaaacata      1980
gtatacatta ctaaaaggta aattatggga atcactgaaa tatttttgta gattaattgt      2040
tgtaacattg tctttctttt ttttcttttg tttcatgatt ttgattttta aaattattca      2100
actattttca gccctttaat aatggagcat caaaaacatc acctgtaacc ccaagcaaat      2160
atagaagact gtatttttta ctatgatatc cttttccag aattgtgatt acaatatgca      2220
aagagtcata aatatgcat ttacaataag gaggaggcaa ggcaaatgca tagatgtaca      2280
aatatatgta caacagattt tgctttttat ttatttataa tgtaatttta tagaataatt      2340
ctgggatttg agaggatcta aaactatttt tctgtataaa tattatttgc caaaagtttg      2400
tttatattca gaagtctgac tatgatgaat aaatcttaaa tgctttgttt aattaaaaaa      2460
caaaaatcac caatatcaa gacatgaaga ttcagttca acaaatactg tagttaagag      2520
actaactctc cacttgatg ggaactacat ttcactcttg gttttcagga tataacagca      2580
cttcaccgaa atattctttc agccatacca ctggtaacat ttctactaaa tctttctgta      2640
acacttaaag aattcctca ttcattacct tacagtgtaa acaggagtct aatttgtatc      2700
aatactatgt tttggttgta atattcagtt cactcaccca atgtacaacc aatgaaataa      2760
aagaagcatt taaaagg                                     2777

```

```

<210> 60
<211> 2784
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> Inserto del plásmido pEZX-MT05 con la 3'UTR de MBNL2 modificada
para tener complementariedad perfecta con miR-23b (3'UTR PM-2218)

```

```

<220>
<221> unión_miscelánea
<222> (582)..(602)
<223> Región modificada para complementariedad perfecta con miR-218

```

```

<220>
<221> unión_miscelánea
<222> (1359)..(1379)
<223> Región modificada para complementariedad perfecta con miR-218

```

```

<220>
<221> unión_miscelánea
<222> (2086)..(2106)
<223> Región modificada para complementariedad perfecta con miR-218

```

```

<400> 60
tcagcagaaa cggaatggaa tgccaagaat ctgcattgag aataactaaa cattgttact      60
gtacatacta tcctgtttcc tcctcaatag aattgccaca aactgcatgc taaataaaga      120

```

# ES 2 659 845 A1

tgtagttctt	ctggacagac	cacaactcta	agaagctagt	gctgctatct	catatatgag	180
tattaaatat	ggtatgctta	gtatattcca	acctaagata	gttaactacc	tgagaccagc	240
tgtgatgttt	aaagacataa	aggataaagt	ttacttttaa	agggtttcta	aacatagttt	300
ctgtcctagg	aatattgtct	tatctccata	actatagctg	atgcagaaaag	tccagccagt	360
ttactcattt	cgattcagaa	tatttcaaat	ttagcaataa	acaattagca	ttagttaaaa	420
aagaaacata	ttccaagggc	aggttcgatt	ctagctctaa	ttactgtcat	gtcatttacc	480
cactggatca	aagggtatgt	ttcacttctt	gacaatataa	atgctgcagc	aaagatgaga	540
ggtgaagtaa	aaccgatacc	tgtcctgcag	gtctaaaatt	tacatgggta	gatcaagcac	600
aagtactggg	gacacatcaa	agtgtggtgt	ttggtttgcc	tggagatgcc	acgttgaatc	660
atgtgattct	agattaacat	taaatagatt	gaaaaagaaa	ctttgcacgg	tatgagcttc	720
ataccacc	aaacaaagtc	ttgaaggat	tattttacaa	gtatattttt	aaagttgttt	780
tataagagag	actttgtaga	agtgcctaga	ttttgccaga	cttcatccag	cttgacaaga	840
ttgagaggcc	catgccaaca	gtctaactta	agagattagt	ctttcaaact	caccatccag	900
ttgcctgtta	cagaataact	cttcttaact	aaaaacctag	tcaaacaagg	aagctgtagg	960
tgaggagatc	tgtataatat	tctaatttaa	gtaagtttga	gttttagtcac	tgcaaatttg	1020
actgtgactt	taatctaaat	tactatgtaa	acaaaaagta	gatagtttca	ctttttaaaa	1080
aatccattac	tgttttgcat	ttcaaaaagt	ggattaaagg	gttgtaactg	actacagcat	1140
ggaaaaaat	agttctttta	attctttcac	cttaaagcat	attttatgtc	tcaaaaagtat	1200
aaaaaacttt	aatacaagta	catacatatt	atatatacac	atacatatat	atactatata	1260
tggatgaaac	atattttaat	gttgtttact	tttttaaata	cttggttgat	cttcaaggta	1320
atagcgatac	aattaaattt	tgttcagaaa	gtttgtttac	atggttagat	caagcacaat	1380
cgtaccaa	atctcatatt	tcacatttta	tatgttgcac	atagcctata	cagtacctac	1440
atagttttta	aattattggt	taaaaaaca	aacagctggt	ataaatgaat	attatgtgta	1500
attgtttcaa	acatccattt	tctttgtgaa	catattagtg	attgaagtat	tttgactttt	1560
gagattgaat	gtaaaatatt	ttaaatttgg	gatcatcgcc	tgttctgaaa	actagatgca	1620
ccaaccgat	cattatttgt	ttgaggaaaa	aaagaaatct	gcattttaat	tcatgttggg	1680
caaagtcgaa	ttactatcta	tttatcttat	atcgtagatc	tgataaccct	atctaaaaga	1740
aagtcacacg	ctaaatgtat	tcttacatag	tgcttgatc	gttgcatttg	ttttaatttg	1800
tggaaaagta	ttgtatctaa	cttgtattac	tttggtagtt	tcatctttat	gtattattga	1860
tatttgtaat	tttctcaact	ataacaatgt	agttacgcta	caacttgcoct	aaaacattca	1920

# ES 2 659 845 A1

```

aacttgtttt cttttttctg tttttttctt tgtaattca tttaaactca ttgaaaacat      1980
agtatacatt actaaaagggt aaattatggg aatcactgaa atatTTTTgt agattaattg      2040
ttgtaacatt gtctttcttt tttttctttt gtttcatgat tttgaacatg gttagatcaa      2100
gcacaaaact attttcagcc ctttaataat ggagcatcaa aaacatcacc tgtaacccca      2160
agcaaatata gaagactgta ttttttacta tgatatccat tttccagaat tgtgattaca      2220
atatgcaaag agtcataaat atgccattta caataaggag gaggcaaggc aaatgcatag      2280
atgtacaaat atatgtacaa cagattttgc tttttattta tttataatgt aatTTTtatag      2340
aataattctg ggatttgaga ggatctaaaa ctatTTTTct gtataaatat tatttgccaa      2400
aagtttgttt atattcagaa gtctgactat gatgaataaa tcttaaagtc tttgTTtaat      2460
taaaaaaaa aaatcaccaa tatccaagac atgaagatat cagttcaaca aatactgtag      2520
ttaagagact aactctccac ttgtatggga actacatttc actcttgggt ttcaggatat      2580
aacagcactt caccgaaata ttctttcagc cataccactg gtaacatttc tactaaatct      2640
ttctgtaaca cttaaagaat tcctcattc attaccttac agtgtaaaca ggagtctaat      2700
ttgtatcaat actatgTTTT ggttgtaata ttcagttcac tcacccaatg tacaaccaat      2760
gaaataaaaag aagcatttaa aagg                                             2784

```

```

<210> 61
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> Sonda para la detección de foci en torax de moscas (sonda CAG)

```

```

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (1)..(1)
<223> Fluoróforo Cy3 unido en 5'

```

```

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (20)..(20)
<223> Fluoróforo Cy3 unido en 3'

```

```

<400> 61
cagcagcagc agcagcagca                                                    20

```

```

<210> 62
<211> 496
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> Secuencia del fragmento de la construcción esponja con 20 dianas

```

repetidas para el dme-miR-92a

```

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (1)..(21)
<223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (22)..(25)
<223> Fragmento espaciador

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (26)..(46)
<223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (47)..(50)
<223> Fragmento espaciador

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (51)..(71)
<223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (72)..(75)
<223> Fragmento espaciador

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (76)..(96)
<223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (97)..(100)
<223> Fragmento espaciador

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (101)..(121)
<223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (122)..(125)
<223> Fragmento espaciador

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (126)..(146)
<223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (147)..(150)

```

<223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (151)..(171)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (172)..(175)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (176)..(196)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (197)..(200)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (201)..(221)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (222)..(225)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (226)..(246)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (247)..(250)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (251)..(271)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (272)..(275)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (276)..(296)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (297)..(300)

<223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (301)..(321)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (322)..(325)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (326)..(346)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (347)..(350)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (351)..(371)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (372)..(375)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (376)..(396)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (397)..(400)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (401)..(421)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (422)..(425)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (426)..(446)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (447)..(450)

## ES 2 659 845 A1

<223> Fragmento espaciador

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (451)..(471)

<223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (472)..(475)

<223> Fragmento espaciador

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (476)..(496)

<223> Diana del microRNA dme-miR-92a

<400> 62

ataggccggg gttgtgcaat ggcgcatagg ccggggttgt gcaatgggcc ataggccggg	60
gttgtgcaat gggctatagg ccggggttgt gcaatggggg ataggccggg gttgtgcaat	120
gggatatagg ccggggttgt gcaatgggtc ataggccggg gttgtgcaat gggatagagg	180
ccggggttgt gcaatgggtt ataggccggg gttgtgcaat ggaccatagg ccggggttgt	240
gcaatgggtg ataggccggg gttgtgcaat ggcgcatagg ccggggttgt gcaatgggcc	300
ataggccggg gttgtgcaat gggctatagg ccggggttgt gcaatggggg ataggccggg	360
gttgtgcaat gggatagagg ccggggttgt gcaatgggtc ataggccggg gttgtgcaat	420
gggatagagg ccggggttgt gcaatgggtt ataggccggg gttgtgcaat ggaccatagg	480
ccggggttgt gcaatg	496

<210> 63

<211> 496

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del fragmento de la construcción esponja con 20 dianas repetidas para el dme-miR-100

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (1)..(21)

<223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (22)..(25)

<223> Fragmento espaciador

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (26)..(46)

<223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (47)..(50)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (51)..(71)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (72)..(75)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (76)..(96)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (97)..(100)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (101)..(121)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (122)..(125)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (126)..(146)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (147)..(150)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (151)..(171)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (172)..(175)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (176)..(196)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (197)..(200)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (201)..(221)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (222)..(225)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (226)..(246)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (247)..(250)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (251)..(271)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (272)..(275)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (276)..(296)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (297)..(300)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (301)..(321)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (322)..(325)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (326)..(346)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (347)..(350)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (351)..(371)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (372)..(375)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (376)..(396)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (397)..(400)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (401)..(421)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (422)..(425)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (426)..(446)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (447)..(450)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (451)..(471)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-100

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (472)..(475)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (476)..(496)  
 <223> Diana del microRNA dme-miR-100

# ES 2 659 845 A1

<400> 63  
cacaagttcg taatacgggt tccgccacaa gttcgtaata cgggttcg cacaagttcg 60  
taatacgggt tcctccacaa gttcgtaata cgggttcctg cacaagttcg taatacgggt 120  
tcggacacaa gttcgtaata cgggttcgac cacaagttcg taatacgggt tcgtacacaa 180  
gttcgtaata cgggttctgc cacaagttcg taatacgggt tctggcacia gttcgtaata 240  
cgggttcgac cacaagttcg taatacgggt tccgccacaa gttcgtaata cgggttcg 300  
cacaagttcg taatacgggt tcctccacaa gttcgtaata cgggttcctg cacaagttcg 360  
taatacgggt tcggacacaa gttcgtaata cgggttcgac cacaagttcg taatacgggt 420  
tcgtacacaa gttcgtaata cgggttctgc cacaagttcg taatacgggt tctggcacia 480  
gttcgtaata cgggtt 496

<210> 64  
<211> 516  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia del fragmento de la construcción esponja con 20 dianas repetidas para el dme-miR-124

<220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(22)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (23)..(26)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (27)..(48)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (49)..(52)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (53)..(74)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (75)..(78)  
<223> Fragmento espaciador

## ES 2 659 845 A1

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (79)..(100)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (101)..(104)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (105)..(126)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (127)..(130)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (131)..(152)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (153)..(156)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (157)..(178)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (179)..(182)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (183)..(204)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (205)..(208)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (209)..(230)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (231)..(234)  
<223> Fragmento espaciador

# ES 2 659 845 A1

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (235)..(256)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (257)..(260)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (261)..(282)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (283)..(286)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (287)..(308)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (309)..(312)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (313)..(334)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (335)..(338)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (339)..(360)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (361)..(364)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (365)..(386)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (387)..(390)  
<223> Fragmento espaciador

# ES 2 659 845 A1

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (391)..(412)  
 <223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (413)..(416)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (417)..(438)  
 <223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (439)..(442)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (443)..(464)  
 <223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (465)..(468)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (469)..(490)  
 <223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (491)..(494)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (495)..(516)  
 <223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-124

<400> 64  
 cttggcattc agcggcgcct taccctcttg gcattcagcg gtgccttacc gccttggcat 60  
 tcagcggcgc cttaccggct tggcattcag cggcgcctta ccgacttggc attcagcggc 120  
 gccttaccgt cttggcattc agcggcgcct tacgcgccttg gcattcagcg gtgccttacg 180  
 ctcttggcat tcagcggcgc cttaccggact tggcattcag cggcgcctta cggccttggc 240  
 attcagcggc gccttaccga cttggcattc agcggcgcct taccctcttg gcattcagcg 300  
 gtgccttacc gccttggcat tcagcggcgc cttaccggct tggcattcag cggcgcctta 360  
 ccgacttggc attcagcggc gccttaccgt cttggcattc agcggcgcct tacgcgccttg 420

# ES 2 659 845 A1

gcattcagcg gtgccttacg ctcttggcat tcagcgggtgc cttacggact tggcattcag 480

cggtgcctta cggtcttggc attcagcggg gcctta 516

<210> 65

<211> 516

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del fragmento de la construcción esponja con 20 dianas repetidas para el dme-miR-277

<220>

<221> característica\_miscelánea

<222> (1)..(22)

<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

<220>

<221> característica\_miscelánea

<222> (23)..(26)

<223> Fragmento espaciador

<220>

<221> característica\_miscelánea

<222> (27)..(48)

<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

<220>

<221> característica\_miscelánea

<222> (49)..(52)

<223> Fragmento espaciador

<220>

<221> característica\_miscelánea

<222> (53)..(74)

<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

<220>

<221> característica\_miscelánea

<222> (75)..(78)

<223> Fragmento espaciador

<220>

<221> característica\_miscelánea

<222> (79)..(100)

<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

<220>

<221> característica\_miscelánea

<222> (101)..(104)

<223> Fragmento espaciador

<220>

<221> característica\_miscelánea

<222> (105)..(126)

<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

## ES 2 659 845 A1

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (127)..(130)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (131)..(152)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (153)..(156)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (157)..(178)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (179)..(182)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (183)..(204)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (205)..(208)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (209)..(230)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (231)..(234)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (235)..(256)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (257)..(260)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (261)..(282)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (283)..(286)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (287)..(308)  
 <223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (309)..(312)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (313)..(334)  
 <223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (335)..(338)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (339)..(360)  
 <223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (361)..(364)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (365)..(386)  
 <223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (387)..(390)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (391)..(412)  
 <223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (413)..(416)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (417)..(438)  
 <223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

## ES 2 659 845 A1

```

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (439)..(442)
<223> Fragmento espaciador

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (443)..(464)
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (465)..(468)
<223> Fragmento espaciador

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (469)..(490)
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (491)..(494)
<223> Fragmento espaciador

<220>
<221> característica_miscelánea
<222> (495)..(516)
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-277

<400> 65
tgctgtacca gatctgcatt tagccctgtc gtaccagatc tgcatttagc ggtgtcgtac      60
cagatctgca tttagcaatg tcgtaccaga tctgcattta gacctgtcgt accagatctg      120
catttagacg tgctgtacca gatctgcatt tagatctgtc gtaccagatc tgcatttaga      180
tgtgtcgtac cagatctgca tttagtctgt tcgtaccaga tctgcattta gtaatgtcgt      240
accagatctg catttagatg tgctgtacca gatctgcatt tagccctgtc gtaccagatc      300
tgcatttagc ggtgtcgtac cagatctgca tttagcaatg tcgtaccaga tctgcattta      360
gacctgtcgt accagatctg catttagacg tgctgtacca gatctgcatt tagatctgtc      420
gtaccagatc tgcatttaga tgtgtcgtac cagatctgca tttagtctgt tcgtaccaga      480
tctgcattta gtaatgtcgt accagatctg cattta                                  516

<210> 66
<211> 516
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del fragmento de la construcción esponja con 20 dianas
repetidas para el dme-miR-304

<220>

```

## ES 2 659 845 A1

<221> característica\_misclánea  
<222> (1)..(22)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (23)..(26)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (27)..(48)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (49)..(52)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (53)..(74)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (75)..(78)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (79)..(100)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (101)..(104)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (105)..(126)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (127)..(130)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (131)..(152)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (153)..(156)  
<223> Fragmento espaciador

<220>

## ES 2 659 845 A1

<221> característica\_misclánea  
<222> (157)..(178)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (179)..(182)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (183)..(204)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (205)..(208)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (209)..(230)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (231)..(234)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (235)..(256)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (257)..(260)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (261)..(282)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (283)..(286)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (287)..(308)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (309)..(312)  
<223> Fragmento espaciador

<220>

## ES 2 659 845 A1

<221> característica\_misclánea  
<222> (313)..(334)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (335)..(338)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (339)..(360)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (361)..(364)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (365)..(386)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (387)..(390)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (391)..(412)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (413)..(416)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (417)..(438)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (439)..(442)  
<223> Fragmento espaciador

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (443)..(464)  
<223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
<221> característica\_misclánea  
<222> (465)..(468)  
<223> Fragmento espaciador

<220>

## ES 2 659 845 A1

<221> característica\_miscelánea  
 <222> (469)..(490)  
 <223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (491)..(494)  
 <223> Fragmento espaciador

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (495)..(516)  
 <223> Secuencia diana del microRNA dme-miR-304

<400>	66		60
		ctcacattta cttatgagat tagcgactca catttactta tgagattagc agctcacatt	
		tacttatgag attagctact cacatttact tatgagatta ggcgctcaca tttacttatg	120
		agattaggca ctcacattta cttatgagat taggggctca catttactta tgagattagg	180
		agctcacatt tacttatgag attaaccgct cacatttact tatgagatta acggctcaca	240
		tttacttatg agattaggag ctcacattta cttatgagat tagcgactca catttactta	300
		tgagattagc agctcacatt tacttatgag attagctact cacatttact tatgagatta	360
		ggcgctcaca tttacttatg agattaggca ctcacattta cttatgagat taggggctca	420
		catttactta tgagattagg agctcacatt tacttatgag attaaccgct cacatttact	480
		tatgagatta acggctcaca tttacttatg agatta	516



- ②① N.º solicitud: 201631216  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.09.2016  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/113** (2010.01)  
**C07H21/02** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	TEPLYUK, Nadiya M., et al. "Therapeutic potential of targeting microRNA-10b in established intracranial glioblastoma: first steps toward the clinic." EMBO molecular medicine, 2016, p. 268-287. Publicación online: 10.02.2016. Páginas 278-279 y 282.	1-4, 7, 12-13
A	ALEXANDER M. S. et al. "Skeletal muscle micro RNAs: Their diagnostic and therapeutic potential in human muscle diseases." Journal of Neuromuscular Diseases (2015) Vol. 2, pages 1-11. Páginas 5-7.	1-23
A	GOODWIN, Marianne, et al. MBNL sequestration by toxic RNAs and RNA misprocessing in the myotonic dystrophy brain. Cell reports, 2015, vol. 12, no 7, p. 1159-1168. Todo el documento.	1-23
A	WO 2005/079397 A2 (ROCKEFELLER UNIVERSITY) 01.09.2005, Todo el documento.	1-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
06.02.2017

Examinador  
M. J. García Bueno

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C07H

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, USPTO PATENT DATABASE, JPO PATENT DATABASE, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR, EBI.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.02.2017

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 5-6, 8-11, 14-23	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-4, 7, 12-13	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 5-6, 8-11, 14-23	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-4, 7, 12-13	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	TEPLYUK, Nadiya M., et al. Therapeutic potential of targeting microRNA-10b in established intracranial glioblastoma: first steps toward the clinic. EMBO molecular medicine, 2016, p. 268-287. Publicación online: 10.02.2016.	10.02.2016

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de invención consiste en una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica antagonista de un microRNA que regula la expresión a la baja del gen humano MBNL1 y/o NBML2, una composición que comprende dicha molécula, y su uso para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia miotónica tipo 1.

El documento D01 divulga una molécula anti-microRNA antagonista de un microRNA que regula a la baja la expresión del gen humano MBNL2 que se expresa en el cerebro (ver páginas 278-279, 282).

**1.- NOVEDAD (Art.6 LP) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8 LP).****1.1.- Reivindicaciones 1-4, 7 y 12-13.**

Las características de las reivindicaciones 1-4, 7 y 12-13 ya son conocidas del documento D01. Por lo tanto esas reivindicaciones no son nuevas según el artículo 6 LP, ni implican actividad inventiva en el sentido del artículo 8 LP.

**1.2.- Reivindicaciones 5-6, 8-11, 14-23.**

Ninguno de los documentos citados en el Informe del Estado de la Técnica, o cualquier combinación relevante de ellos revela que la molécula antagonista sea un antagonista del microRNA-218-5p o microRNA-23b-3p, ni tenga el porcentaje de identidad con las secuencias SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2 reivindicadas.

Por lo tanto, las reivindicaciones 5-6, 8-11 y 14-23 son nuevas e implican actividad inventiva en el sentido de los artículos 6 y 8 LP.

**2.- PATENTABILIDAD (Art. 4.1 LP).**

Las reivindicaciones 5-6, 8-11 y 14-23 cumplen con el requisito de patentabilidad según el artículo 4.1 LP.  
Las reivindicaciones 1-4, 7 y 12-13 no cumplen con el requisito de patentabilidad según el artículo 4.1. LP.