

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 092**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

**A61K 31/711** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 31/404** (2006.01)

**A61K 31/47** (2006.01)

**A61K 31/7105** (2006.01)

**A61K 31/443** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2014 PCT/EP2014/069522**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2015 WO15036552**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2014 E 14766458 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3044316**

54 Título: **Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de fibrosis quística**

30 Prioridad:

**12.09.2013 EP 13306250**

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

**10.06.2019**

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET  
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (50.0%)**

**101, rue de Tolbiac**

**75013 Paris, FR y**

**UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TAULAN-CADARS, MAGALI**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 716 092 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de fibrosis quística

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método y a composiciones para el tratamiento de la fibrosis quística.

## 5 Antecedentes de la invención

La fibrosis quística (CF, del inglés "Cystic Fibrosis") es el trastorno monogénico letal más común en caucásicos, con una incidencia de un nacimiento por cada 2500-4000 y con 70.000 personas afectadas en todo el mundo, causando la muerte en la mayoría de ellas en la veintena. La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva ligada a mutaciones en el gen regulador de la conductancia de transmembrana de fibrosis quística (*CFTR*), gen cuya naturaleza determina la expresión clínica y la gravedad de la enfermedad, afectando principalmente a los sistemas respiratorio, digestivo y genital. El *CFTR*, un canal de ion cloruro, está implicado en los cambios de líquido superficial que recubre las células epiteliales de las vías respiratorias. La deshidratación del líquido superficial conduce a una eliminación mucociliar alterada y a inflamación e infecciones de los epitelios mucosos. Las mutaciones *CFTR* que reducen la función de la proteína *CFTR* causan la acumulación de moco espeso y pegajoso en los bronquios de los pulmones, la pérdida de la función pancreática exocrina, alteración de la secreción intestinal, y aumento de la concentración de cloruro en el sudor (Boucher RC Trends Mol Med., 2007). En pacientes con CF, la pérdida de la función de canal Cl(-) *CFTR* conduce a un daño pulmonar progresivo y finalmente a la muerte. La enfermedad pulmonar crónica es la principal causa de mortalidad y morbilidad en pacientes de CF.

Los pacientes con CF requieren numerosas terapias para manejar dichos síntomas (Farrell PM et al. J Pediatr, 2008), que incluyen agentes mucolíticos y antibióticos y fisioterapia de pecho para tratar la enfermedad de vías respiratorias y enzimas digestivas para reemplazar la pérdida de la función pancreática exocrina. Éstas y otras intervenciones han aumentado drásticamente la esperanza de vida, pero aún se necesita mejorar para reducir la alta carga del tratamiento e incrementar la supervivencia (Sawicki GS et al. J Cyst Fibros, 2009). Se ha desarrollado un potenciador de *CFTR* (Ivacaftor) por parte de Vertex Pharmaceuticals (Ramsey BW et al. N Engl J Med, 2011) y ha sido aprobado recientemente para el tratamiento de pacientes de CF que portan la mutación p.Gly551Asp (2-5% de todos los pacientes). Hasta la fecha, el fármaco ha fallado para pacientes de CF con p.Phe508del, las mutaciones más habituales. Previamente se han reportado varios correctores de *CFTR* como activos *in vitro* (Hutt DM et al. Nature Chem Biol, 2010; Verkman AS y Galletta LJ Nat Rev Drug Discov, 2009) pero aún no se ha producido avance de terapias para CF a partir de estos esfuerzos. Se sigue investigando en un corrector que corrija el tráfico de la proteína p.Phe508del en ensayos clínicos (Van Goor F et al. PNAS, 2011).

Por consiguiente, existe una necesidad de desarrollar nuevos fármacos que serán adecuados para prevenir o tratar la CF y las enfermedades relacionadas con *CFTR*. De esta manera, se ha sugerido que la caracterización de nuevos compuestos terapéuticos en CF y enfermedades relacionadas con *CFTR* puede ser altamente deseable.

Desde la clonación del gen *CFTR* en 1989 se han descrito cerca de 2000 mutaciones del gen. La mutación p.Phe508del (eliminación de la fenilalanina de la posición 508 de la proteína) es la más frecuente (el 70% de los alelos mutados en pacientes con CF). Esta mutación grave altera la maduración de la proteína *CFTR* y la proteína no puede alcanzar la membrana celular. Otras mutaciones agrupadas en función de su efecto sobre la proteína *CFTR* incluyen aquellas que dan como resultado una proteína acortada, una conductancia de cloruro reducida, una estabilidad de *CFTR* defectuosa en la superficie celular o una reducción del número de transcritos de *CFTR* debido a una división incorrecta (Rowe SM et al. N Engl J Med, 2005).

La división alternativa es un proceso regulado durante la expresión génica que da como resultado un único gen que codifica múltiples proteínas, constituyendo una regulación post-transcripcional importante de la expresión génica eucariótica. En este proceso, los exones particulares de un gen pueden incluirse, o excluirse, del ARNm procesado final. Variaciones anormales en la división también están implicadas en la enfermedad; una gran proporción de trastornos genéticos humanos son resultado de variantes de división. Diferentes mutaciones de *CFTR* en sitios de división o sitios reguladores de división de acción cis o que dan como resultado la creación de un nuevo sitio dador o aceptor alternativo anormal pueden conducir a una división incorrecta de transcritos de *CFTR* anormales múltiples y de proteínas *CFTR* no funcionales.

Además de los mecanismos de división alternativos, los microARNs (miARN) pueden actuar en sincronía con factores de transcripción para controlar la expresión génica (Martinez NJ et al. Bioessays, 2009; Shalgy R et al. Aging, 2009), revelando una importante nueva complejidad en la regulación post-traducciona de la expresión génica eucariótica. Recientemente, se ha descubierto que *CFTR* está regulado post-transcripcionalmente por miARNs, tal como miR-145 y miR-494 (Gillen AE et al. Biochem J, 2011; Megiorni F et al. Plos One, 2011; Ramachandran S et al. PNAS, 2012). Varios miARNs que incluyen miR-145 son expresados en células epiteliales de vías respiratorias humanas primarias, donde la expresión de *CFTR* está reprimida (Gillen AE et al. Biochem J, 2011) o están desreguladas en pacientes de CF (Oglesby IK et al. J Immunol, 2013; Ramachandran S et al. AJRCMB, 2013).

La Solicitud de Patente Internacional nº WO 2012/049665 describe ácidos nucleicos diseñados para prevenir la unión de microARN endógeno o exógeno y usos del mismo. Friedman et al., 1999 (Journal of Biological Chemistry, vol. 274, nº 51, 17 de diciembre de 1999, 36193-36199) describe 2'-O-metil fosforotioato oligonucleótido para corrección de la división de CFTR aberrante. La Solicitud de Patente Internacional nº WO 2008/074328 describe oligonucleótidos de bloqueo de sitio diana de miARN y sus efectos.

### Sumario de la invención

La invención se define mediante las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a oligonucleótidos bloqueadores de la unión a miARN que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, composiciones farmacéuticas que comprenden dichos oligonucleótidos y su uso en métodos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con CFTR y fibrosis quística.

### Descripción detallada de la invención

En la presente descripción y en el objetivo de identificar nuevos elementos represivos para diseñar nuevas herramientas para la corrección de la fibrosis quística (CF), los inventores investigaron el papel de la regulación post-transcripcional de la expresión del gen *CFTR* en la CF. A través de la identificación de un entramado molecular que implica factores de transcripción específicos del desarrollo del pulmón y miARNs que controlan la expresión del gen *CFTR*, los inventores establecieron la importancia de las estructuras inhibitoras para la unión de reguladores que incluyen miR-101, miR-145. Mediante clasificación global, los inventores también evidenciaron que miR-145 es uno de los microARNs más desregulados en pulmón de adulto frente a pulmón fetal. La identificación de represores *cis* y *trans* permitió a los inventores concebir nuevas herramientas terapéuticas para la enfermedad pulmonar que incluye la fibrosis quística (CF), y evaluadas en epitelios reconstituidos a partir de células nasales de pacientes de CF p.Phe508del y en células epiteliales bronquiales. Tras definir las estructuras reguladoras en el gen *CFTR* para la unión de los miARNs de interés, los inventores diseñaron a continuación bloqueador de sitio-diana (TSB) (oligonucleótidos bloqueadores de unión a miARN (MBBO)) para prevenir la unión de varios miARNs que incluyen miR-101, miR-600, miR-145 y miR-384 al 3'UTR del gen *CFTR*.

Los inventores también han investigado varias mutaciones que crean nuevos sitios dadores o aceptores alternativos anormales y a continuación inducen una división alternativa que da como resultado transcritos de CFTR anormales y proteínas CFTR no funcionales. Los inventores diseñaron entonces bloqueador de sitio-diana (TSB) dirigido a sitios de división para prevenir la unión de proteínas espliceosomas a los sitios dadores y aceptores alternativos de los transcritos de CFTR.

Por lo tanto, usando dichos oligonucleótidos TSB específicos, los inventores demuestran la corrección de la actividad de canal de CFTR a través de un incremento de los niveles de transcritos y proteínas *CFTR* o de la restauración de los transcritos *CFTR* de longitud completa.

### Oligonucleótidos:

La presente descripción se refiere a oligonucleótidos aislados, sintéticos o recombinantes, que reconocen o están dirigidos a ARNm de CFTR.

El término "oligonucleótido" se refiere a oligonucleótidos aislados, sintéticos o recombinantes que reconocen o están dirigidos a ARNm de CFTR. El término "oligonucleótido" también se refiere a oligonucleótido antisentido (ASO) o a oligonucleótido bloqueador (BO) o bloqueador de sitio-diana (TSB) que reconoce o está dirigido a estructuras reguladoras del ARNm de CFTR. El término "oligonucleótidos" también se refiere a oligonucleótidos bloqueadores de unión a miARN (MBBO) que reconocen o están dirigidos a estructuras reguladoras del ARNm de CFTR para prevenir la unión de varios miARNs que incluyen miR-101, miR-600, miR-145 y miR-384 al 3'UTR del ARNm de CFTR. El término "oligonucleótido" también se refiere a oligonucleótidos bloqueadores de división (SBO) que reconocen o están dirigidos a sitios de división para prevenir la unión de proteínas espliceosomas a los sitios dadores o aceptores alternativos del ARNm de *CFTR* y la división de un exón críptico insertado en el ARNm de *CFTR* mutante.

El término "CFTR" se refiere a regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística, un canal iónico de clase transportador de casete de unión a ATP (ABC) en el transporte de iones cloruro y tiocianato a través de membranas celulares epiteliales. El término "CFTR" también se refiere a un canal de ion cloruro implicado en los cambios de líquido superficial que recubre las células epiteliales de las vías respiratorias.

La presente descripción también se refiere a un oligonucleótido aislado, sintético o recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 96%, o al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99%, de identidad de secuencia de ácido nucleico con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

La identidad de secuencia de ácido nucleico se determina preferiblemente usando un algoritmo de alineamiento de secuencia adecuado y parámetros por defecto, tal como BLAST N (Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(6): 2264-2268 (1990)).

5 El oligonucleótido según la invención comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, en donde dicho oligonucleótido es un oligonucleótido bloqueador de unión a miARN.

En una realización particular, el oligonucleótido según la invención tiene una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

10 La descripción también se refiere a oligonucleótidos que comprenden o que tienen una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

15 El oligonucleótido de la invención puede ser de cualquier tipo adecuado. El especialista en la técnica puede proporcionar fácilmente algunas modificaciones que mejorarán la eficacia clínica del oligonucleótido (C. Frank Bennett y Eric E. Swayze, "RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform", Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2010.50: 259-293). Típicamente, las modificaciones químicas incluyen modificaciones de cadena principal, modificaciones de heterociclo, modificaciones de azúcar y estrategias de conjugaciones. Por ejemplo, el oligonucleótido se puede seleccionar del grupo que consiste en oligodesoxirribonucleótidos, oligorribonucleótidos, LNA, oligonucleótido, morfolinos, oligonucleótidos triciclo-ADN-antisentido (ASOs), ASOs mediados por U7 o U1 o productos conjugados de los mismos tal como ASOs acoplados con nanopartículas o conjugados a péptidos. De hecho, para uso *in vivo*, el oligonucleótido puede ser estabilizado. Un oligonucleótido "estabilizado" se refiere a un oligonucleótido que es relativamente resistente a degradación *in vivo* (p.ej., por una exo- o endo-nucleasa). La estabilización puede ser función de la longitud o de la estructura secundaria. En particular, la estabilización de oligonucleótido se puede lograr a través de modificaciones de la cadena principal de fosfato.

25 En una realización particular, el oligonucleótido según la invención es un oligonucleótido LNA. Tal como se usa en la presente memoria, el término "LNA" ("Locked Nucleic Acid") (u "oligonucleótido LNA") se refiere a un oligonucleótido que contiene uno o más análogos de nucleosido bicíclicos, tricíclicos o policíclicos, también denominados nucleótidos LNA y nucleótidos análogos LNA. Los oligonucleótidos LNA, nucleótidos LNA y nucleótidos análogos LNA se describen de forma general en la Solicitud de Publicación Internacional N° WO 99/14226 y solicitudes posteriores; las Publicaciones Internacionales n° WO 00/56746, WO 00/56748, WO 00/66604, WO 01/25248, WO 02/28875, WO 02/094250, WO 03/006475; las Patentes de EE.UU. n° 6.043.060, 6268490, 6770748, 6639051, y las Publicaciones de EE.UU. n° 2002/0125241, 2003/0105309, 2003/0125241, 2002/0147332, 2004/0244840 y 2005/0203042. Los oligonucleótidos LNA y oligonucleótidos análogos LNA se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo, en Prologo LLC, 6200 Lookout Road, Boulder, CO 80301 EE.UU.

35 Otras modificaciones estabilizantes posibles incluyen modificaciones de fosfodiéster, combinaciones de modificaciones de fosfodiéster y fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato, p-etoxi, y combinaciones de las mismas. Las versiones modificadas químicamente estabilizadas del oligonucleótido también incluyen "Morfolinos" (oligómeros de fosforodiamidato morfolino, PMOs), oligómeros 2'-O-Met, triciclo (tc)-ADNs, ARNs nucleares cortos (sn) U7, o moléculas triciclo-ADN-oligoantisentido (Publicaciones de EE.UU. n° US2012/149756 para: "Tricyclo-DNA Antisense Oligonucleotides, Compositions and Methods for the Treatment of Disease").

40 Otras formas de oligonucleótidos de la presente invención son las secuencias de oligonucleótido acopladas a moléculas de ARN nucleares pequeñas tales como U1 o U7 en combinación con un método de transferencia vírico basado, aunque sin limitación, en lentivirus o virus adeno-asociado (Denti, MA, et al, 2008; Goyenvalle, A, et al, 2004).

45 El oligonucleótido de la invención puede sintetizarse desde cero usando cualquiera de una serie de procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el método de b-cianoetil fosforamidita (Beaucage et al., 1981); el método de nucleosido H-fosfonato (Garegg et al., 1986; Froehler et al., 1986, Garegg et al., 1986, Gaffney et al., 1988). Estos procedimientos químicos pueden llevarse a cabo mediante una variedad de sintetizadores de ácido nucleico automatizados disponibles en el mercado. Dichos ácidos nucleicos pueden referirse como ácidos nucleicos sintéticos. Alternativamente, el oligonucleótido se puede producir a gran escala en plásmidos (véase Sambrook, et al., 1989). El oligonucleótido se puede preparar a partir de secuencias de ácido nucleico existentes usando técnicas conocidas, tal como aquellas que emplean enzimas de restricción, exonucleasas o endonucleasas. El oligonucleótido preparado de esta manera se puede referir como ácido nucleico aislado.

55 En una realización particular, el oligonucleótido de la presente invención está conjugado a una segunda molécula. Típicamente, dicha segunda molécula se selecciona del grupo que consiste en aptámeros, anticuerpos o polipéptidos. Por ejemplo, el oligonucleótido de la presente invención se puede conjugar a un péptido de penetración celular. Los péptidos de penetración celular de la presente invención son bien conocidos en la técnica e incluyen por ejemplo el péptido TAT (Bechara C, Sagan S. "Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand?" FEBS Lett. 2013 Jun 19; 587(12): 1693-702). En una realización particular, la segunda molécula es capaz de dirigirse a la célula epitelial. En una realización particular, la molécula está dirigida al transportador CFTR. Varios anticuerpos, péptidos y

aptámeros que se unen con elevada afinidad a la célula epitelial son descritos en Raksha J et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2010; Van Meegen MA et al. Plos One. 2011).

**Métodos terapéuticos y usos:**

- 5 El oligonucleótido de la invención puede usarse en un método para prevenir o tratar enfermedades en un sujeto que lo necesite.
- Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere al oligonucleótido de la invención para uso como medicamento.
- En una realización, el oligonucleótido según la invención puede usarse en la prevención o el tratamiento de enfermedad relacionada con CFTR en un sujeto que lo necesite.
- 10 La presente invención también se refiere al oligonucleótido según la invención para uso en la prevención o el tratamiento de fibrosis quística en un sujeto que lo necesite.
- Tal como se usa en la presente memoria, el término “sujeto” denota un mamífero. En una realización de la invención, un sujeto según la invención se refiere a cualquier sujeto (preferiblemente humano) afligido o en riesgo de estar afligido con enfermedades relacionadas con CFTR. En una realización preferida de la invención, un sujeto según la invención se refiere a cualquier sujeto (preferiblemente humano) afligido o en riesgo de estar afligido con fibrosis quística.
- 15 El método descrito en la presente memoria puede llevarse a cabo para cualquiera tipo de enfermedad relacionada con CFTR, tal como enfermedades pulmonares, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), cáncer de pulmón, agenesia congénita de conducto deferente (CAVD), pancreatitis crónica idiopática (ICP), bronquiectasia. En el contexto de la invención, se puede diagnosticar en un sujeto la enfermedad relacionada con CFTR y determinarse en una muestra biológica con técnicas bien conocidas por el especialista en la técnica. Dichos métodos incluyen, sin limitación, métodos de amplificación tales como PCR cuantitativa, secuenciamiento de gen CFTR, y ensayos indicadores de división.
- 20 El método descrito en la presente memoria también pueden llevarse a cabo para cualquier tipo de fibrosis quística, tal como se revisa en la “World Health Organisation Classification of cystic fibrosis”, y seleccionarse del grupo E84: mucoviscidosis, fibrosis quística con manifestaciones pulmonares, fibrosis quística con manifestaciones intestinales y fibrosis quística con otras manifestaciones.
- 25 En una realización particular, los oligonucleótidos de la invención pueden administrarse *in vivo* solos o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un “vector” es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del oligonucleótido de la invención a las células. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a las células con una degradación reducida en comparación con la extensión de la degradación que resultaría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, aunque sin limitación, plásmidos desnudos, sistemas de administración no víricos (agentes de transfección catiónicos, liposomas, etc.), fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes víricas o bacterianas que hayan sido manipulados mediante la inserción o incorporación de las secuencias de oligonucleótidos. Los vectores víricos son un tipo preferido de vector e incluyen, aunque sin limitación, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: virus de ARN tales como un retrovirus (como por ejemplo el virus de leucemia murina moloney y vectores derivados lentivíricos), virus de sarcoma murino harvey, virus de tumor mamario murino, virus de sarcoma rous; adenovirus, virus adeno-asociado; virus de tipo SV40; virus de polio; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus vaccinia; virus de la polio. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no nombrados pero conocidos en la técnica. En una realización preferida, la secuencia de oligonucleótidos está bajo el control de una región reguladora heteróloga, p.ej., un promotor heterólogo. El promotor también puede ser, p.ej., un promotor vírico, tal como un promotor de CMV o cualesquier promotores sintéticos.
- 30 En una realización particular, se pueden usar dos o más oligonucleótidos al mismo tiempo; esto puede ser particularmente interesante cuando los oligonucleótidos están vectorizados dentro de una casete de expresión (como por ejemplo las casetes U7 o U1).
- 35 La presente invención también se refiere al oligonucleótido según la invención en combinación con uno o más agentes anti-enfermedad relacionada con CFTR para uso en la prevención o el tratamiento de la enfermedad relacionada con CFTR en un sujeto que lo necesite.
- 40 La presente invención también se refiere al oligonucleótido según la invención en combinación con uno o más agentes anti-fibrosis quística para uso en la prevención o el tratamiento de la fibrosis quística en un sujeto que lo necesite.
- 45 En una realización, el agente anti-fibrosis quística o agente anti-enfermedad relacionada con CFTR puede incluir un corrector o potenciador de CFTR (tal como ivacaftor (VX-770, Kalydeco), VX-661, VX-809), agentes osmóticos (tal como Bronquitol), fármacos antioxidantes, modificadores de mucus (tal como Pulmozyme, Mucomyst), broncodilatadores (tal como Ventolín, Serevent), compuestos anti-infectivos (tal como TOBI, Azitromicina, Josacina) u otros fármacos anti-inflamatorios (tal como Ibuprofeno, Dexametasona, Zylflo, Accolate).
- 50

**Composiciones farmacéuticas y kits**

El oligonucleótido de la invención puede usarse o prepararse en una composición farmacéutica.

En una realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido de la invención y un vehículo farmacéutico aceptable para uso en la prevención o el tratamiento de la enfermedad relacionada con CFTR en un sujeto que lo necesite.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido de la invención y un vehículo farmacéutico aceptable para uso en la prevención o el tratamiento de fibrosis quística en un sujeto que lo necesite.

Típicamente, el compuesto de la invención puede combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente con matrices de liberación sostenida, tal como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

“Farmacéuticamente” o “farmacéuticamente aceptable” se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica o indebida cuando se administran a un mamífero, especialmente un humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un relleno, diluyente, material encapsulante o aditivo de formulación de cualquier tipo, sólido, semi-sólido o líquido, no tóxico.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, por inhalación, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal del oligonucleótido, solo o en combinación con otro principio activo, se puede administrar en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales o seres humanos. Las formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas de ruta oral tal como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o disoluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, formas de administración por inhalación, aerosoles, implantes, formas de administración subcutáneas, transdérmicas, tópicas, intraperitoneales, intramusculares, intravenosas, subdérmicas, transdérmicas, intratecales y nasales o intranasales, y formas de administración rectales.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser administrada mediante administración nasal o por inhalación. La administración nasal puede ser en forma de disolución, suspensión o emulsión líquida. Las disoluciones y suspensiones se administran como gotas. Las disoluciones también se pueden administrar como una niebla fina desde un bote de spray nasal o desde un inhalador nasal. La inhalación se puede conseguir en la forma de disoluciones, suspensiones y polvos; dichas formulaciones se administran a través de un aerosol, gotas pequeñas o un inhalador de polvo seco. Los polvos se pueden administrar con insufladores o inhaladores.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable tal como salino, fosfato sódico, etc. Las composiciones generalmente adoptarán la forma de un líquido, aunque éste no es necesariamente siempre el caso. Los vehículos, excipientes y diluyentes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma acacia, fosfatos de calcio, alginato, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, jarabe de agua, metil celulosa, metil y propilhidroxibenzoatos, aceite mineral, etc. Las formulaciones también pueden incluir agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, conservantes, agentes tamponantes, etc. Los especialistas en la técnica reconocerán también que a menudo se administran ácidos nucleicos en conjunción con lípidos (p.ej., lípidos catiónicos o lípidos neutros, o mezclas de los mismos), frecuentemente en la forma de liposomas u otro material micro- o nano-estructurado adecuado (p.ej., micelas, lipocomplejos, dendrímeros, emulsiones, fases cúbicas, etc.).

El especialista en la técnica reconocerá que la cantidad de un oligonucleótido a administrar será una cantidad que es suficiente para inducir una mejora de síntomas de enfermedad no deseados. Dicha cantidad puede variar, entre otros, dependiendo de factores tales como el género, la edad, el peso, la condición física general, del sujeto, etc. y puede ser determinada caso a caso. La cantidad también puede variar según el tipo de afección que esté siendo tratada, y de los otros componentes de un protocolo de tratamiento (p.ej., administración de otros medicamentos, tal como esteroides, etc.). Si se elige una administración de oligonucleótidos basada en virus, las dosis adecuadas dependerán de diferentes factores, tales como la cepa vírica que se emplee, la ruta de administración (intramuscular, intravenosa, intra-arterial, oral, inhalación u otra). Los especialistas en la técnica reconocerán que tales parámetros son tratados normalmente durante los ensayos clínicos. Adicionalmente, el tratamiento del sujeto habitualmente no es un único evento. Más bien, los oligonucleótidos de la invención probablemente serán administrados en ocasiones múltiples, que pueden ser, dependiendo de los resultados obtenidos, con varios días de separación, varias semanas de separación, o varios meses de separación, o incluso con varios años de separación.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir cualquier agente adicional que se use en la prevención o el tratamiento de la fibrosis quística o de una enfermedad relacionada con CFTR. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden co-administrarse con corrector o potenciador de CFTR (tal como ivacaftor VX-770, VX-661, VX-809, Kalydeco), agentes osmóticos (tales como Bronquitol), fármacos antioxidantes, modificadores de mucus (tales como Pulmozyme, Mucomyst), broncodilatadores (tales como Ventolín, Serevent),

compuestos anti-infectivos (tales como TOBI, Azitromicina, Josacina) u otros agentes anti-inflamatorios (tales como Ibuprofeno, Dexametasona, Zfylo, Acolato).

La invención también proporciona kits que comprenden al menos un oligonucleótido de la invención. Los kits que contienen oligonucleótido de la invención presentan utilidad en métodos terapéuticos.

#### 5 **Secuencias de oligonucleótido**

SEQ ID NO: 1 correspondiente a MBBO-1:

AGT GAT ATT TTC TTA CAG TAA T

SEQ ID NO: 2 correspondiente a MBBO-2:

ATA AAC CGC TGA AGT TTC CAG TTA TC

10 SEQ ID NO: 3 correspondiente a MBBO-3:

ACA TTA TTA AAA TAA ATA TTT CCT AGA G

SEQ ID NO: 4 correspondiente a TSB1:

GTT GGT ACT TCT GTA ATA

SEQ ID NO: 5 correspondiente a TSB2:

15 ACC TTA CTT ATA TCT CAA

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, dichos ejemplos y figuras no deberían interpretarse en modo alguno como limitativas del alcance de la presente invención.

#### **FIGURAS:**

**Figura 1:** Impacto de oligonucleótidos bloqueadores de unión a miARN sobre la expresión en células pulmonares.

20 (A) Impacto de diferentes MBBOs en la regulación post-transcripcional del gen *CFTR*. Se transfectaron MBBOs (100 nM) en células pulmonares A549 y Beas-2B. Los datos de actividad de luciferasa están normalizados a Control A Negativo de Inhibidor microARN miRCURY LNA™ (control oligo). (B) Impacto de MBBO-1 sobre el nivel de transcrito de *CFTR* endógeno en células pulmonares A549 y Beas-2B. El nivel de ARNm de *CFTR* se determinó mediante RT-qPCR seguido de transfección de MBBO-1 o el uso del control oligo. Los datos están normalizados al nivel de transcrito de  $\beta$ -actina. (C) Impacto de MBBO-1 sobre el nivel de transcrito de *CFTR* endógeno en controles (n=8), o (D) en epitelio ALI cultivado a partir de pacientes de CF homocigotos p.Phe508del (n=6). El nivel de ARNm de *CFTR* se determinó mediante RT-qPCR 24 h después de 1, 3 o 5 tratamientos con MBBO-1 o el uso del control oligo. Los datos están normalizados al nivel de transcrito de  $\beta$ -actina. (E) Impacto de MBBO-1, MBBO-2 y MBBO-3 sobre el nivel de transcrito de *CFTR* endógeno en pacientes de CF. Se determinó el diagrama de caja (*box plot*) del nivel de transcrito de *CFTR* en pacientes de CF homocigotos p.Phe508del (24 h después del primer tratamiento con MBBO-1, MBBO-2, MBBO-3 o control oligo). Los datos están normalizados al nivel de transcrito de  $\beta$ -actina. (F) Impacto de MBBO-1, MBBO-2 y MBBO-3 en el nivel de proteína CFTR endógeno en pacientes de CF. Se llevaron a cabo inmunotinciones con anticuerpo CFTR (clon MM13-4) sobre extracto de proteína total de pacientes de CF homocigotos p.Phe508del (24 h después del primer tratamiento con MBBO-1, MBBO-2, MBBO-3 o control oligo). Los datos están normalizados al nivel de proteína Lamina A/C. En epitelio de vías respiratorias reconstituido se añadió directamente 100 nM de MBBOs en el lado apical en medio libre (sin reactivo de transfección) durante 2 horas a 37°C. Actividad de CFTR (G) en células 16HBEo- (NCF) y CFBE (CF) y (H) en células CFBE no tratadas (NT) o células CFBE tratadas con MBBO. Registros de fluorescencia celular representativos procedentes de células bronquiales que expresan de forma transitoria el YFP sensible a haluro (la barra de escala indica el porcentaje de fluorescencia celular total). La adición extracelular de I<sup>-</sup> (flecha) produjo una detención de YFP con una tasa proporcional a la tasa de influjo de I<sup>-</sup> y de actividad CFTR. La apertura de canal se detecta a través de una reducción de la fluorescencia de la sonda. La cantidad de detención es directamente proporcional al eflujo de Cl<sup>-</sup>. El gráfico representa el sumario de datos obtenidos del ensayo funcional que indica las tasas de transporte de I<sup>-</sup>.

Los valores son extremadamente significativos a  $*P < 0,0001$ .

45 **Figura 2:** Corrección de división aberrante en células bronquiales mediante TSB1.

A y C. Se llevó a cabo un análisis de RT-PCR de ARN total de células bronquiales BEAS-2B usando cebadores específicos para analizar la división después de co-transfección de minigenes naturales (IVS12 wt) o mutantes (c.1680-883A>G, c.1680-886A>G) y TSBs (WT, transcrito natural y CEI, inclusión de exón críptico). A. Efecto de la concentración de TSB sobre la división aberrante. Las células fueron transfectadas con diferentes concentraciones de TSB1 (25, 50, 100, 1000 nM) durante 24 horas. C. Efecto del tiempo de incubación (24 h, 48 h y 72 h) sobre la

corrección de la división usando TSB1 50 nM. La especificidad de TSB1 fue confirmada usando un TSB de control (CTL) a las diferentes concentraciones evaluadas y en combinación con los minigenes naturales y mutantes; para evitar sobrecargar la figura, solo se mostraron los ensayos a 50 nM o a 24 h. B y D. Cuantificación de transcritos CEI y WT después de transfección de TSBs a diferentes concentraciones (B) o a diferentes tiempos desde la transfección (D). Se llevó a cabo una RT-PCR usando un cebador directo marcado con amidita de fluoresceína (FAM) localizado dentro del exón dador de división y un cebador inverso dentro del exón aceptor de división del plásmido pSPL3. La cuantificación, en porcentaje, se llevó a cabo dividiendo el área del pico CEI por el área de todos los picos (natural + CEI). Los datos corresponden al valor medio de al menos dos experimentos independientes. E. El análisis RT-PCR de ARN total se llevó a cabo usando cebadores específicos para analizar ambos transcritos (WT, natural, y CEI, inclusión de exón críptico). F. Se transfectó TSB1 24h a 100 nM en combinación con WT o minigenes mutantes en células nasales obtenidas de un individuo de control, se cultivó una semana en BEGM (Lonza, Walkersville, MD, EE.UU.) y se colocó en placas de 24 pocillos. El análisis de RT-PCR de ARN total se llevó a cabo a partir de células nasales usando cebadores específicos para analizar ambos transcritos (WT, natural, y CEI, inclusión de exón críptico).

**Figura 3:** Corrección de división aberrante en células bronquiales mediante TSB2

Cuantificación de transcritos CEI y WT después de la co-transfección de TSB2 a diferentes concentraciones y los minigenes c.1680-883A>G o c.1680-886A>G. Se llevó a cabo una RT-PCR usando cebador director marcado con amidita de fluoresceína (FAM) localizado dentro del exón dador de división y un cebador inverso dentro del exón aceptor de división del plásmido pSPL3. La cuantificación, en porcentaje, se llevó a cabo dividiendo el área del pico CEI por el área de todos los picos (natural + CEI). Los datos corresponden al valor medio de al menos dos experimentos independientes. La especificidad de TSB2 se confirmó usando un TSB de control (CTL) a las diferentes concentraciones evaluadas y en combinación con ambos minigenes, WT y mutante; para evitar sobrecargar la figura solo se muestra el ensayo a 50 nM.

**EJEMPLOS:**

**Ejemplo 1:**

**Material y métodos**

Vectores indicadores de gen y mutagénesis dirigida

El 3'UTR del gen *CFTR* (1,7 kb desde el codón de terminación hasta la señal de poli-adenilación) fue subclonado en el vector pGL3-Control (Promega) por debajo del gen de *Luciferasa* (pGL3C-CFTR-3UTR). La degeneración de las estructuras *cis* se llevó a cabo mediante mutagénesis directa usando el kit de mutagénesis sito-dirigida QuickChange®II (Stratagene). Todas las construcciones fueron verificadas usando secuenciación directa.

Precusores de microARN y oligonucleótidos bloqueadores de sitio diana (TSB)

Los precusores de miARN Pre-miR™ y el control negativo de precursor de miARN pre-miR™ fueron adquiridos en Ambion (Life Technologies). Los oligonucleótidos potenciados con LNA™ usados como bloqueadores de unión de miARN (MBBO) se denominan TSB, que reconocen el 3'UTR de *CFTR* solapado con el sitio diana miR-101 (MBBO-1), miR-145 (MBBO-2) y miR-384 (MBBO-3) fueron diseñados (EXIQON). Como control se usó el control negativo A de inhibidor de microARN miRCURY LNA™ (EXIQON).

Cultivo celular

Las células epiteliales pulmonares humanas (A549 y Beas-2B) fueron cultivadas como se ha descrito previamente (Gras D et al. J Allergy Clin Immunol 2012). Las células epiteliales bronquiales fetales humanas (HBEpiC, ScienCell, Clinisciences), aisladas de un feto de aproximadamente 22 semanas de embarazo, fueron cultivadas primariamente en matraces de cultivo celular recubiertos de colágeno I en medio de célula epitelial bronquial (BEpiCM, ScienCell, Clinisciences). Todas las células fueron cultivadas a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Se llevaron a cabo algunos estudios con líneas celulares epiteliales bronquiales humanas, las células 16HBE14o que expresan CFBE41o (p.PHE508del/p.PHE508del) y CFTR natural proporcionadas por el Dr. D.C. Gruenert (San Francisco, CA, EE.UU.). Ambos tipos de células fueron mantenidos en MEM con sales de Earle y l-glutamina como se ha descrito previamente (Saint-Criq V et al. Eur J Pharmacol 2012), Cell Signal, 2012).

Se obtuvieron células nasales de individuos sanos o con CF homocigotos p.Phe508del (según el acuerdo N°ID-RCB 2011-A01520-41 del Comité Francés de Ética en Investigación) mediante raspado de epitelio turbinado inferior con una cureta ASI Rhino-Pro® (Arlington Scientific). Se usó medio de cultivo epitelial bronquial (BEGM, LONZA) suplementado con antibióticos (Life Technologies) para promover la proliferación inicial de células epiteliales en los matraces recubiertos de colágeno I. Después de tres semanas de crecimiento monocapa a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>, las células fueron llevadas a placa con una concentración de 300.000 células por soporte de 12 mm recubierto de colágeno Transwell-Clear®, con un tamaño de poro de 0,4 µm, (Corning, Inc.). Se usó medio ALI (interfaz aire-líquido) para soportar el crecimiento y la diferenciación epitelial. El medio ALI superior (50:50 BEGM y DMEM 1 g/L de glucosa) suplementado con aditivos específicos (LONZA) más penicilina, estreptomina y anfotericina

B (1X) (Life Technologies) fue eliminado tras alcanzar confluencia y el medio ALI inferior se cambió cada 2-3 días. Los experimentos fueron llevados a cabo cuando los epitelios estaban bien diferenciados (al menos 28 días).

#### Transfecciones transitorias

5 Para los ensayos de luciferasa, células fueron sembradas con una densidad de 10.000 (Beas-2B), 13.000 (A549) y 20.000 (HBEpiC) células/100  $\mu$ L de medio en placas de 96 pocillos y fueron trasfectadas con 72 ng del vector indicador indicado, y 8 ng de pRL-SV40 de control interno que contenía Luciferasa de Renilla (Promega) para normalizar respecto a la eficacia de transformación, usando el reactivo de transfección Fugene®6 (Roche Applied Sciences). Los experimentos de co-transfección con miARN o TSBs (MMBOs) fueron llevados a cabo usando el reactivo de transfección Interferin® (Polyplus, Ozyme). Además del vector indicador y el pRL-SV40, se co-transfectaron 20 nM de precursores de microARN o 100 nM de TSBs (MMBOs).

10 Para los estudios de ARN y proteína, las células fueron sembradas con una densidad de 250.000 (Beas-2B), 300.000 (A549), 500.000 (HBEpiC) células/2 mL de medio en placas de 6 pocillos. Las células también fueron transfectadas con la misma cantidad de precursores de miARN o TSBs (MMBOs) definida anteriormente.

#### Extracción de ARN, transcripción inversa y PCR cuantitativa (qPCR)

15 Los ARNs totales fueron extraídos, transcritos inversamente y amplificados como se ha reportado previamente (Viert V et al. Eur J Hum Genet 2012), con modificaciones menores. La transcripción inversa se llevó a cabo con cebadores aleatorios o CFTR y cebadores específicos de  $\beta$ -actina. La PCR cuantitativa se llevó a cabo con ADNc diluido 1:10 y amplificado con LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science). Los niveles de expresión relativa fueron calculados usando el método comparativo DDCT con la expresión de un gen doméstico ( *$\beta$ -actina*) como control endógeno. Los miARNs fueron purificados con el Mini Kit miRNeasy y el kit RNeasy MinElute Cleanup (Qiagen). La transcripción inversa se llevó a cabo sobre 40 ng de miARN con el kit de síntesis de ADNc miRCURY LNA™ Universal (EXIQON) y la qPCR se llevó a cabo con ADNc diluido 1:10 y el conjunto de cebadores de microRNA LNA™, específico de cada miARN (EXIQON). Se calcularon los niveles de expresión relativa usando el método comparativo DDCT con ARN nucleolar pequeño SNORD44 y SNORD48 como controles endógenos. Para validar los resultados de micro sistema clave (evaluación de miARN y ARN), se llevó a cabo una RT-qPCR como se ha explicado anteriormente.

#### Ensayo indicador

Las células fueron recolectadas 48 h después de la transfección, y se midió la actividad de Luciferasa de Luciérnaga y de Luciferasa de Renilla usando el Sistema de Ensayo de Luciferasa Dual-Glo® (Promega).

#### Ensayo de transferencia Western (Western Blot)

30 Las proteínas enteras fueron extraídas directamente usando tampón Laemmli 1X. Las proteínas fueron separadas en geles de SDS-PAGE al 7% o al 10% y transferidas a membrana de PVDF (Westran® Clear Signal Whatman®, Dutscher SAS). Las proteínas fueron detectadas usando anti-CFTR diluido 1:400 (clon MM13-4, Millipore) en leche desnatada al 5%. Los niveles de proteína de Lamina A/C (1:10.000, Sigma Aldrich) fueron evaluados para control interno de carga de proteína. Después de 1 h de incubación con los anticuerpos secundarios anti-ratón, las proteínas fueron reveladas mediante quimioluminiscencia.

#### Actividad de CFTR

40 La actividad de proteína CFTR se determinó mediante detención con I<sup>-</sup> de YFP sensible a haluro como se ha descrito previamente (Saint-Criq V et al. Eur J Pharmacol 2012) usando la tecnología de sensor de Haluro Premo (Invitrogen, Villebon sur Yvette, Francia). Cuarenta horas después del tratamiento de MBBO, se estimuló la conductancia de CFTR mediante una mezcla agonista (forskolina, 3-isobutil-1metilxantina, apigenina). Después de 10 minutos, las placas de 96 pocillos fueron transferidas a un lector de placas para ensayo de fluorescencia. Cada pocillo fue ensayado individualmente para determinar el flujo de I<sup>-</sup> mediado por CFTR registrando la fluorescencia de forma continua (400 ms/punto) durante 2 s (línea base), después 50  $\mu$ L de una disolución de I<sup>-</sup> 140 mM.

#### Análisis estadístico

45 Para los ensayos de luciferasa y RT-qPCR, se llevaron a cabo experimentos al menos tres veces con muestras analizadas al menos por triplicado y se realizaron comparaciones por pares usando el test de t de Student con InStat (GraphPad Software, versión 3.0, carpeta InStat 3). Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  SE y fueron considerados estadísticamente significativos a  $p < 0,0001$ . Para determinar el impacto de MBBO, se realizaron análisis estadísticos usando estadística de Wilcoxon con software R que genera gráficos de caja con significancias.

#### 50 Resultados

Una estructura compleja de elementos que actúan en *cis* y *trans* en el 3'UTR está implicada en la regulación de la expresión temporal del gen *CFTR*

Para evaluar el efecto del 3'UTR sobre la regulación post-transcripcional del gen *CFTR*, los inventores transfectaron líneas celulares adultas y HBEPiC fetal primario con un vector indicador, con o sin 3'UTR de *CFTR*. Los resultados demuestran que el 3'UTR del gen *CFTR* indujo una fuerte represión de la actividad de Luciferasa, en todos los tipos celulares, lo que indica que esta región contienen elementos *cis*-represores. Usando la herramienta bioinformática AREsite (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/AREsite.cgi>), los inventores identificaron cuatro elementos putativos ricos en AU (ARE) en el 3'UTR del gen *CFTR*: ARE-4816, ARE-5533, ARE-5698 y ARE-6074. Estos sitios son adicionales a los descritos previamente (Baudouin-Legros M et al. AJPCP, 2005), que los inventores renombraron ARE-4585, ARE-4760 y ARE-4891 según su posición de nucleótido. Los inventores evaluaron a continuación la degeneración de dichas estructuras usando ensayos indicadores. Solo una estructura, ARE-4760, parecía estar implicada en la estabilización de ARNm, ya que su degeneración se asoció a una reducción de la actividad de Luciferasa. Aunque ARE-4585, ARE-5533, ARE-5698 y ARE-6074 parecían estar implicados en la desestabilización en A549 y Beas-2B, no tuvieron efecto en HBEPiC. El efecto más fuerte se obtuvo usando ARE-5698, identificado *in silico* como la estructura ARE más conservada del 3'UTR de *CFTR*. Otros elementos que actúan en *cis* podrían explicar la actividad represiva del 3'UTR de *CFTR* en líneas celulares adultas. Las predicciones computacionales que usan TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), Pictar (<http://pictar.mdc-berlin.de>), miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) y miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>) detectan trece estructuras de unión de miARN putativas en el 3'UTR de *CFTR*. De los ocho miARNs estudiados previamente, el miR-145 ha sido implicado en la regulación de la expresión de *CFTR* en líneas celulares de colon y páncreas (Gillen AE et al. Biochem J, 2011).

Los inventores determinaron entonces el papel de los miARNs como control post-transcripcional de *CFTR* en células pulmonares usando ensayo de indicador de Luciferasa después de transfección con precursores. MiR-665, miR-383 y miR-1290 no indujeron un efecto en ningún tipo celular, mientras que miR-600 afectó a la actividad de Luciferasa en todas las células estudiadas. MiR-505, miR-943, miR-377, miR-145, miR-384, miR-101 y miR-1246 solo indujeron una reducción de la actividad de Luciferasa en A549 y/o Beas-2B, pero no en HBEPiC. Para confirmar la importancia de los elementos *cis* cognados, los inventores degeneraron la estructura correspondiente a la unión de miR-505 y miR-101 dando como resultado el mayor efecto sobre la regulación de *CFTR* post-transcripcional. Dos sitios degenerados se asociaron con un aumento modesto de la actividad de Luciferasa, pero solo en células pulmonares adultas. Los inventores validaron a continuación el efecto represivo de miR-101 sobre la regulación post-transcripcional del gen *CFTR* en células pulmonares adultas. Se controló la sobre-expresión del precursor miR-101.

Estudios previos han demostrado que la regulación mediada por miARN podría requerir la presencia de una secuencia ARE (Jing Q et al. Cell, 2005; Sun G et al NAR, 2010; Glorian V et al. Cell Death Differ, 2011). Los sitios de unión a miR-101 y miR-600 solapan con la estructura ARE-6074 y el sitio de unión a miR-384 solapa con la estructura ARE-5698. Para investigar si el impacto de la unión a miARNs depende de la integridad de las estructuras ARE, llevamos a cabo ensayos de co-transfección con los precursores miR-101, miR-600 y miR-384 y las construcciones que contienen el 3'UTR de *CFTR* natural o degenerado. Solo el miR-101 perdió su efecto represivo sobre la actividad de Luciferasa después de la degeneración de la secuencia de *CFTR* homóloga a su región de siembra y abrogación de ARE-6074. La generación de ARE-6074 y ARE-5698 no afectó a la actividad de miR-600 y miR-384, respectivamente.

Estos datos demuestran la implicación de miARNs en la estrechamente controlada regulación del desarrollo de la expresión de *CFTR* y más particularmente que miR-101 actúa directamente sobre su sitio cognado en combinación con una estructura ARE solapada.

Desde la identificación de reguladores cruciales hasta la evaluación de nuevas herramientas terapéuticas potenciales para la fibrosis quística

La región que abarca el sitio de unión miR-101 y ARE-6074 es crítica para la acción reguladora de miR-101. De esta manera, los oligonucleótidos bloqueadores de la unión a miARN (MBBO) fueron diseñados para prevenir la unión de varios miARNs que incluyen miR-101, miR-600, miR-145 y miR-384 al 3'UTR del gen *CFTR*. El uso de estos MBBOs, co-transfectados con el gen indicador, condujo a una sobreexpresión de 1,5 a 6 veces superior a la actividad de Luciferasa en diferentes líneas celulares (Figura 1A). El aumento de nivel de *CFTR* endógeno por MBBO-1 se confirmó en células pulmonares (Figura 1B).

A continuación, a fin de evaluar el efecto de los MBBOs *in vivo*, los inventores introdujeron MBBOs en epitelio ALI reconstituido cultivado a partir de células nasales humanas procedentes de individuos de control y pacientes de CF homocigotos p.Phe508del. El oligonucleótido de control, MBBO-1 o MBBO-2 se añadió al lado apical de las células nasales primarias sin reactivo de transfección. Después de 2h a 37°C, el medio apical fue retirado para restaurar la interfaz aire-líquido. La aplicación se repitió cada 2 días con oligonucleótido de control recién preparado o con MBBOs. El uso de MBBO-1 indujo un aumento de 2 a 6 veces en el nivel de transcrito de *CFTR* endógeno en los controles (Figura 1C) y un incremento de 2 a 3 veces en los pacientes (Figura 1D), y ninguna mejora destacada con un número repetido de incorporación del MBBO-1. La Figura 1E representa el gráfico de caja correspondiente a MBBO-1, MBBO-2 y MBBO-3 24 h después del tratamiento en epitelio ALI cultivado a partir de pacientes de CF homocigotos p.Phe508del (Figura 1E). El ensayo de inmunotinción también reveló una expresión más fuerte de proteínas CFTR en epitelio tratado con MBBO-1, MBBO-2 y MBBO-3 en epitelio ALI cultivado a partir de pacientes de CF (Figura 1F). Los ensayos funcionales mostraron la ausencia de transporte aniónico dependiente de CFTR en células CFBE410- en comparación con 16HBEo- (Figura 1G). Por el contrario, se observó un aumento significativo del nivel de transporte

aniónico en células de CF tratadas con MBBO en comparación con CFBE no tratado de acuerdo a la cantidad de CFTR funcional detectada mediante inmunotinción (Figura 1H).

Estos datos confirman la importancia de las regiones que abarcan los sitios de unión miR-101 y miR-145 en la regulación del gen *CFTR* en células nativas, y ofrecen una nueva perspectiva para compuestos terapéuticos de CF.

## 5 Discusión

En la presente memoria, los inventores demuestran que los miARNs, que incluyen miR-101 y miR-145, regulan negativamente el nivel de transcritos de *CFTR* en células pulmonares adultas, mientras que no presentan efecto en células pulmonares fetales. De forma destacada, además de su función específica en las células pulmonares maduras, recientemente se ha descrito que el miR-101 no altera la estabilidad de ARNm de *CFTR* en líneas celulares pancreáticas (Gillen AE et al. *Biochem J*, 2011) pero induce una reducción de la actividad de Luciferasa en una línea celular de riñón embrionaria (Mergiorini F et al *Plos One*, 2011), lo que sugiere un papel potencial como factor específico de tejido. Los inventores han demostrado la implicación de los miARNs, en la regulación de desarrollo estrechamente controlada de la expresión de *CFTR*, y más particularmente, que el miR-101 actúa sobre su sitio cognado en combinación con una estructura ARE solapada.

En la presente memoria, los inventores también han demostrado el beneficio de caracterizar factores reguladores para identificar nuevas dianas terapéuticas. Adicionalmente, estudios preliminares indicaron que la complementación de tan solo un 6-10% de transcritos de *CFTR* generan suficientes niveles de *CFTR* para mantener un transporte de cloruro normal en los epitelios (Sinn PL et al. *Hum Mol Genet*, 2011). Estos datos están soportados por el descubrimiento de que la presencia de una variación de secuencia natural en el promotor de *CFTR*, en *cis* respecto a una mutación grave, lo cual aumenta la transcripción, puede permitir que suficiente proteína CFTR alcance las células de membrana apicales a fin de restaurar la función parcial, induciendo de este modo un fenotipo de CF moderado (Romey MC et al. *JBC*, 2000). Más recientemente, el aumento de la cantidad de proteína CFTR de p.Phe508del ha sido asociado a una actividad de canal de CFTR de p.Phe508del activado (Hutt DM et al. *Nat Chem Biol*, 2010). Un trabajo reciente demuestra que el uso de especie mimética de miR-138 como herramienta terapéutica potencial, restaura CFTR-Phe508del y un transporte de Cl<sup>-</sup> funcional (Ramachandran S et al. *PNAS*, 2012). Puesto que el miR-138 se dirige a SIN3, un represor transcripcional altamente conservado que regula muchos genes, los autores subrayaron que el uso de especie mimética de miR-138 puede tener efectos no deseados (Ramachandran S et al. *PNAS*, 2012). En la presente memoria, los inventores evaluaron una nueva herramienta terapéutica putativa dirigida específicamente al gen *CFTR*. Centrándose en miR-101 y miR-145, los inventores diseñaron oligonucleótidos MBBO, que reconocen sus sitios de unión en el 3'UTR de *CFTR*. Este bloqueo condujo a la corrección de la actividad de canal de CFTR a través del incremento de los niveles de ARNm y proteína en pacientes de CF con la mutación más grave, la p.Phe508del en homocigotos. Puesto que el bloqueo de miR-101 y miR-145 se ha asociado a la desregulación de rutas epigenéticas que dan como resultado la progresión de cáncer (Varambally S et al. *Science*, 2008) y cáncer de pulmón (Guan P et al. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012), la estrategia del inventor de bloquear su unión a su estructura de ARNm de *CFTR* cognado puede presentar beneficios terapéuticos a través de la estabilización de los transcritos de *CFTR*, proporcionando en definitiva suficientes proteínas funcionales para mejorar el fenotipo de pacientes de CF.

### EJEMPLO 2:

#### Material y métodos

#### Secuencias de oligonucleótidos TSB

40 TSB1: GTT GGT ACT TCT GTA ATA

TSB2: ACC TTA CTT ATA TCT CAA

#### Análisis *in silico*

En primer lugar, las variantes de *CFTR* fueron analizadas usando Human Splicing Finder 2.4.1 (<http://www.umd.be/HSF/HSF.html>), que incluye dos algoritmos de cálculo diferentes (HSF y MaxEnt) y NNSplice ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html); Splice Site Prediction de Neural Network o SSPNN). Supusimos que se podía producir una división aberrante cuando se predijo un sitio de división (ss) *de novo* o cuando la puntuación de un ss pre-existente sub-óptimo aumentó drásticamente en la secuencia mutada. También evaluamos las secuencias naturales (wt) y mutadas usando la base de datos SpliceAid 2 ([http://193.206.120.249/splicing\\_tissue.html](http://193.206.120.249/splicing_tissue.html)).

En segundo lugar, evaluamos la conservación de la posición de nucleótido afectada por una sustitución en un conjunto de ortólogos de mamífero seleccionados. Primero alineamos la secuencia genómica humana de *CFTR* (NC\_000007.13) con nueve ortólogos de vertebrado de Ensembl usando el algoritmo MUSCLE3.7 disponible en [www.phylogeny.fr](http://www.phylogeny.fr). Los resultados, mostrados como porcentajes de los nucleótidos wt y variantes, fueron obtenidos analizando los alineamientos múltiples con el software Jalview (<http://www.jalview.org/>). Se obtuvo un análisis más amplio con visualización de los alineamientos múltiples de 19 ortólogos de *CFTR*, que incluyen *CFTR* humano, de UCSC usando la herramienta Multiz Alignments. El nucleótido wt se consideró como altamente conservado cuando su

frecuencia fue superior al 90%, conservado de forma intermedia entre 50 y 90%, y poco conservado cuando su frecuencia fue inferior al 50% y/o cuando el nucleótido mutado se encontró con una frecuencia de al menos 10%.

#### Construcciones indicadoras de división

5 El impacto de la variante recién descubierta sobre la división fue evaluado usando el vector de atrapamiento de exón pSPL3 (proporcionado amablemente por el Dr. I. Bottillo). Amplificamos la secuencia de *CFTR* de interés (632 pb) en el intrón 12 (nomenclatura de legado: intrón 11) usando el ADN genómico del paciente (diluido a 5 ng/μL) y la polimerasa High Fidelity Phusion® (Finnzymes, Espoo, Finlandia). El amplicón se insertó en pSPL3 entre los sitios de restricción *Xho*I y *Nhe*I usando la ligasa de ADN T4 High Concentration (Invitrogen, Villebon sur Yvette, Francia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Además de los minigenes natural (wt) y mutado (c.1680-883A>G), se generaron otros dos minigenes de *CFTR* que portan el SNP c.1680-870T>A (control negativo para división aberrante) o la mutación de división c.1680-886A>G (1811+1,6kb A>G) (control positivo para división aberrante). Todas las secuencias de cebador se encuentran disponibles bajo petición. Las secuencias de construcciones de minigen fueron verificadas mediante secuenciamiento de Sanger.

#### Cultivo celular, transfección y tratamiento de Bloqueador de Sitio Diana (TSB)

15 Se cultivaron células bronquiales humanas BEAS-2B como se ha descrito previamente (Rene C et al. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010). Veinticuatro horas antes de la transfección, las células fueron llevadas a placas de seis pocillos y, una alcanzada una confluencia de aproximadamente 80%, fueron transfectadas temporalmente con 1,5 μg de cada construcción de minigen usando el reactivo de transfección PolyFect® (Qiagen, Courtaboeuf, Francia). Las células fueron recolectadas después de 48 horas para el análisis de transcritos. Para el tratamiento de TSB (TSB1 y TSB2), las células fueron co-transfectadas con las construcciones de minigen de *CFTR* y 25 nM, 50 nM, 100 nM o 1 μM de TSB usando el reactivo de transfección Interferin® (Polyplus, Ozyme, Illkirch, Francia).

#### Análisis de transcrito

25 Se extrajo el ARN total de células BEAS-2B usando el kit RNeasy Plus (Qiagen). Se llevaron a cabo al menos dos Transfecciones independientes para todas las condiciones experimentales. El impacto sobre la división se evaluó como se ha reportado previamente. Los productos de RT-PCR también fueron secuenciados usando el kit Big Dye Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) en un Analizador Genético ABI-3130XL. La cantidad relativa de cada producto de división de *CFTR* fue determinada midiendo el área de pico (evaluada con el software GeneMapper) y dividiéndola por la suma de todas las áreas de pico detectadas en la misma reacción PCR.

30 Se extrajo ARN total de las células nasales del paciente y de dos controles no de CF usando el kit RNeasy Plus (Qiagen). Se produjo la transcripción inversa a partir de 500 ng de ARN total con el MMLV-RT (Invitrogen). Se usó un μL de cada RT-PCR para amplificación de PCR con cebadores que comprenden el intrón 12 (f11-r13) y pares de cebadores específicos que amplifican pseudoexón, PE (f11-rPE).

## Resultados

### Identificación de una nueva mutación putativa causante de enfermedad

35 Para explorar el efecto de la variación c.1680-883A>G (localizada en el intrón 12; localización de cromosoma: 11q23.3; hg19), se generaron predicciones *in silico* de sitio dador (5' ss) y aceptor (3' ss) para la secuencia mutada. La mutación generó una nueva puntuación elevada 5' ss en el intrón 12, lo que sugiere que dicho sitio podría usarse para una división alternativa. La mutación causante de enfermedad putativa nueva identificada c.1680-883A>G está a tres nucleótidos de distancia de una mutación de división bien conocida [c.1680-886A>G (1811+1,6kbA>G) Chillon M et al. *Am J Hum Genet.* 1995] que crea un sitio dador que causa la inclusión de un PE en transcritos maduros. En otros aspectos, la mutación fue evaluada en 200 cromosomas de control mediante análisis de secuencia de Sanger y no fue encontrada.

### Confirmación de la mutación intrónica c.1680-883A>G usando un ensayo indicador de división y en células nasales de un paciente

45 A continuación, usamos un ensayo indicador de división para evaluar el impacto de la variante c.1680-883A>G en la división. Cuando las células BEAS-2B fueron transfectadas con el minigen que porta la variante c.1680-886A>G (usada como control positivo), lo que causa la inclusión de una secuencia intrónica de 49 pb (inclusión de exón críptico, CEI), los transcritos divididos aberrantemente fueron aproximadamente el 90-95% del ARNm total de *CFTR* (natural+dividido aberrantemente). A la inversa, la transfección del minigen que porta la variante neutra c.1680-870T>A (control negativo) no tuvo ningún efecto sobre la división. Finalmente, la transfección del minigen que porta la mutación nueva identificada c.1680-883A>G condujo a la activación de un pseudoexón (PE) dando como resultado la inclusión de una secuencia adicional de 53 pb, como muestra el secuenciamiento de Sanger, y la pérdida completa de transcritos de *CFTR* wt.

55 A continuación, comprobamos si dicha mutación induce la retención de secuencia en células nasales del paciente de CF incluido en el análisis de familia trio. De este modo, confirmamos que el paciente albergaba una inclusión de PE

de 53 pb en el intrón 12 mediante amplificación de PCR en comparación con controles que usan pares de cebadores no específicos y específicos al PE (f11-r13 y f11-rPE, respectivamente).

Corrección de la división aberrante de CFTR usando Bloqueadores de Sitio Diana (TSB1 y TSB2)

5 Diseñamos oligonucleótidos anti-sentido (TSB1 y TSB2) que bloquean el acceso al 3'ss (sitio aceptor) y al 5'ss (sitio dador) respectivamente, a fin de corregir la división aberrante provocada por las mutaciones c.1680-883A>G y c.1680-886A>G. Para determinar el efecto de la concentración de TSB sobre la división aberrante, se co-transfectaron células BEAS-2B bronquiales humanas con los minigenes que albergan las dos mutaciones y cuatro concentraciones de TSB diferentes (25 nM, 50 nM, 100 nM, 1 µM) durante 24h. TSB1, que está dirigido al 3'ss (sitio aceptor), presentó un marcado efector correctivo a baja concentración (50 nM) sobre la división aberrante producida por las mutaciones c.1680-883A>G y c.1680-886A>G (Figura 2A, panel superior e inferior, respectivamente). La especificidad de TSB1 se confirmó usando un control de TSB (CTL). La eficacia de la restauración de la división wt se cuantificó mediante PCR de análisis de fragmento (Figura 2B). A continuación, llevamos a cabo experimentos cinéticos transfectando TSB1 50 nM y recolectando células después de 24h, 48h y 72h. Un efecto marcado fue evidente ya desde las 24h (Figura 2C). Específicamente, la cuantificación mostró que el porcentaje de transcritos divididos aberrantemente (que contienen el exón críptico) se redujo al 45% (c.1680-883A>G) y al 30% (c.1680-886A>G) del ARNm total de *CFTR* (natural+transcritos divididos aberrantemente). De este modo, la transfección de TSB1 50 nM para las 24h indujo una restauración del 55% y del 70% del ARNm de *CFTR* normal, respectivamente (Figura 2D). Finalmente, determinamos la duración de la acción de ambos TSB (TSB1 y TSB2) en células BEAS-2B y observamos que presentan un fuerte efecto sobre la división hasta 72h después de la eliminación del medio de transfección (16h de incubación) (Figura 2E). La restauración parcial de ARNm de *CFTR* dividido correctamente inducida por TSB1 (24h a 100 nM) fue confirmada en cultivos nasales primarios obtenidos de un individuo de control (Figura 2F). TSB2 requirió una mayor concentración para actuar sobre la división (Figura 3).

## Discusión

25 De las 1976 mutaciones de *CFTR* reportadas, se cree que 228 (11,54%) afectan a la división de pre-ARNm ([www.genet.sickkids.on.ca/](http://www.genet.sickkids.on.ca/)). La mayoría de las mutaciones de división alteran las secuencias de sitio de división canónicas, eliminando por completo el reconocimiento de exón y/o conduciendo a una ausencia casi completa de transcritos divididos correctamente. Actualmente, entre el 2 y el 5% de las mutaciones de CF siguen siendo desconocidas y probablemente se encuentran localizadas profundamente en intrones, induciendo eventos de división aberrante. El análisis funcional, ensayo de división de minigen y PCR sobre células nasales procedentes de un paciente de CF que porta c.1680-883A>G, demostró que esta mutación intrónica profunda generó una nueva puntuación elevada de 5' ss (sitio dador) en el intrón 12, que está implicado en la inclusión de PE. De forma destacable, esta mutación está próxima a otra mutación intrónica profunda identificada previamente, la c.1680-886A>G, que también induce la inclusión de pseudoexón PE, lo que sugiere que dicha región intrónica puede ser propensa a mutación. La mutación c.1680-886A>G se produce con una frecuencia del 3,4% en la parte Sur-Occidental de Europa y del 0,2% en Francia (Federici S, 2001). A la inversa, c.1680-883A>G no ha sido descrita nunca con anterioridad, aunque aquí se ha identificado en tres pacientes no relacionados.

40 El objetivo final de este trabajo fue el diseño de oligonucleótidos antisentido para el tratamiento de CF. De hecho, la exclusión de PE mediante modificación antisentido de la división pre-ARNm representa un tipo de medicina genética personalizada. El desarrollo de oligonucleótidos que bloquean el acceso a un sitio diana (bloqueadores de sitio diana, TSB) ofrece nuevas oportunidades de tratamiento para otros trastornos genéticos (Webb TR et al. Hum Mol Genet 2012, Nuzzo F et al. Blood, 2013). Aquí, nosotros usamos esta estrategia para corregir la división aberrante causada por mutaciones intrónicas profundas en el gen *CFTR* (c.1680-883A>G y c.1680-886A>G). El efecto de TSB sobre la corrección de la división aberrante en células BEAS-2B bronquiales fue rápido y sostenido en el tiempo, lo que sugiere que los TSBs podrían constituir una herramienta terapéutica en pacientes con CF que presentan mutaciones intrónicas profundas en el gen *CFTR* debido a que restauran transcritos normales. Para pacientes con CF, estos datos son particularmente interesantes ya que la mutación c.1680-886A>G es la cuarta más frecuente en la Europa Sur-Occidental (3,4%) y el umbral de ARNm funcional y por consiguiente de proteína CFTR requerido para las funciones normales es muy bajo, habiendo sido estimado en el 5% (Ramalho AS et al. Am J Respir Cell Mol Biol 2002). Sería interesante, si es posible, probar dichos TSBs en células de las vías respiratorias procedentes de pacientes de CF que albergan ambas mutaciones evaluadas en este trabajo, y también para evaluar los TSBs para otras mutaciones de división intrónicas en *CFTR*.

## REFERENCIAS

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado del arte al cual pertenece esta invención.

55 Baudouin-Legros M, Hinzpeter A, Jaulmes A, Brouillard F, Costes B, et al. (2005) Cell-specific posttranscriptional regulation of CFTR gene expression via influence of MAPK cascades on 3'UTR part of transcripts. Am J Physiol Cell Physiol 289: C1240-1250.

Boucher RC. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. Trends Mol Med. 2007 Jun; 13(6): 231-40.

- Chillon M, Dork T, Casals T, et al. A novel donor splice site in intron 11 of the CFTR gene, created by mutation 1811 + 1.6kbA-->G, produces a new exon: high frequency in Spanish cystic fibrosis chromosomes and association with severe phenotype. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 623-9.
- 5 Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, Legrys V A, Massie J, Parad RB, Rock MJ, Campbell PW 3rd; Cystic Fibrosis Foundation. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr*. 2008 Aug; 153(2): S4-S14.
- Federici S, Iron A, Reboul MP, et al. [CFTR gene analysis in 207 patients with cystic fibrosis in southwest France: high frequency of N1303K and 1811 + 1.6bA>G mutations]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* 2001 ;8: 150-7.
- 10 Gillen AE, Gosalia N, Leir SH, Harris A (2011) MicroRNA regulation of expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Biochem J* 438: 25-32. Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, et al. (2005) Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 120: 623-634.
- Glorian V, Maillot G, Poles S, Iacovoni JS, Favre G, et al. (2011) HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV -induced apoptosis. *Cell Death Differ* 18: 1692-1701.
- 15 Gras D, Bourdin A, Vachier I, et al. An ex vivo model of severe asthma using reconstituted human bronchial epithelium. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 1259-1266.
- Guan P, Yin Z, Li X, Wu W, Zhou B (2012) Meta-analysis of human lung cancer microRNA expression profiling studies comparing cancer tissues with normal tissues. *J Exp Clin Cancer Res* 31: 54.
- 20 Hutt DM, Herman D, Rodrigues AP, Noel S, Pilewski JM, Matteson J, Hoch B, Kellner W, Kelly JW, Schmidt A, Thomas PJ, Matsumura Y, Skach WR, Gentsch M, Riordan JR, Sorscher EJ, Okiyoneda T, Yates JR 3rd, Lukacs GL, Frizzell RA, Manning G, Gottesfeld JM, Balch WE. Reduced histone deacetylase 7 activity restores function to misfolded CFTR in cystic fibrosis. *Nat Chem Biol*. 2010 Jan; 6(1): 25-33.
- Martinez NJ, Walhout AJ (2009) The interplay between transcription factors and microRNAs in genome-scale regulatory networks. *Bioessays* 31: 435-445.
- 25 Megiomi F, Cialfi S, Dominici C, Quattrucci S, Pizzuti A (2011) Synergistic post-transcriptional regulation of the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) by miR-101 and miR-494 specific binding. *PLoS One* 6: e26601.
- Nuzzo F, Radu C, Baralle M, et al. Antisense-based RNA therapy of factor V deficiency: in vitro and ex vivo rescue of a F5 deep-intronic splicing mutation. *Blood* 2013; 122: 3825-31.
- 30 Oglesby IK, Chotirmall SH, McElvaney NG, Greene CM (2013) Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by microRNA-145, -223, and -494 is altered in DeltaF508 cystic fibrosis airway epithelium. *J Immunol* 190: 3354-3362.
- Ramachandran S, Karp PH, Jiang P, Ostedgaard LS, Walz AE, et al. (2012) A microRNA network regulates expression and biosynthesis of wild-type and DeltaF508 mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 13362-13367.
- 35 Ramachandran S, Karp PH, Osterhaus SR, Jiang P, Wohlford-Lenane C, et al. (2013) Post-transcriptional Regulation of CFTR Expression and Function by MicroRNAs. *Am J Respir Cell Mol Biol*.
- Ramalho AS, Beck S, Meyer M, Penque D, Cutting GR and Amaral MD. Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 619-27.
- 40 Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Drevínek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong Q, Rodriguez S, Yen K, Ordoñez C, Elborn JS; VX08-770-102 Study Group. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med*. 2011 Nov 3; 365(18): 1663-72.
- 45 Rene C, Lopez E, Claustres M, Taulan M and Romey-Chatelain MC. NF-E2-related factor 2, a key inducer of antioxidant defenses, negatively regulates the CFTR transcription. *Cell. Mol. Life Sci*. 2010; 67: 2297-2309.
- Romey MC, Pallares-Ruiz N, Mange A, Mettling C, Peytavi R, et al. (2000) A naturally occurring sequence variation that creates a YY1 element is associated with increased cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene expression. *J Biol Chem* 275: 3561-3567.
- 50

- Saint-Criq V, Ruffin M, Rebeyrol C, et al. Azithromycin fails to reduce inflammation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 2012; 674: 1-6.
- Sawicki GS, Sellers DE, Robinson WM. High treatment burden in adults with cystic fibrosis: challenges to disease self-management. *J Cyst Fibros*. 2009 Mar; 8(2): 91-6.
- 5 Shalgi R, Brosh R, Oren M, Pilpel Y, Rotter V (2009) Coupling transcriptional and post-transcriptional miRNA regulation in the control of cell fate. *Aging (Albany NY)* 1: 762-770.
- Sinn PL, Anthony RM, McCray PB, Jr. (2011) Genetic therapies for cystic fibrosis lung disease. *Hum Mol Genet* 20: R79-86.
- 10 Sun G, Li H, Rossi JJ (2010) Sequence context outside the target region influences the effectiveness of miR-223 target sites in the RhoB 3'UTR. *Nucleic Acids Res* 38: 239-252.
- Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, Burton B, Stack JH, Straley KS, Decker CJ, Miller M, McCartney J, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu P A. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci US A*. 2011 Nov 15; 108(46): 18843-8.
- Verkman AS, Galiotta LJ. Chloride channels as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Feb; 8(2): 153-71.
- 15 Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, et al. (2008) Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 322: 1695-1699.
- Viard V, Des Georges M, Claustres M, et al. Functional analysis of a promoter variant identified in the CFTR gene in cis of a frameshift mutation. *Eur J Hum Genet* 2012; 20: 180-184.
- 20 Webb TR, Parfitt DA, Gardner JC, et al. Deep intronic mutation in OFD1, identified by targeted genomic next-generation sequencing, causes a severe form of X-linked retinitis pigmentosa (RP23). *Hum Mol Genet* 2012; 21: 3647-54.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Inserm

5 <120> Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de fibrosis quística

<130> BIO12186-TAULAN-AN

<160> 5

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

15 <211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

20 <223> TSB MBBO-1

<400> 1

agtgatattt tcttacagta at 22

<210> 2

25 <211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

30 <223> TSB MBBO-2

<400> 2

ataaacgct gaagttcca gttatc 26

<210> 3

35 <211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

40 <223> TSB MBBO-3

<400> 3

45 acattattaa aataaatatt tcttagag 28

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

50 <220>

<223> TSB TSB1

<400> 4

55 gttgtactt ctgtaata 18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

60 <213> Artificial

<220>

<223> TSB TSB2

<400> 5  
accttactta tatctcaa 18

5

## REIVINDICACIONES

- 5      **1.** Un oligonucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, en donde dicho oligonucleótido es un oligonucleótido bloqueador de unión a miARN.
- 10     **2.** El oligonucleótido según la reivindicación 1, para uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con CFTR en un sujeto que lo necesite, en donde la enfermedad relacionada con CFTR se selecciona del grupo que consiste en fibrosis quística, enfermedades pulmonares, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), cáncer de pulmón, agenesia congénita de conducto deferente (CAVD), pancreatitis crónica idiopática (ICP), y bronquiectasia.
- 15     **3.** El oligonucleótido según la reivindicación 1, para uso en un método para prevenir o tratar fibrosis quística en un sujeto que lo necesite.
- 20     **4.** El oligonucleótido según la reivindicación 1, en combinación con uno o más agentes anti-enfermedad relacionada con CFTR para uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con CFTR en un sujeto que lo necesite, en donde la enfermedad relacionada con CFTR se selecciona del grupo que consiste en fibrosis quística, enfermedades pulmonares, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), cáncer de pulmón, agenesia congénita de conducto deferente (CAVD), pancreatitis crónica idiopática (ICP), y bronquiectasia, y el agente anti-enfermedad relacionada con CFTR se selecciona del grupo que consiste en corrector o potenciador de CFTR, VX-770, VX-661, VX-809, agente osmótico, Bronquitol, fármaco antioxidante, modificador de mucus, Pulmozyme, Mucomyst, broncodilatador, Ventolín, Serevent, compuesto anti-infectivo, TOBI, Azitromicina, Josacina, fármaco anti-inflamatorio, Ibuprofeno, Dexametasona, Zylfo y Acolato.
- 25     **5.** El oligonucleótido según la reivindicación 1, en combinación con uno o más agentes de fibrosis quística para uso en un método para prevenir o tratar la fibrosis quística en un sujeto que lo necesite, en donde el agente anti-fibrosis quística se selecciona del grupo que consiste en corrector o potenciador de CFTR, VX-770, VX-661, VX-809, agente osmótico, Bronquitol, fármaco antioxidante, modificador de mucus, Pulmozyme, Mucomyst, broncodilatador, Ventolín, Serevent, compuesto anti-infectivo, TOBI, Azitromicina, Josacina, fármaco anti-inflamatorio, Ibuprofeno, Dexametasona, Zylfo y Acolato.
- 30     **6.** El oligonucleótido para uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, en donde dicho agente anti-fibrosis quística o dicho agente anti-enfermedad relacionada con CFTR se selecciona entre ivacaftor VX-770, VX-661 y VX-809.
- 35     **7.** Una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido según la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad relacionada con CFTR en un sujeto que lo necesite, en donde la enfermedad relacionada con CFTR se selecciona del grupo que consiste en fibrosis quística, enfermedades pulmonares, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), cáncer de pulmón, agenesia congénita de conducto deferente (CAVD), pancreatitis crónica idiopática (ICP), y bronquiectasia.
- 8.** Una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido según la reivindicación 1 y un vehículo farmacéutico aceptable para uso en la prevención o el tratamiento de la fibrosis quística en un sujeto que lo necesite.

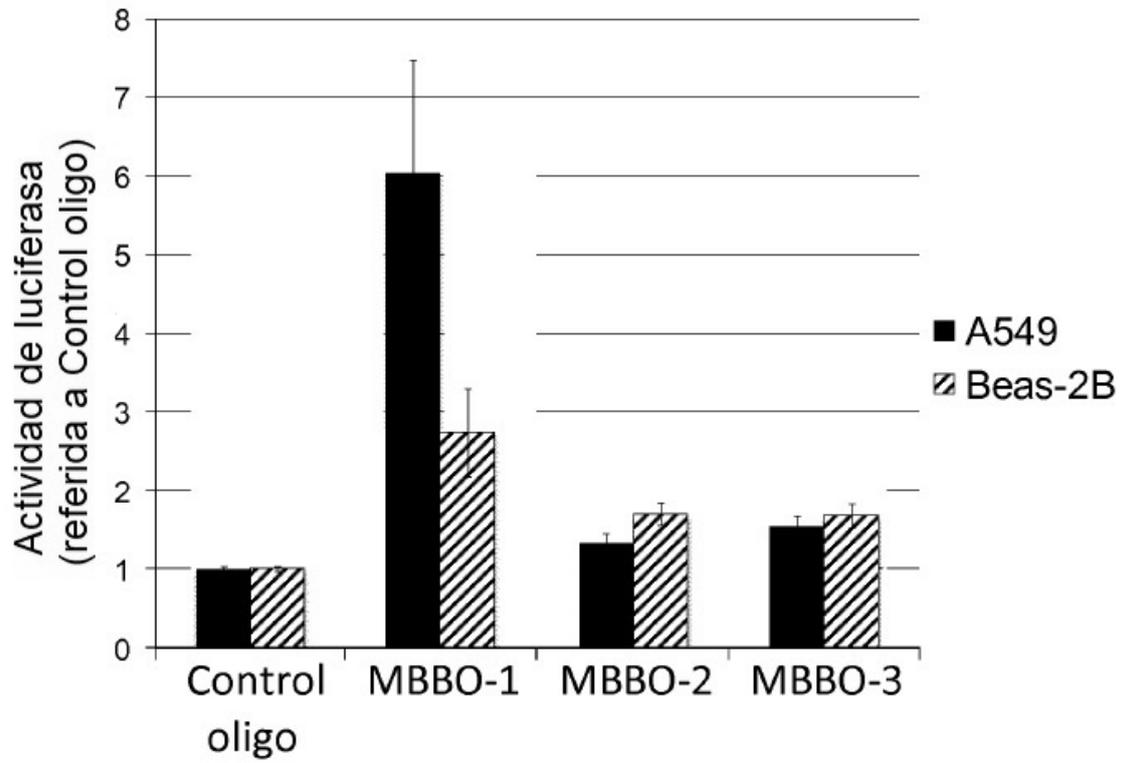


Figura 1 A

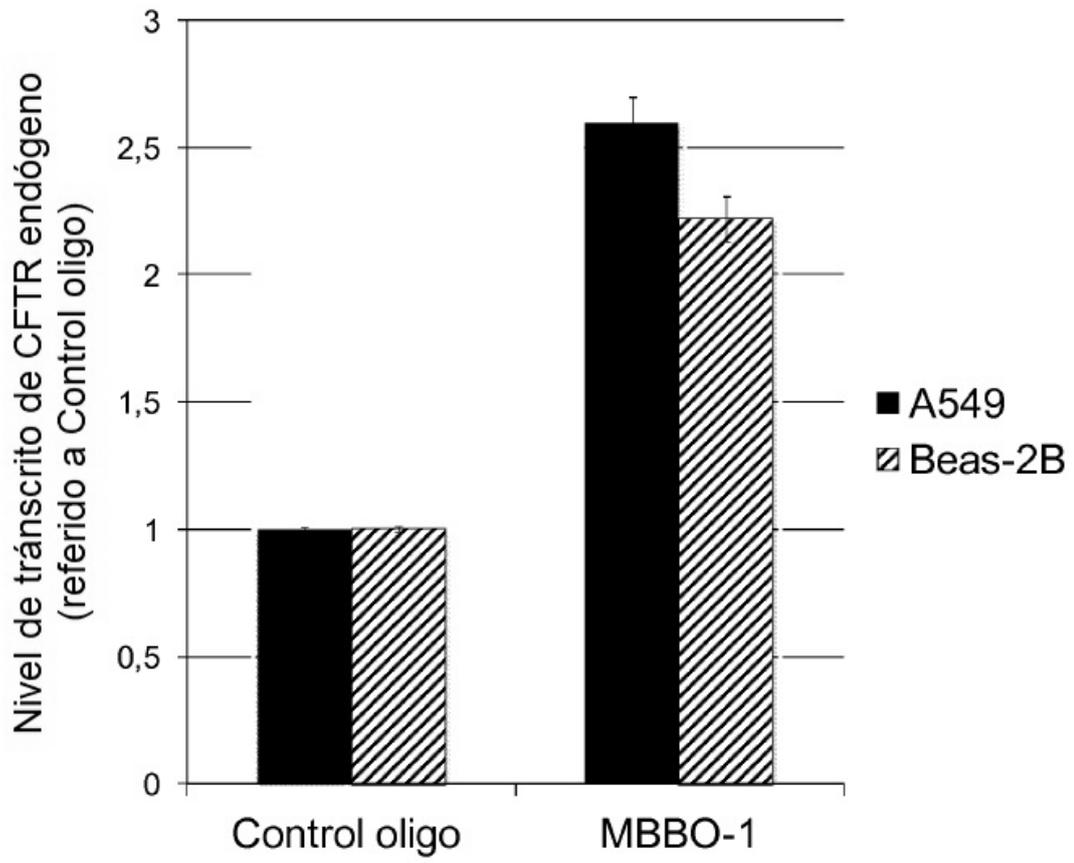


Figura 1 B

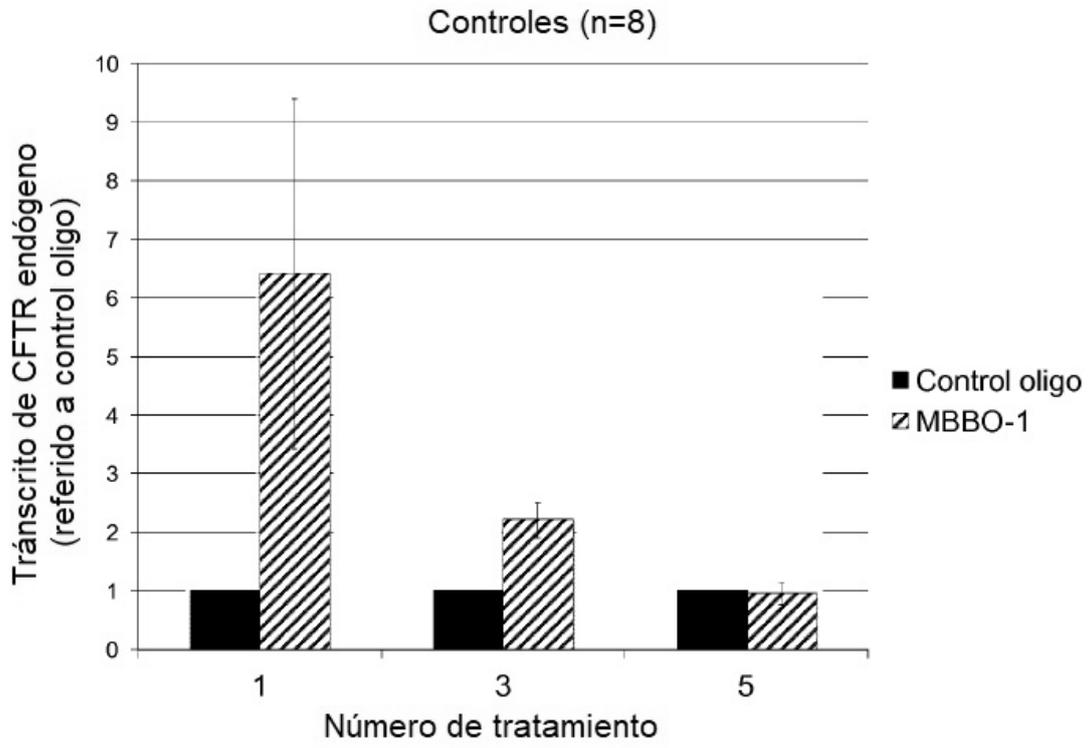


Figura 1 C

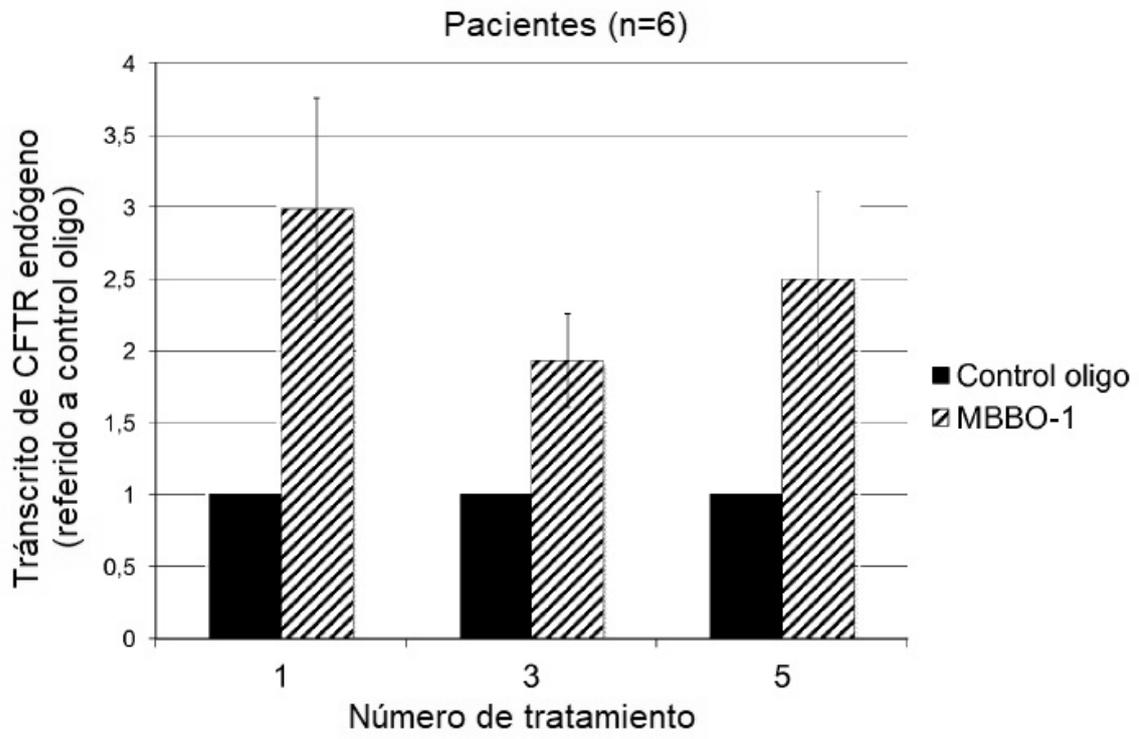


Figura 1 D

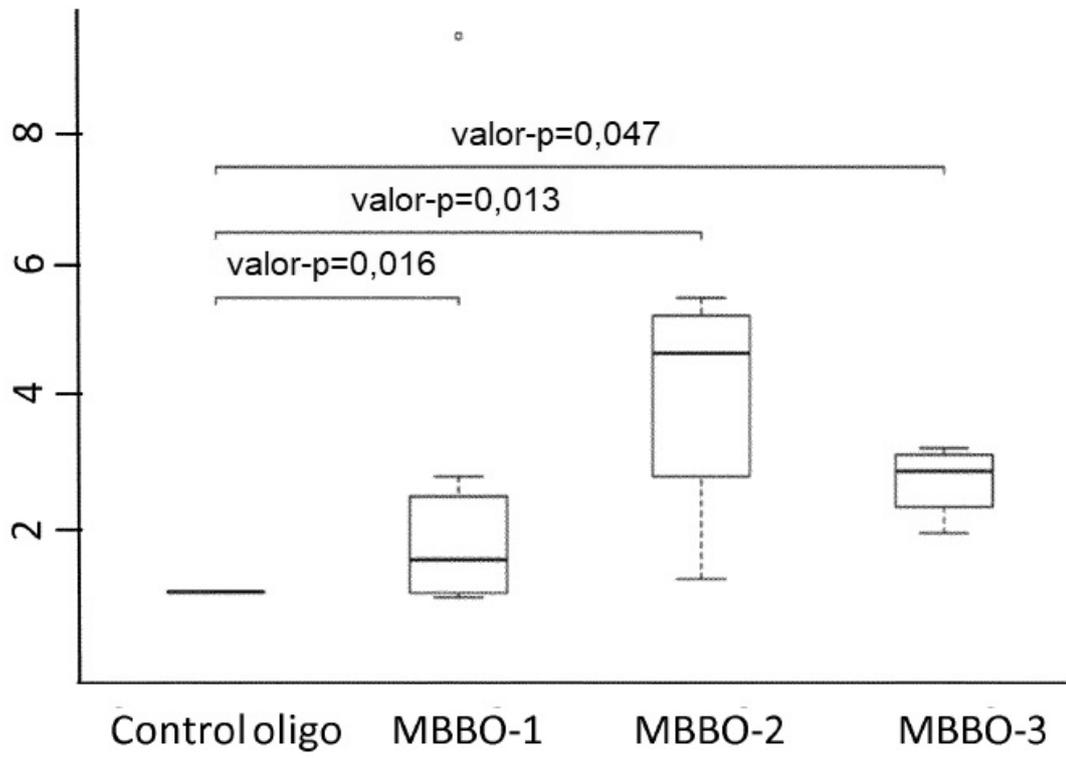


Figura 1 E

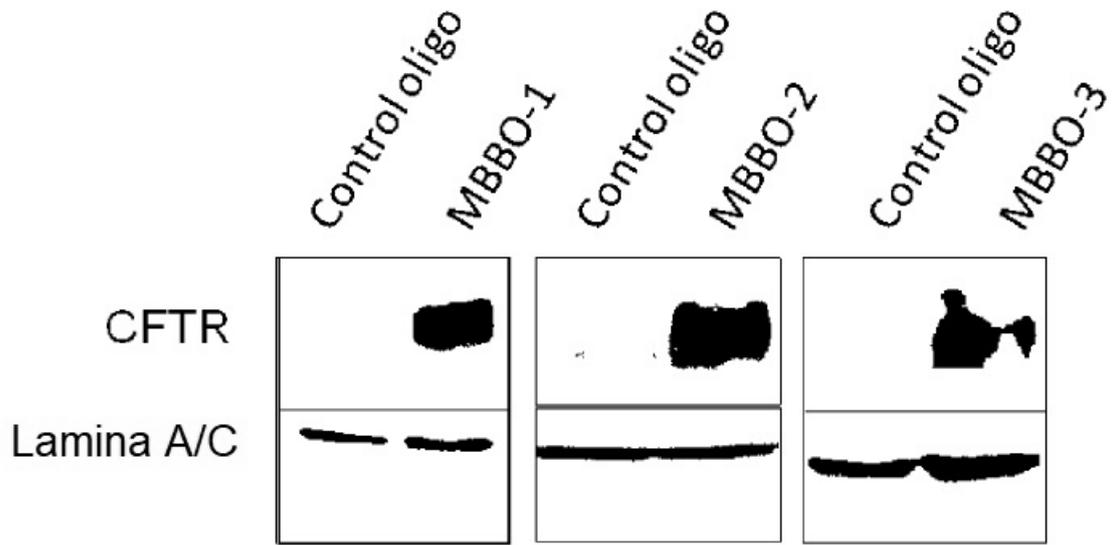


Figura 1 F

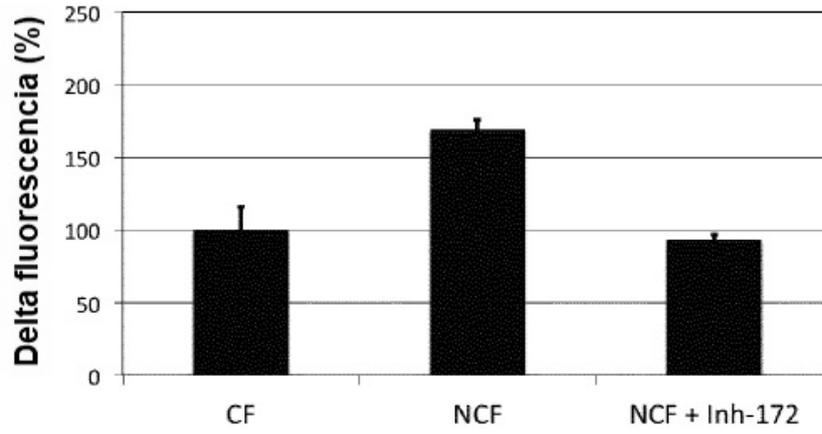
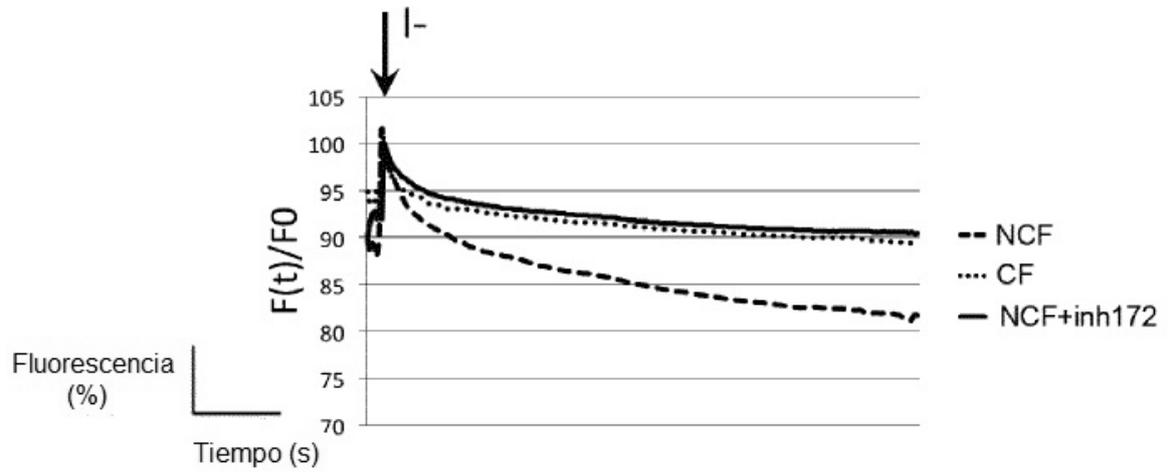


Figura 1 G

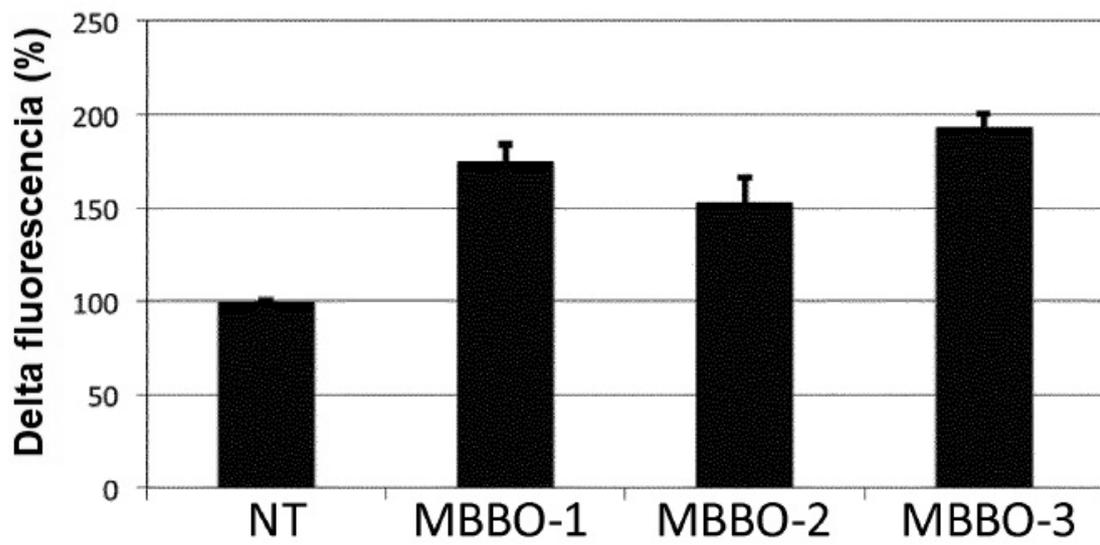
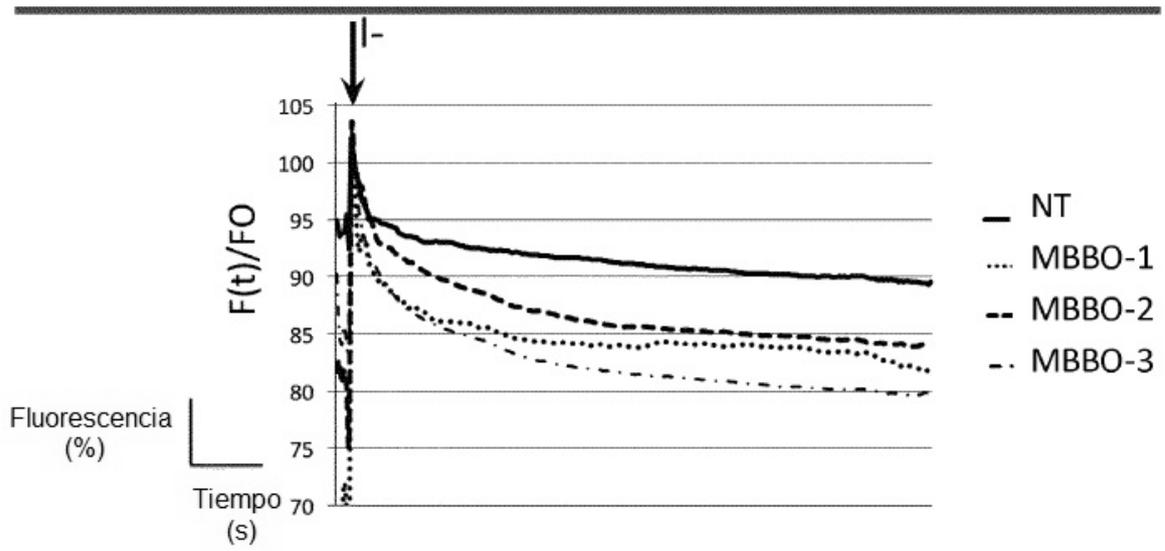


Figura 1 H

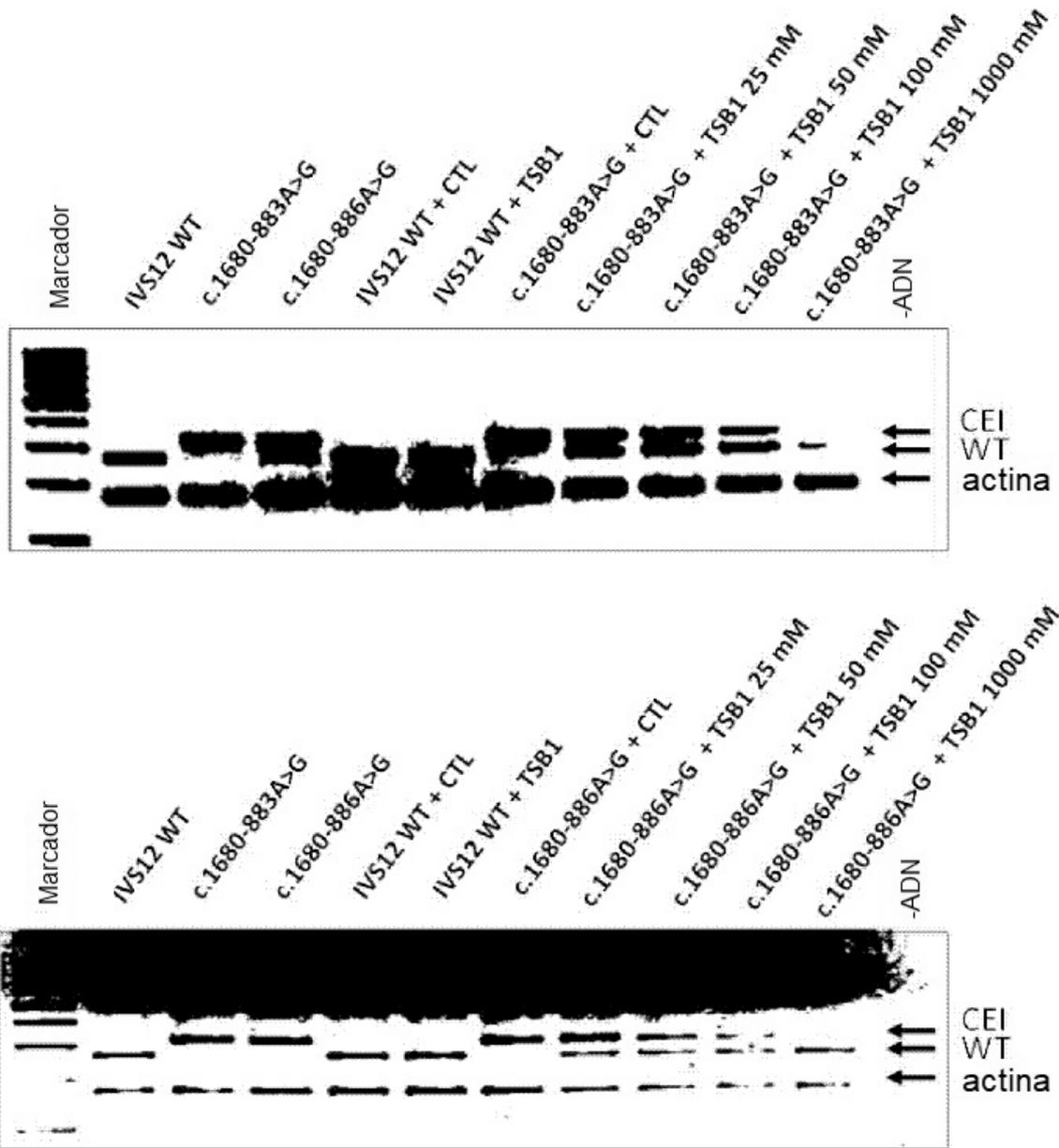


Figura 2 A

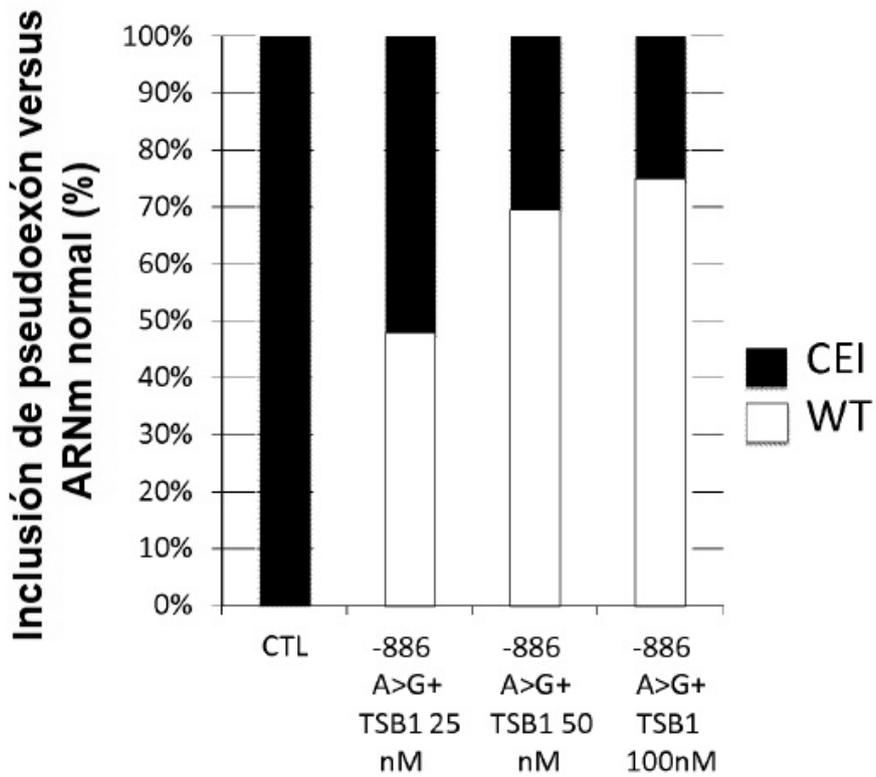
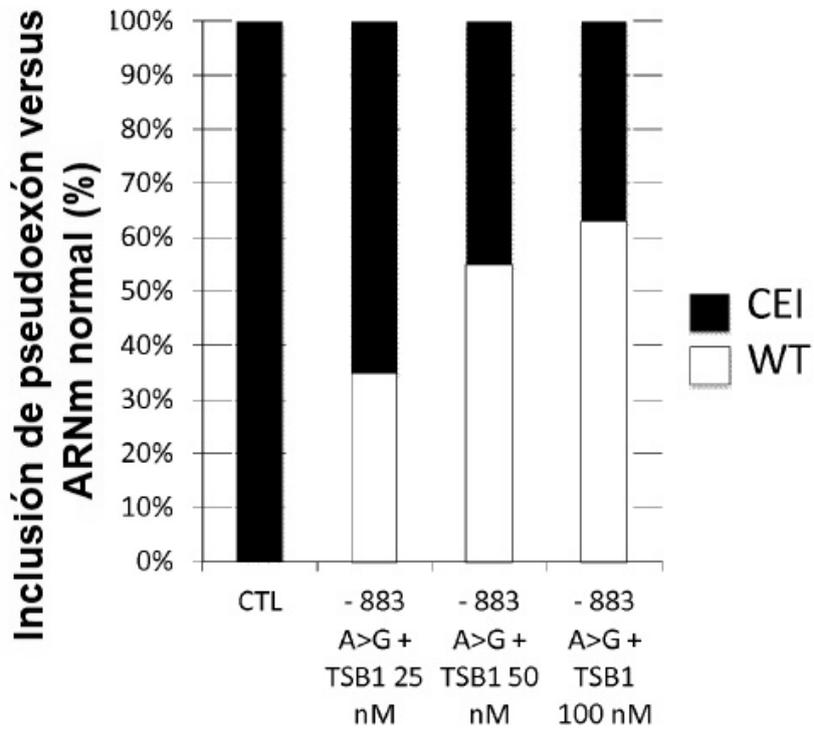


Figura 2 B

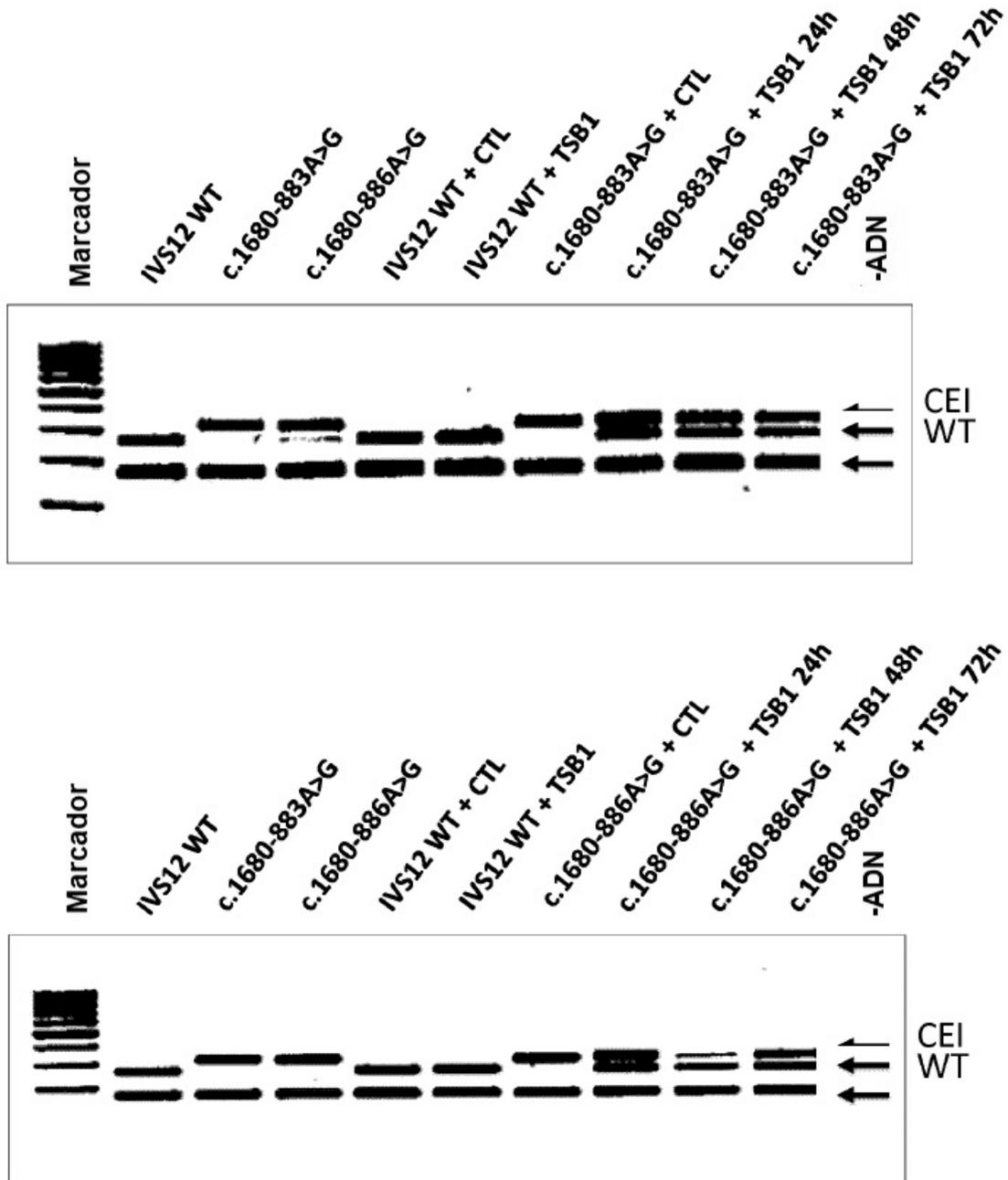


Figura 2 C

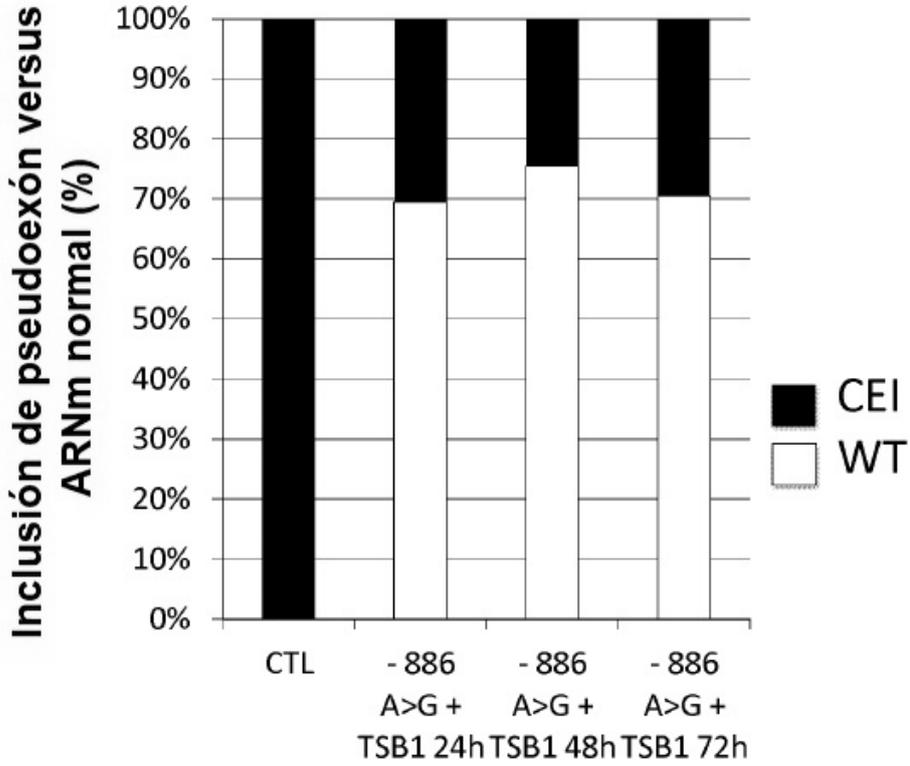
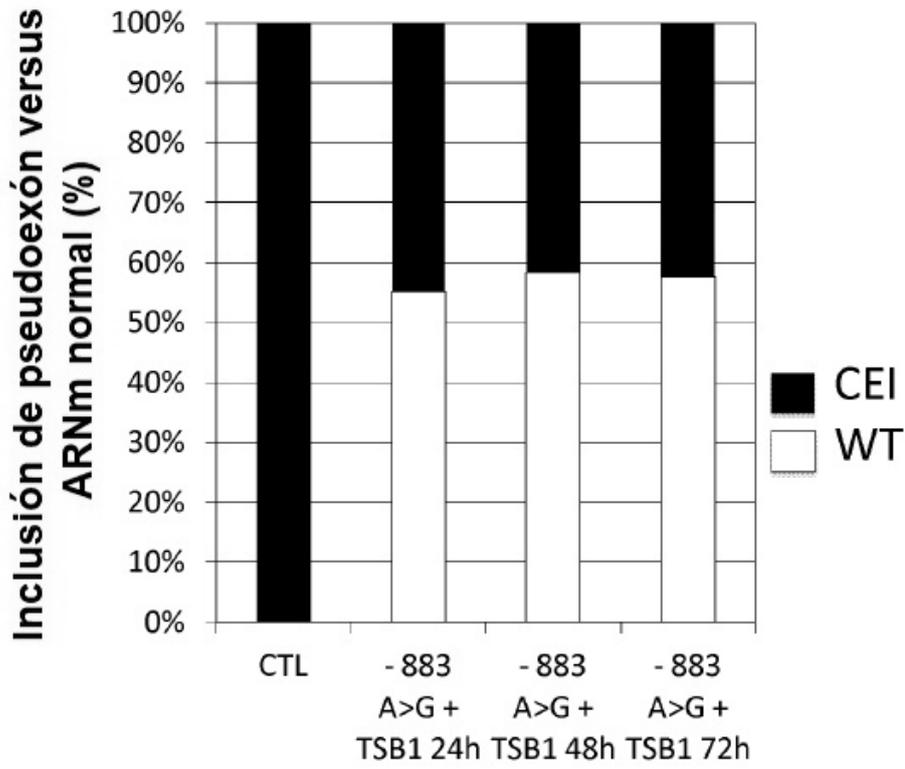


Figura 2 D

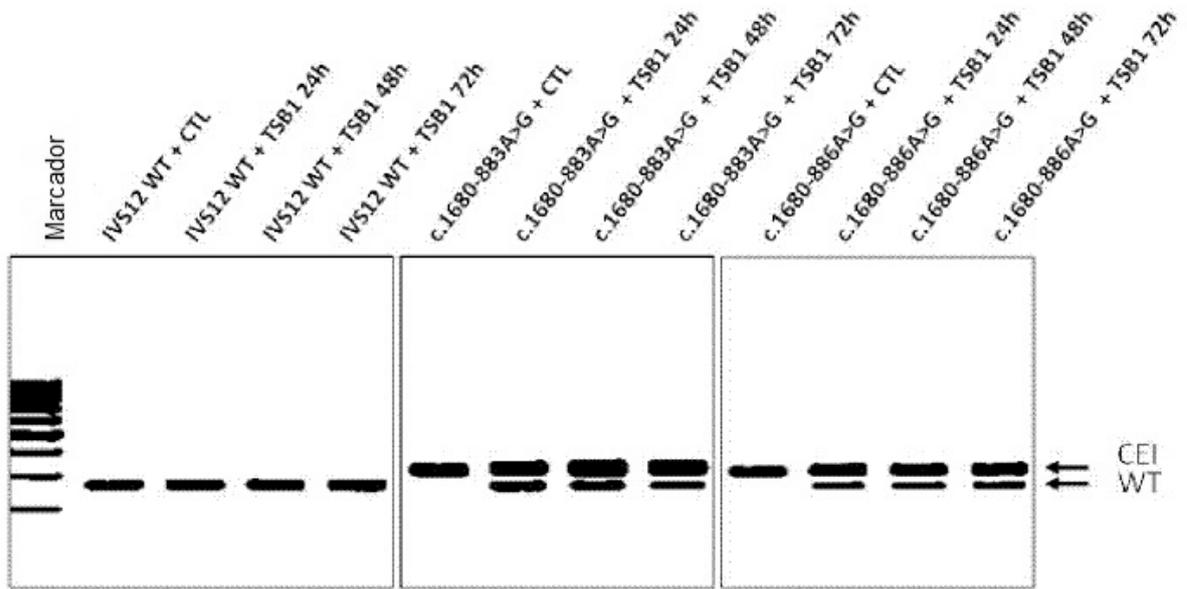


Figura 2E

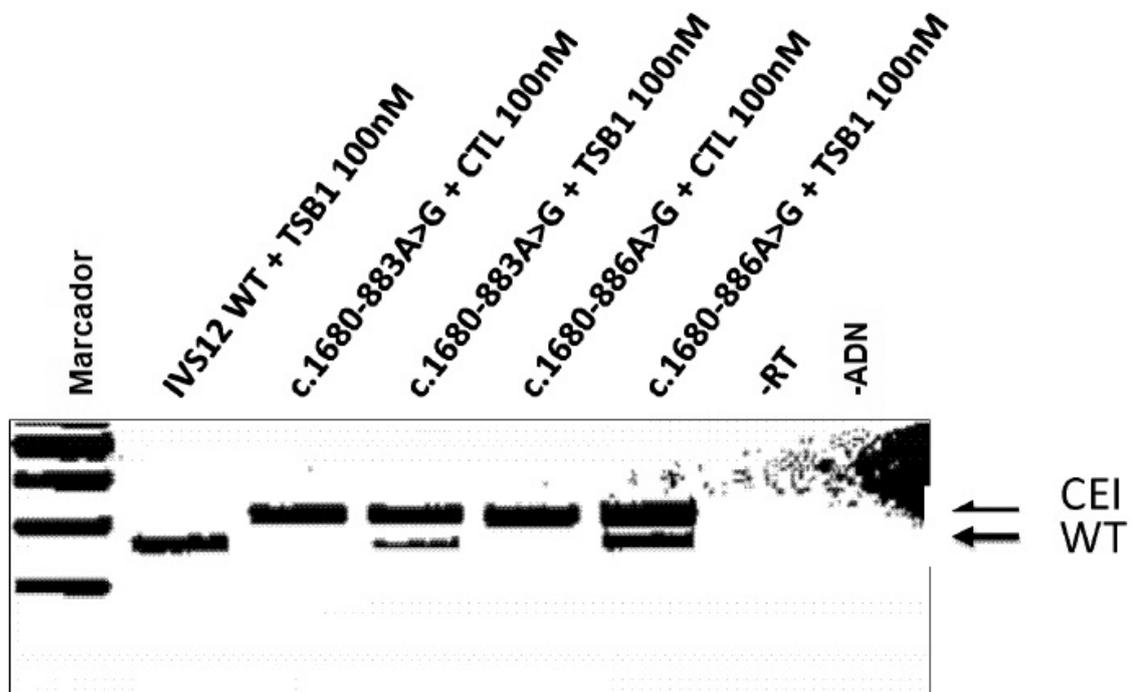


Figura 2 F

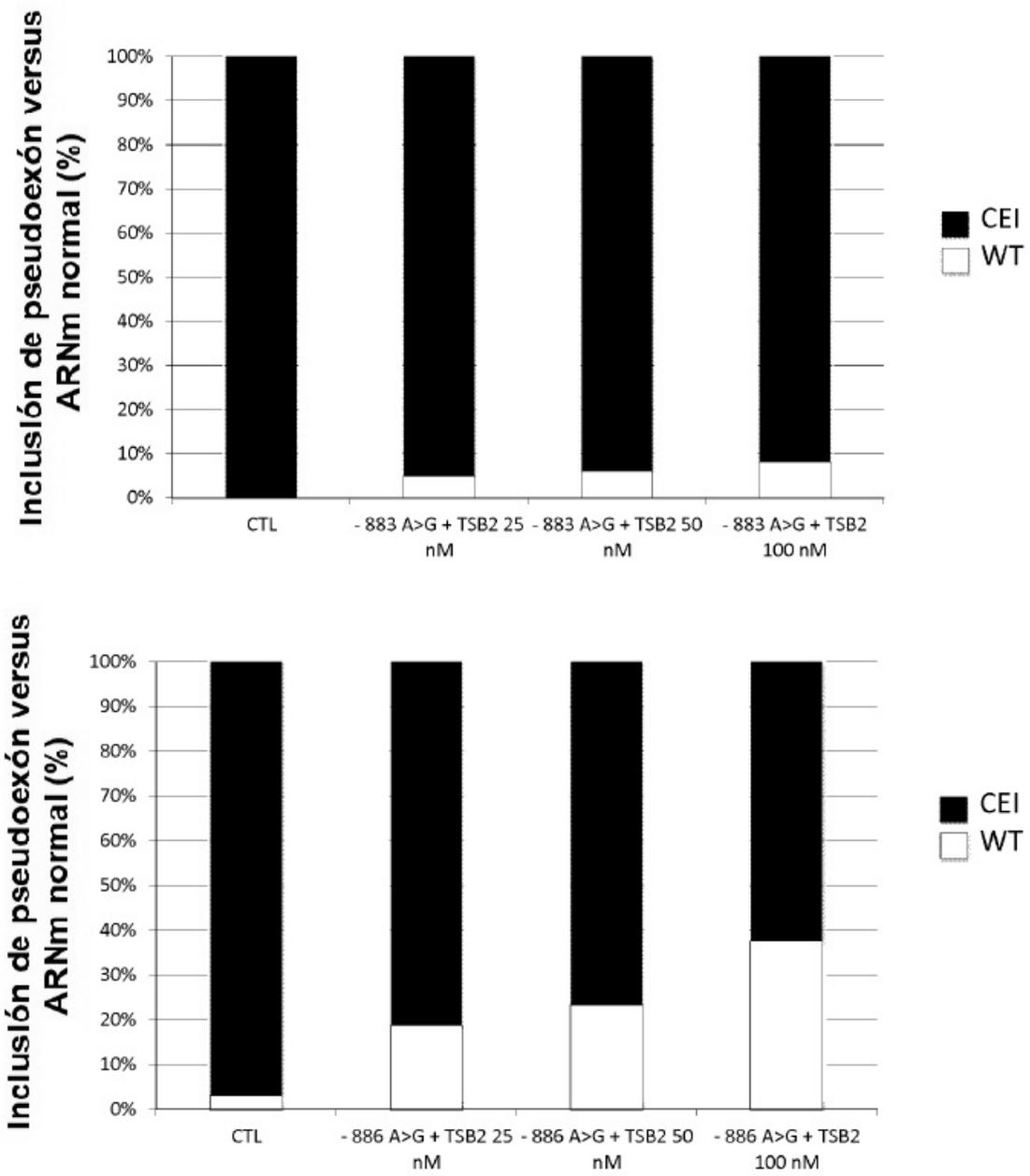


Figura 3