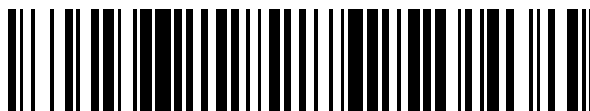


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 104**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/6876 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2014 PCT/IB2014/058359**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014 WO14111892**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2014 E 14703438 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 2946022**

54 Título: **miARN-124 como un biomarcador**

30 Prioridad:

17.01.2013 EP 13305053

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

10.06.2019

73 Titular/es:

**ABIVAX (25.0%)
5 rue de la Baume
75008 Paris , FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (25.0%);
UNIVERSITE DE MONTPELLIER (25.0%) y
INSTITUT CURIE (25.0%)**

72 Inventor/es:

**TAZI, JAMAL;
SCHERRER, DIDIER;
GARCEL, AUDE;
CAMPOS, NOÉLIE;
NAJMAN, ROMAIN y
MAHUTEAU-BETZER, FLORENCE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 716 104 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

miARN-124 como un biomarcador

La presente divulgación se refiere al campo de los biomarcadores, en particular en relación con infecciones virales.

Más particularmente, la invención se refiere a un nuevo biomarcador útil como un marcador diagnóstico para infecciones virales. Las infecciones virales más particularmente consideradas son infecciones virales que requieren empalme de ARN, y en particular infecciones retrovirales tales como afecciones relacionadas con VIH y sida. La invención también se refiere a un marcador de seguimiento para tratamientos de dichas infecciones, y en particular afecciones relacionadas con VIH y sida.

En eucariotas superiores, los ARNs mensajeros no se transcriben directamente en su forma funcional, sino como pre-ARNs mensajeros que tienen que pasar a través de muchos episodios de procesamiento para que sean legibles por la maquinaria de traducción celular. El empalme es el proceso que permite eliminar las secuencias no deseadas (intrones) y ligarse a las significativas (exones). El episodio de empalme altamente coordinado tiene lugar en un complejo grande llamado el espliceosoma. La formación de este megacomplejo funcional es un ensamblaje orquestado de proteínas y ARN que requiere la identificación de los límites exón-intrón. Los exones se empalman alternativamente de forma regular, lo que significa que bien están incluidos o bien están excluidos del transcrito de ARNm maduro final. Un reciente estudio de secuenciación exhaustivo observó que más de 90% de los genes sufren empalme alternativo. La producción de ARNms empalmados alternativamente está regulada por un sistema de proteínas de acción trans que se unen a sitios de acción cis sobre el propio pre-ARNm. Estas proteínas incluyen activadores del empalme que promueven la utilización de un sitio de empalme particular, y represores del empalme que reducen la utilización en un sitio particular, unión sobre sitios mejoradores del empalme (mejoradores del empalme intrónicos, ISE y mejoradores del empalme exónicos, ESE) y sobre sitios silenciadores del empalme (silenciadores del empalme intrónicos, ISS y silenciadores del empalme exónicos, ISS), respectivamente.

Los virus, en particular de la familia retroviral, son una de las principales causas de enfermedades en el mundo. Se pueden distinguir tres subfamilias dentro de la familia retroviral: los oncovirus, los lentivirus y los espumavirus.

Los oncovirus se denominan así debido a que se pueden asociar con cánceres e infecciones malignas. Se pueden mencionar, por ejemplo, virus leucemogénicos (tales como virus de leucemia aviaria (ALV), el virus de leucemia murina (MULV), también llamado virus de Moloney, el virus de leucemia felina (FELV), virus de leucemia humana tales como HTLV1 y HTLV2, el virus de leucemia símica o STLV, el virus de leucemia bovina o BLV, los oncovirus de tipo D de primate, los oncovirus de tipo B que son inductores de tumores de mamífero, u oncovirus que provocan un cáncer rápido (tal como el virus del sarcoma de Rous o RSV).

Los espumavirus manifiestan una especificidad bastante baja para un tipo de célula dado o una especie dada, y a veces se asocian con fenómenos inmunosupresores; que es el caso, por ejemplo, para el virus espumoso símico (SFV).

Los lentivirus, tales como VIH, se denominan así debido a que son responsables de afecciones patológicas que progresan lentamente que implican muy frecuentemente fenómenos inmunosupresores, incluyendo el sida.

Se sabe que los virus, y en particular retrovirus tales como VIH, se basan en el empalme y la regulación del empalme de ARN a fin de extenderse y diseminarse dentro de células y tejidos de un individuo infectado.

Recientemente, el hecho de que el VIH sea un retrovirus que requiere empalme de ARN para expresar proteínas virales clave se ha explotado para desarrollar una nueva estrategia basada en la inhibición del empalme para combatir infecciones virales, y en particular sida (documento WO 2010/143169). En efecto, el genoma del VIH-1 expresa un transcrito primario de 9 kb y no solo sirve como un ARN genómico para virus descendiente, sino que también genera 40 ARNms diferentes. El VIH-1 usa cuatro sitios de empalme 5' alternativos múltiples y ocho sitios de empalme 3' alternativos múltiples para generar especies de ARNm empalmadas. Estos ARNms empalmados se pueden dividir en dos clases: ARNs múltiplemente empalmados (2 kb) e individualmente empalmados (4 kb). La regulación del empalme alternativo de VIH-1 se produce principalmente debido a la presencia de sitios de empalme insuficientes que disminuyen el reconocimiento por la maquinaria de empalme celular de las señales de empalme. El empalme en los sitios de empalme virales se regula adicionalmente mediante la presencia de ESEs, ESSs e ISSs.

En este contexto, se han desarrollado derivados de quinolina, en particular 8-cloro-N-[4-(trifluorometoxi)fenil]quinolin-2-amina, que se ha mostrado que inhibe la replicación en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de cepas de laboratorio trópicas para células T de VIH-1 y VIH-2 así como aislados clínicos de diferentes subtipos a un intervalo de concentraciones de nM (documento WO 2010/143169).

Los microARNs (miARN), el grupo no codificante más exhaustivo, son una clase de ARNs no codificantes de aproximadamente 22 nt que inhiben la expresión génica a través de la unión a la región no traducida (UTR) de transcritos de ARNm diana (Lai y cols., Nature Genetics, vol. 30, no. 4, pp. 363-364, 2002; Bartel y cols., Cell, vol.

136, no. 2, pp. 215-233, 2009). Los genes de miARN representan aproximadamente 1-2% de los genomas eucarióticos conocidos. Las predicciones sugieren que cada miARN puede elegir como diana más de 200 transcritos y que un solo ARNm se puede regular mediante múltiples miARNs (LINDOW, *DNA Cell Biol.*, vol. 26(5), p. 339-351, 2007). Los miARNs se generan a partir de transcritos con conformación de horquilla endógenos y actúan mediante apareamiento de bases con ARNm diana, lo que conduce a la escisión de ARNm o la represión de la traducción, dependiendo del grado de apareamiento de bases. Dos episodios de procesamiento conducen a formación de miARN maduro: el primer lugar, los transcritos de miARN nacientes (pri-miARN) se procesan en precursores de 70 nucleótidos (pre-miARN) que son exportados del núcleo y son escindidos en el citoplasma para generar miARNs maduros cortos (aproximadamente 22 nucleótidos de longitud) (LEE, *EMBO J.*, vol. 21, p; 4663-4670, 2002). Los miARNs pueden estar situados inter- o intragénicamente. Cuando son intergénicos, su expresión se coordina con otros miARNs como un aglomerado (Altuvia y cols., *Nucleic Acids Research*, vol. 33, nº 8, pp. 2697-2706, 2005, Ozsolak y cols., *Genes and Development*, vol. 22, nº 22, pp. 3172-3183, 2008). Cuando son intragénicos, a saber, están situados dentro de un gen codificante de proteína (casi exclusivamente en intrones), a menudo se expresan a partir de la misma cepa que su gen hospedador (Liu y cols., *Cell Research*, vol. 18, nº 10, pp. 985-996, 2008, Kim y cols., *EMBO Journal*, vol. 26, nº 3, pp. 775-783, 2007) y a niveles correlacionados (Baskerville y cols., *RNA*, vol. 11, no. 3, pp. 241-247, 2005).

Los miARNs se han relacionado recientemente con el intrincado diálogo entre el hospedador y el patógeno en infecciones virales y se cree que representa un papel importante en la patogénesis viral (NAIR, *Trends in Microbiol.*, vol. 14, p. 169-175, 2006). En efecto, los virus son parásitos intracelulares estrictos que usan la maquinaria celular para su supervivencia y replicación, de modo que esta dependencia los hace sensibles a los mecanismos reguladores de genes hospedadores. El miARN celular puede tomar parte en un mecanismo de defensa antiviral, pero, en algunos casos, también pueden ser reguladores positivos virales. Por otra parte, los propios virus también pueden producir miARNs para regular procesos celulares o genes virales. Los miARNs implicados en la infección por VIH-1 se podrían definir como codificados por VIH-1 o codificados por el hospedador según su fuente de biogénesis; también se podrían definir como supresores o activadores de infección según su función. También se pueden dividir adicionalmente según si eligen como diana directamente transcritos de VIH-1 o afectan indirectamente al VIH-1 al elegir como diana factores del hospedador que están implicados en el ciclo vital del virus, o elegir como diana tanto el genoma de ARN de VIH-1 como factores del hospedador esenciales para la infección por VIH-1. Varios datos atestiguan que la infección por VIH-1 afecta a rutas de miARN globalmente debido a la perturbación de la biogénesis de miARN pero también individualmente mediante la modificación de los perfiles de expresión de miARN (Houzet y cols., *Biochim Biophys Acta*. nov-dic 2011; 1809(11-12): 686-693). Por otra parte, se ha descrito que los miARNs del hospedador regulan el VIH-1.

Un factor clave para el éxito del desarrollo de un fármaco o una vacuna dados es la posibilidad de valorar eficazmente y rápidamente su eficacia. En efecto, es importante para un fármaco o una vacuna dados que se administren en su intervalo terapéutico a fin de evitar efectos no deseados resultantes de una dosificación demasiado alta o evitar una falta de eficacia debida a una dosificación demasiado baja. Además, se tiene que asegurar que el fármaco o la vacuna apropiados se administren al paciente apropiado, y que este paciente sea en efecto sensible al fármaco o la vacuna. Por lo tanto, simplemente conectar un paciente dado y un fármaco o una vacuna dados no siempre es suficiente para obtener un efecto terapéutico beneficioso. Por lo tanto, es crítico tener herramientas apropiadas, tales como biomarcadores específicos, en las que basarse para valorar la eficacia de un fármaco o una vacuna.

Por lo tanto, existe una necesidad de una herramienta nueva y sensible para valorar una infección viral, y en particular una infección retroviral, y más particularmente una infección por VIH (virus de inmunodeficiencia humana), así como la eficacia de un tratamiento de estas afecciones.

Existe una necesidad de un nuevo biomarcador para valorar la eficacia de un tratamiento de una infección viral, y en particular una infección retroviral, y más particularmente una infección por VIH.

Existe una necesidad de una herramienta nueva y sensible para valorar la eficacia de derivados de quinolina que son inhibidores de virus, en particular retrovirus tales como VIH, y más particularmente VIH-1 y VIH-2.

Existe una necesidad de un nuevo biomarcador para valorar la sensibilidad de un paciente a derivados de quinolina para prevenir o tratar una infección viral, y en particular una infección retroviral, y más particularmente una infección por VIH.

Existe una necesidad de un nuevo biomarcador para valorar la eficacia terapéutica de derivados de quinolina para prevenir o tratar una infección viral, y en particular una infección retroviral, y más particularmente una infección por VIH.

También existe una necesidad de un nuevo biomarcador para cribar candidatos a fármaco o una vacuna eficaces para prevenir y/o tratar una infección viral, y en particular una infección retroviral, y más particularmente una infección por VIH.

La presente invención tiene el propósito de cumplir estas necesidades.

Según uno de sus objetivos, la invención trata de un uso *in vitro* o *ex vivo* de al menos un miARN, siendo dicho al menos un miARN miR-124, como un biomarcador de una infección viral, o de una eficacia de un tratamiento terapéutico de dicha infección viral.

Inesperadamente, los inventores han observado, según se detalla en los ejemplos posteriores, que, en PBMCs infectadas con una cepa de VIH, en particular con una cepa de VIH ADA-M R5, el nivel de expresión de miR-124 se disminuía con relación a PBMCs no infectadas.

Es más, los inventores han observado inesperadamente que un tratamiento con derivados de quinolina, tales como derivados de quinolina de fórmula (I) o (II), y en particular con la 8-cloro-N-[4-(trifluorometoxi)fenil]quinolin-2-amina, de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) infectadas con una cepa de VIH, en particular con el VIH ADA-M R5, daba como resultado la retirada de los virus y un incremento drástico (13 veces con relación al control) de expresión de miR-124. Los derivados de quinolina se pueden elegir entre los compuestos descritos en el documento WO 2010/143169 y según se describe adicionalmente posteriormente. Según esto, un tratamiento terapéutico de dicha infección viral puede ser un tratamiento con derivados de quinolina.

Según esto, el miR-124 se revelaba como una potente herramienta, dicho de otro modo como un biomarcador, para comprobar una infección viral, en particular una infección retroviral, tal como una infección por VIH, en particular en individuos que sufren esta infección, así como para comprobar individuos infectados con un virus, en particular un retrovirus, tal como una infección con VIH, y para comprobar estos individuos tratados con un fármaco antiviral, en particular con derivados de quinolina de fórmula (I) o (II) como los detallados posteriormente, y en particular con 8-cloro-N-[4-(trifluorometoxi)fenil]quinolin-2-amina.

Así, al comprobar el nivel de expresión de miR-124, es posible rastrear o realizar un control de calidad en estudios de investigación de seres humanos o comprobar el cumplimiento terapéutico del paciente con un régimen farmacológico o una vacuna al proporcionar medios para confirmar que el paciente está recibiendo los tratamientos con fármaco o vacuna apropiados, es decir, en cuanto a la dosis y el tiempo. El biomarcador miR-124 también se puede usar para optimizar regímenes de dosificación. Así, el biomarcador miR-124 se puede usar en relación con, por ejemplo, el manejo del tratamiento de un paciente, estudios clínicos e investigación basada en células.

Según otro de sus objetivos, la invención trata de un uso *in vitro* o *ex vivo* de al menos un miARN, siendo dicho al menos un miARN miR-124, como un biomarcador de una infección viral, preferiblemente con un retrovirus, y más preferiblemente con un virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

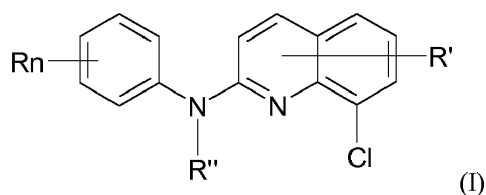
Según otro de sus objetivos, la invención trata de un uso *in vitro* o *ex vivo* de al menos un miARN, siendo dicho al menos un miARN miR-124, como un biomarcador para cribar un candidato a fármaco o un candidato a vacuna que se presume eficaz para prevenir y/o tratar una infección viral, en particular una infección retroviral, y más particularmente una infección por VIH.

En particular, la eficacia de un tratamiento terapéutico de dicha infección viral se determina al valorar el efecto biológico de un posible compuesto, en particular el potencial farmacológico, de un posible compuesto, para alterar la actividad fisiológica de una célula o una proteína.

A este respecto, se ha mostrado en la presente que el nivel de expresión de miR-124 varía al administrar diversos compuestos que se sabe que poseen una actividad farmacológica. Así, los inventores han mostrado que miR-124 consiste en un biomarcador pertinente de la actividad farmacológica potencial de un posible compuesto.

En particular, el candidato a fármaco o el candidato a vacuna que se presume eficaz para prevenir y/o tratar una infección viral puede ser un derivado de quinolina.

En particular, el candidato a fármaco o el candidato a vacuna que se presume eficaz para prevenir y/o tratar una infección viral puede ser un derivado de quinolina de fórmula (I):



en la que

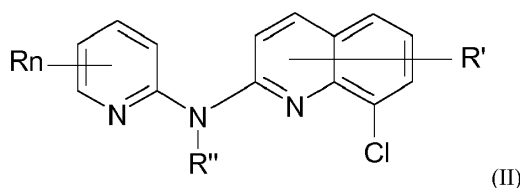
- n es 1 o 2 y R, independientemente, representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo elegido entre un grupo alquilo (C₁-C₃); un grupo -NR₁R₂ en el que R₁ y R₂ son independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₃); un grupo fluoroalcoxi (C₁-C₃); un grupo -NO₂; un grupo fenoxi; y un grupo alcoxi (C₁-C₄),

5 - R' es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo elegido entre un grupo alquilo (C₁-C₄) y un grupo alcoxi (C₁-C₄),

- R'' es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₄),

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

10 El candidato a fármaco o el candidato a vacuna que se presume eficaz para prevenir y/o tratar una infección viral también puede ser un derivado de quinolina de fórmula (II):



15 en la que:

- n es 1 o 2 y R, independientemente, representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo elegido entre un grupo alquilo (C₁-C₃); un grupo -CN; un grupo hidroxilo; un grupo -COOR₁; un grupo fluoroalquilo (C₁-C₃); un grupo -NO₂; un grupo -NR₁R₂, siendo R₁ y R₂ un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₃); y un grupo alcoxi (C₁-C₄),

20 - R' es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo elegido entre un grupo alquilo (C₁-C₄) y un grupo alcoxi (C₁-C₄),

- R'' es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₄),

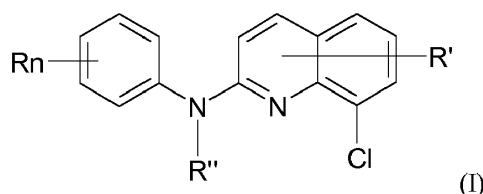
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

25 Dentro de la invención, el término "prevenir" pretende significar reducir la probabilidad de presencia de un episodio dado, a saber, en el contexto de la invención, una infección viral.

Según otro de sus objetivos, la invención trata de un uso *in vitro* o *ex vivo* de al menos un miARN, siendo dicho al menos un miARN miR-124, como un biomarcador de una actividad de un derivado de quinolina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en una infección viral, en particular una infección retroviral, y más particularmente una infección por VIH.

Según otro de sus objetivos, la invención trata de un uso *in vitro* o *ex vivo* de al menos un miARN, siendo dicho al menos un miARN miR-124, como un biomarcador de una actividad de un derivado de quinolina de fórmula (I):

35



en la que

40 - n es 1 o 2 y R, independientemente, representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo elegido entre un grupo alquilo (C₁-C₃); un grupo -NR₁R₂ en el que R₁ y R₂ son independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₃); un grupo trifluoroalcoxi (C₁-C₃); un grupo -NO₂; un grupo fenoxi; y un grupo alcoxi (C₁-C₄),

- R' es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo elegido entre un grupo alquilo (C₁-C₄) y un grupo alcoxi (C₁-C₄),

- R'' es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₄),

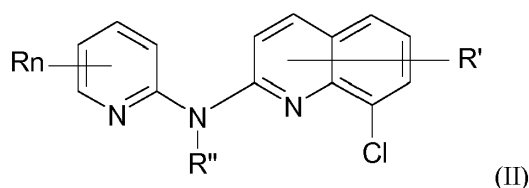
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables,

5

en una infección viral, y en particular una infección retroviral, y más particularmente una infección por VIH.

Según otro de sus objetivos, la invención trata del uso *in vitro* o *ex vivo* de al menos un miARN, siendo dicho al menos un miARN miR-124, como un biomarcador de una actividad de un derivado de quinolina de fórmula (II):

10



en la que

15

- n es 1 o 2 y R, independientemente, representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo elegido entre un grupo alquilo (C₁-C₃); un grupo -CN; un grupo hidroxilo; un grupo -COOR₁; un grupo fluoroalquilo (C₁-C₃); un grupo -NO₂; un grupo -NR₁R₂, siendo R₁ y R₂ un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₃); y un grupo alcoxi (C₁-C₄),

- R' es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo elegido entre un grupo alquilo (C₁-C₄) y un grupo alcoxi (C₁-C₄),

20

- R'' es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₄),

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables,

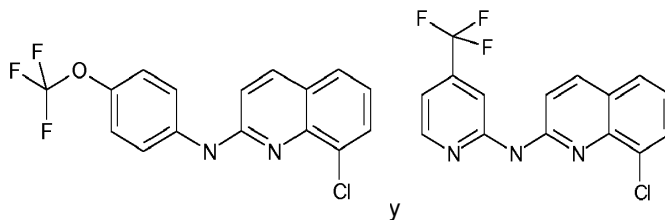
en una infección viral, en particular una infección retroviral, y más particularmente una infección por VIH.

25

Según una realización particular, un derivado de quinolina puede ser 8-cloro-N-[4-(trifluorometoxi)fenil]quinolin-2-amina u 8-cloro-N-[4-(trifluorometil)piridin-2-il]quinolin-2-amina.

Así, según otro de sus objetivos, la invención trata de un uso *in vitro* o *ex vivo* de al menos un miARN, siendo dicho al menos un miARN miR-124, como un biomarcador de una actividad de un derivado de quinolina seleccionado de:

30



Dentro de la invención, las expresiones "infección viral" e "infección con un virus" se refieren a cualquier infección viral, y en particular a cualquier infección retroviral, que se pueda producir en una célula, un tejido, un órgano o un individuo propenso a expresar un biomarcador de la invención. Preferiblemente, una infección viral retroviral puede ser una infección lentiviral, y más preferiblemente una infección por VIH. Un individuo dentro de la invención puede ser un mamífero, y preferiblemente un ser humano propenso a expresar un biomarcador de la invención. Dentro de la invención, individuo y paciente se usan intercambiamente.

35

Dentro de la invención, el término "virus" se refiere a cualquier virus, en particular un retrovirus y preferiblemente un lentivirus tal como un virus VIH, más preferiblemente VIH-1 o VIH-2.

40

Según otro de sus objetivos, la invención trata de un método *in vitro* o *ex vivo* para valorar una infección viral, y en particular una infección retroviral, y más particularmente una infección por VIH, en un paciente que se presume que está infectado con un virus, que comprende al menos dos etapas de:

- 5 a- medir una presencia o un nivel de expresión de al menos un miARN, siendo dicho al menos un miARN miR-124, en una muestra biológica previamente obtenida de dicho paciente; y
- b- comparar dicha presencia o nivel de expresión con un valor de referencia de control,

en donde una presencia o nivel de expresión modulados de dicho miARN con relación a dicho valor de referencia de control es indicativo de una infección viral.

- 10 Según otro de sus objetivos, la invención trata de un método *in vitro* o *ex vivo* para valorar una actividad de un derivado de quinolina de fórmula (I) para prevenir y/o tratar una infección viral, en particular una infección retroviral, y más particularmente una infección por VIH, en un paciente tratado con dicho derivado de quinolina, que comprende al menos las etapas de:

- 15 a- medir una presencia o un nivel de expresión de al menos un miARN, siendo dicho al menos un miARN miR-124, en una primera muestra biológica previamente obtenida de dicho paciente antes de administrar dicho derivado de quinolina y en una segunda muestra biológica previamente obtenida de dicho paciente después de administrar dicho derivado de quinolina; y
- b- determinar si dicha presencia o nivel de expresión está modulada en la segunda muestra biológica obtenida después del tratamiento en comparación con la segunda muestra biológica obtenida antes del tratamiento;

- 20 en donde una presencia o nivel de expresión modulados de dicho miARN es indicativo de una actividad de dicho derivado de quinolina.

"Muestra biológica", según se usa en la presente, se refiere generalmente a una muestra obtenida de un sujeto biológico, incluyendo una muestra de origen de tejido o fluido biológico, obtenida, alcanzada o recogida *in vivo* o *in situ*. Estas muestras pueden ser, pero no se limitan a, órganos, tejidos, fracciones y células aislados de un mamífero. Muestras biológicas ejemplares incluyen pero no se limitan a lisado celular, un cultivo celular, una línea celular, un tejido, tejido oral, tejido gastrointestinal, un órgano, un orgánulo, un fluido biológico, una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de orina, una muestra de piel, y similares. Muestras biológicas preferidas incluyen, pero no se limitan a, una sangre, un plasma, un suero, una PBMC, una biopsia tisular, una mucosa oral, una saliva, un fluido intersticial o una muestra de orina, y similares.

En una realización, una muestra biológica adecuada para la invención se puede seleccionar en un grupo que consiste en una muestra de tejido biológico, una muestra de sangre entera, una muestra de frotis, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de saliva, una muestra de fluido vaginal, una muestra de esperma, una muestra de fluido faríngeo, una muestra de fluido bronquial, una muestra de fluido fecal, una muestra de fluido cerebroespinal, una muestra de fluido lagrimal y una muestra de sobrenadante de cultivo tisular.

La divulgación se refiere además a una muestra biológica aislada que comprende un biomarcador, en donde dicha muestra biológica se selecciona en un grupo que comprende y preferiblemente consiste en una muestra de tejido, sangre entera, una muestra de frotis, plasma, suero, saliva, fluido vaginal, esperma, fluido faríngeo, fluido bronquial, fluido fecal, fluido cerebroespinal, fluido lagrimal y sobrenadante de cultivo tisular; en donde dicho biomarcador es un biomarcador de miARN, y preferiblemente miR-124.

- 45 Según otro de sus objetivos, la invención trata de un método *in vitro* o *ex vivo* para valorar el efecto biológico de un posible compuesto y en particular para cribar un candidato a fármaco o un candidato a vacuna, que se presume eficaz para prevenir y/o tratar una infección viral, y en particular una infección retroviral, y más particularmente una infección por VIH, que comprende al menos las etapas de:

- 50 a- tratar al menos una célula aislada capaz de expresar al menos un miARN, siendo dicho al menos un miARN miR-124, con dicho candidato, estando dicha célula bajo condiciones adecuadas para expresar dicho al menos un miARN,
- b- medir una presencia o nivel de expresión de dicho al menos un miARN,
- c- comparar dicha presencia o nivel de expresión medidos con una medida o nivel de expresión de dicho al menos un miARN en una célula aislada no tratada,

en donde una presencia o nivel de expresión modulados de dicho miARN es indicativo de un efecto biológico de un posible compuesto y en particular de la eficacia de dicho candidato a fármaco o candidato a vacuna en una infección viral.

5 Dentro de la invención, los términos "modulación" o "presencia o nivel de expresión modulados" pretenden significar que la presencia o el nivel de expresión de un biomarcador de la invención bien es inducida o incrementada, o bien alternativamente es suprimida o disminuida.

10 Así, resulta de los resultados experimentales contenidos en la presente que miR-124, y notablemente el nivel de expresión de miR-124, consiste en un biomarcador pertinente que es indicativo de un cambio fisiológico de una proteína o una célula, incluyendo un cambio metabólico de una célula, cambio que materializa un efecto farmacológico beneficioso.

15 A continuación, según se indica previamente, la divulgación también trata del uso *in vitro* o *ex vivo* de al menos un miARN, siendo dicho al menos un miARN miARN-124, para valorar el efecto biológico, en particular el efecto farmacológico, de un posible compuesto.

20 Esta divulgación también se refiere al uso *in vitro* o *ex vivo* de al menos un miARN, siendo dicho al menos un miARN miARN-124, para valorar la capacidad de un posible compuesto para alterar la actividad fisiológica de una proteína o una célula.

25 La alteración de la actividad fisiológica de una proteína o una célula puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica mediante la identificación de cualquier cambio detectable en la medida de un parámetro fisiológico de una célula, incluyendo en la medida de un parámetro metabólico de una célula, que abarca cambios electrofisiológicos, cambios en la permeabilidad de la membrana celular, cambios en la actividad enzimática, cambios en la expresión de proteínas, cambios en la expresión de miARN, cambios en la expresión génica, valores del pH intracelular, etc.

30 Los términos "determinar", "medir", "evaluar", "valorar" y "ensayar", según se usan en la presente, se refieren generalmente a cualquier forma de medida, e incluyen determinar si un elemento está presente o no. Estos términos incluyen determinaciones cuantitativas y/o cualitativas. La valoración puede ser relativa o absoluta. La expresión "valorar la presencia de" puede incluir determinar la cantidad de algo presente, así como determinar si está presente o ausente.

35 Según una realización preferida, cuando se valora una infección viral, una observación de una presencia reducida o suprimida, o un nivel de expresión disminuido, de dicho miARN con relación al valor de referencia de control puede ser indicativa de una infección viral.

40 Según una realización preferida, cuando se valora una actividad de un derivado de quinolina de fórmula (I) con respecto al tratamiento de una infección viral o cuando se criba un candidato a fármaco o candidato a vacuna que se presume eficaz para prevenir y/o tratar una infección viral, una observación de una presencia inducida o incrementada, o un nivel de expresión incrementado, de dicho miARN con relación a un valor de referencia de control puede ser indicativa de una actividad de dicho derivado de quinolina de fórmula (I) o de una eficacia de dicho candidato a fármaco o candidato a vacuna.

45 Los usos y métodos de la invención se llevan a cabo *in vitro* o *ex vivo*.

50 Según otro de sus objetivos, la invención se refiere a un uso *in vitro* o *ex vivo* de una sonda de ácido nucleico aislada capaz de hibridarse específicamente a miR-124, como un agente diagnóstico para medir una presencia de una expresión de nivel de miR-124 para diagnosticar una infección viral, en particular una infección retroviral, y más particularmente una infección por VIH, o para valorar una actividad de un candidato a fármaco o candidato a vacuna que se presume eficaz para prevenir y/o tratar una infección viral, en particular una infección retroviral, y más particularmente una infección por VIH.

55 El término "sonda", según se usa en la presente, se refiere generalmente a un agente de captura que se dirige a una secuencia biomarcadora de miARN diana específico. Según esto, cada sonda de un grupo de sondas tiene un biomarcador de miARN diana respectivo. Un dúplex de sonda/miARN diana es una estructura formada al hibridar una sonda a su biomarcador de miARN diana.

60 Una sonda de ácido nucleico aislada adecuada para la invención puede ser preferiblemente una sonda de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 a SEQ ID NO: 87.

65 Según una de sus ventajas, la invención proporciona un biomarcador útil y fiable para el seguimiento de pacientes infectados con un virus, preferiblemente con un retrovirus, y más preferiblemente con un virus VIH.

Según una de sus ventajas, la invención proporciona un biomarcador útil y fiable para el seguimiento de pacientes infectados con un virus, preferiblemente con un retrovirus, y más preferiblemente con un virus VIH, y tratados con un derivado de quinolina de fórmula (I).

- 5 Según otra de sus ventajas, la invención proporciona un biomarcador sensible y dependiente que se puede usar fácilmente en la cama de un paciente.

Usos y métodos

- 10 Según una realización, el uso y los métodos según la invención pueden permitir, en particular, la determinación de una infección viral en un paciente, y en particular para el seguimiento de esta infección.

Según una realización, una presencia o un nivel de expresión de miR-124 se mide en una muestra biológica aislada, y a continuación se compara con un valor de referencia de control.

- 15 Una modulación de la presencia o el nivel de expresión de miR-124 con relación al valor de referencia de control puede ser indicativa de una infección viral. En particular, una presencia reducida o suprimida, o un nivel de expresión disminuido, de dicho miARN con relación a un valor de referencia de control puede ser indicativo de una infección viral. En particular, una presencia reducida o suprimida, o un nivel de expresión disminuido, de dicho miARN con relación a un valor de referencia de control puede ser indicativo de una infección viral.
- 20

Según otra realización, los usos y métodos de la invención pueden ser para valorar una eficacia de un tratamiento con dicho derivado de quinolina de fórmula (I).

- 25 Según otra realización, los usos y métodos de la invención pueden ser para valorar una eficacia terapéutica de derivados de quinolina de fórmula (I) como un agente terapéutico para prevenir y/o tratar una infección viral.

Según una realización, los usos y métodos de la invención pueden ser para valorar un cumplimiento terapéutico del paciente con un tratamiento con dicho derivado de quinolina de fórmula (I).

- 30 El biomarcador miR-124 se puede usar para comprobar o manejar la actividad de derivados de quinolina de fórmula (I) durante el tratamiento en el paciente de una infección viral, y en particular una infección retroviral, y más particularmente una infección por VIH o sida (síndrome de inmunodeficiencia adquirida).

- 35 Un método para valorar o comprobar la actividad de un derivado de quinolina de fórmula (I) en un paciente tratado con el derivado de quinolina puede implicar medir un nivel de expresión de miR-124 en una muestra aislada, preferiblemente PBMC (célula mononuclear de sangre periférica) aislada y comparar el nivel medido de expresión con un nivel de expresión de miR-124 en una muestra aislada tomada del paciente antes del tratamiento. Al seguir el nivel de miR-124, la actividad del derivado de quinolina se puede comprobar a lo largo del tiempo.
- 40

- Según una realización, un uso o un método según la invención se puede poner en práctica para optimizar el régimen de dosificación de un paciente. Los pacientes pueden responder de forma diferente a un derivado de quinolina de fórmula (I) dado, dependiendo de factores tales como la edad, la salud, los antecedentes genéticos, la presencia de otras complicaciones, la progresión de la enfermedad y la coadministración de otros fármacos. Puede ser útil utilizar el biomarcador miR-124 para valorar y optimizar el régimen de dosificación, tal como la cantidad de dosis y/o el esquema de la dosis, de un derivado de quinolina en un paciente. A este respecto, un biomarcador basado en miR-124 también se puede usar para rastrear y ajustar la eficacia del tratamiento de un paciente individual a lo largo del tiempo. El biomarcador se puede usar para reunir información necesaria para hacer ajustes en el tratamiento de un paciente, incrementando o disminuyendo la dosis de un agente según sea necesario. Por ejemplo, un paciente que recibe un derivado de quinolina se puede probar usando el biomarcador basado en miR-124 para observar si la dosificación se está haciendo eficaz, o si se necesita plantear en su lugar un tratamiento más agresivo. La cantidad de fármaco administrado, la cronología de la administración, la frecuencia de la administración, la duración de la administración se pueden ajustar a continuación dependiendo de la medida del biomarcador miR-124.
- 45
- 50

- 55 El biomarcador miR-124 también se puede usar para rastrear el cumplimiento terapéutico del paciente durante regímenes de tratamiento individuales o durante estudios clínicos. Esto puede seguirse a intervalos fijados para asegurar que los pacientes incluidos en el estudio estén tomando los fármacos según las instrucciones. Por otra parte, un paciente que recibe un derivado de quinolina se puede probar usando el biomarcador miR-124 para determinar si el paciente cumple el régimen de dosificación del plan de tratamiento. Un incremento del nivel de expresión del biomarcador en comparación con el de una muestra de control no tratada es indicativo de cumplimiento terapéutico con el protocolo.
- 60

- Un biomarcador de la invención se puede poner en práctica para valorar y seguir la eficacia de derivados de quinolina de fórmula (I). Según esto, una presencia o nivel de expresión de miR-124 se puede medir en una muestra biológica aislada obtenida de un paciente previamente tratado con un derivado de quinolina de fórmula (I). A
- 65

continuación, la presencia o la expresión de nivel de miR-124 en una muestra biológica aislada se puede comparar con un valor de referencia de control.

5 Cuando se observa un incremento en el nivel medido con relación al valor de referencia de control, entonces la medida es indicativa de una actividad de dichos derivados de quinolina de fórmula (I).

10 En otra realización, cuando se observa un incremento del nivel medido con relación al valor de referencia de control, entonces la medida puede ser indicativa de una sensibilidad de un paciente a un tratamiento con dichos derivados de quinolina de fórmula (I).

15 En otra realización, cuando se observa un incremento del nivel medido con relación al valor de referencia de control, entonces la medida puede ser indicativa de una eficacia de un tratamiento con dichos derivados de quinolina de fórmula (I).

15 En otra realización, cuando se observa un incremento del nivel medido con relación al valor de referencia de control, entonces la medida puede ser indicativa de una eficacia terapéutica de dichos derivados de quinolina de fórmula (I) como un agente terapéutico para prevenir y/o tratar una infección viral.

20 Cuando miR-124 procedente de una muestra se "incrementa" o "regula al alza" después de un tratamiento con un derivado de quinolina, en comparación con un valor de referencia de control no tratado, este incremento puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 90%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1.000%, 5.000% o más del valor de referencia de control comparativo (es decir, sin el tratamiento mediante el derivado de quinolina).

25 En particular, la expresión de nivel medida de miR-124 puede ser un incremento de al menos dos veces, preferiblemente al menos cuatro veces, preferiblemente al menos seis veces, preferiblemente al menos ocho veces, y más preferiblemente al menos diez veces con relación a dicho valor de referencia de control.

30 Según otra realización de la invención, cuando se comprueba una infección viral o se valora una eficacia de un tratamiento de una infección viral, en particular con un derivado de quinolina de fórmula (I), un paciente se puede probar con un método o un uso de la invención a un intervalo de tiempo seleccionado del grupo que consiste en cada hora, dos veces al día, diariamente, dos veces a la semana, semanalmente, dos veces al mes, mensualmente, dos veces al año, anualmente y cada dos años. La muestra entonces recogida se puede probar inmediatamente, o se puede almacenar para una prueba posterior.

35 Según otra realización, el uso y los métodos según la invención pueden permitir, en particular, el cribado, la identificación o la evaluación de agentes activos potenciales como un candidato a fármaco.

40 En particular, el uso y los métodos según la invención son particularmente ventajosos para el cribado, la identificación o la evaluación de agentes activos potenciales, tales como un candidato a fármaco o una vacuna que se presume eficaz hacia una infección viral.

45 Según otra realización de la invención, un biomarcador miR-124 se puede poner en práctica para cribar un candidato a fármaco o un candidato a vacuna que se presume eficaz para prevenir y/o tratar una infección viral. En esta realización, una presencia o nivel de expresión de miR-124 se puede medir en una muestra biológica aislada o célula aislada previamente puesta en contacto con el fármaco o la vacuna que se va a cribar. A continuación, la muestra obtenida se puede comparar con un valor de referencia de control.

50 Cuando se observa un incremento del nivel medido en una muestra biológica aislada o célula aislada, previamente puesta en contacto con el candidato a compuesto, fármaco o vacuna que se va a cribar, con relación a un valor de referencia de control, entonces la medida puede ser indicativa de que dicho candidato tiene un efecto biológico y en particular es eficaz para alterar la actividad biológica de una célula.

55 En particular, un candidato a fármaco o candidato a vacuna se puede caracterizar como eficaz para prevenir y/o tratar una infección viral, y en particular una infección retroviral, y más particularmente una infección por VIH.

60 Cuando miR-124 procedente de una muestra se "incrementa" o "regula al alza" después del tratamiento con un candidato a fármaco o una vacuna, en comparación con un valor de referencia de control no tratado, este incremento puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 90%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1.000%, 5.000% o más del valor de referencia de control comparativo (es decir, sin el tratamiento mediante el derivado de quinolina).

65 En particular, la expresión de nivel medida de miR-124 puede ser un incremento de al menos dos veces, preferiblemente al menos cuatro veces, preferiblemente al menos seis veces, preferiblemente al menos ocho veces, y más preferiblemente al menos diez veces con relación a dicho valor de referencia de control.

Los usos y métodos de la invención pueden comprender medir un nivel de expresión de miR-124 en una muestra biológica aislada. Cualquier muestra adecuada se puede usar para valorar el biomarcador miR-124.

5 En particular, una muestra biológica adecuada para la invención puede ser un fluido biológico, tal como una muestra de sangre, plasma o suero, saliva, fluido intersticial u orina; una muestra celular, tal como una muestra de cultivo celular, línea celular o PBMC, una biopsia tisular, tal como una muestra de tejido oral, tejido gastrointestinal, piel, mucosa oral, o una pluralidad de muestras procedentes de un estudio clínico. La muestra puede ser una muestra en bruto o se puede purificar hasta diversos grados antes del almacenamiento, el procesamiento o la medida.

10 La etapa de recoger muestras biológicas para los usos y los métodos de la invención se realiza antes de llevar a cabo la invención y no es una etapa de un uso o un método según la invención.

15 Las muestras para la valoración de miARN se pueden tomar durante cualesquiera intervalos deseados. Por ejemplo, las muestras se pueden tomar cada hora, dos veces al día, diariamente, semanalmente, mensualmente, cada dos meses, anualmente o similares. La muestra se puede probar inmediatamente, o se puede almacenar para una prueba posterior.

20 Las muestras se pueden purificar antes de la prueba. En algunas realizaciones, el miR-124 se puede aislar del contenido restante de la célula antes de la prueba. Además, las moléculas de miR-124 se pueden separar del resto del ARNm de la muestra, si se desea. Por ejemplo, el miR-124 se puede separar del ARNm basándose en las diferencias de tamaño antes de la prueba.

25 El valor de referencia de control que se va a usar para comparar el nivel de expresión medido de miR-124 en una muestra biológica probada se obtiene a partir de una muestra de control.

30 Las muestras de control se pueden tomar de diversas fuentes. En algunas realizaciones, las muestras de control se toman del paciente antes del tratamiento o antes de la presencia de la enfermedad (tal como una muestra de sangre de archivo). En otras realizaciones, las muestras de control se toman de un grupo de miembros no enfermos normales de una población. En otra realización, un ensayo celular se puede realizar sobre un cultivo celular de control, por ejemplo, que no se ha tratado con el compuesto de prueba o se ha tratado con un compuesto de referencia, tal como la 8-cloro-N-[4-(trifluorometoxi)fenil]quinolin-2-amina.

35 Según una realización, para la determinación o la comprobación de una infección viral en un paciente, se puede obtener un valor de referencia de control de una muestra biológica aislada obtenida de un individuo o un grupo de individuos que se sabe que no sufren esta afección.

40 Según otra realización, para la determinación o la comprobación de una eficacia de un tratamiento de una infección viral en un paciente, se puede obtener un valor de referencia de control a partir de una muestra biológica aislada obtenida de un individuo o grupo de individuos que se sabe que no sufren esta afección, y que no reciben el tratamiento cuya eficacia se va a determinar o comprobar. Alternativamente, se puede obtener un valor de referencia de control a partir de una muestra biológica aislada obtenida de un paciente que sufre una infección viral y que recibe un tratamiento cuya eficacia se va a determinar o comprobar, tomándose la muestra biológica aislada del paciente antes de la administración del tratamiento.

45 Están disponibles numerosos métodos para el experto para medir una presencia o nivel de expresión del biomarcador miR-124.

50 Por ejemplo, se pueden usar ensayos o micromatrices de ácidos nucleicos para valorar la presencia y/o el nivel de expresión de miR-124 en una muestra.

55 La secuencia del miR-124 se puede usar para preparar un nucleótido correspondiente que actúe como sonda o cebador complementarios para ser usados en diferentes ensayos de ácidos nucleicos para detectar la expresión o la presencia del biomarcador miR-124 en la muestra, tales como, pero no limitados a, transferencias Northern y métodos basados en PCR (p. ej. PCR de transcripción inversa en tiempo real o qRT-PCR). Métodos tales como qRT-PCR se pueden usar para cuantificar exactamente la cantidad del miARN en una muestra.

60 Sondas o cebadores de sentido y antisentido según la invención se pueden obtener usando todos los procedimientos conocidos por el experto, en particular los que se describen en Sambrook y cols. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ED., 2001, Cold Spring Harbour, N. Y.).

65 Los métodos relacionados con la detección y la cuantificación de ARN o ADN son muy conocidos en la técnica. El experto en la técnica puede hacer referencia, por ejemplo, a Wang y cols. (1989, Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 86 : 917-921), de Wong y cols. (2005, Bio Techniques, Vol. 39 (1): 75-85), de Nolan y cols. (2006, Nat Protoc, Vol. 1(3) : 1559-1582) y de Klinck y cols. (2008, Cancer Research, Vol. 68 : 657-663), o también a una revisión general publicada por Bustin (2000, Journal of Molecular Endocrinology, Vol. 25 : 169-193).

En una realización, un método para la detección y la cuantificación de ácidos nucleicos puede ser un método basado en un colorante fluorescente, en el que la concentración de ácido nucleico se valora al medir la intensidad de fluorescencia de ligandos, tales como colorantes, que se unen a dichos ácidos nucleicos. Los colorantes fluorescentes son muy conocidos en la técnica.

5

Alternativamente, dicho ácido nucleico se puede cuantificar usando espectrofotometría.

En otra realización, un método para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos puede ser un método basado en hibridación. Dichos métodos basados en hibridación pueden incluir técnicas de PCR y PCR cuantitativa (qRT-PCR o q-PCR) o técnicas basadas en transcriptasa inversa/polimerasa. Ventajosamente, dicho método puede comprender, o combinarse adicionalmente con, una etapa de secuenciación.

10

Esos métodos pueden comprender (i) una etapa de extracción de ARNm celulares, (ii) una etapa de transcripción inversa de ARNm en ADN usando una transcriptasa inversa y (iii) una etapa de amplificación de ADN a partir de ADN obtenido en la etapa previa. Habitualmente, partiendo de la misma muestra, se amplifican los siguientes ácidos nucleicos: (a) ADN obtenido después de una etapa de transcripción inversa del ARNm diana y (b) un ADN o una pluralidad de ADNs obtenidos después de transcripción inversa de ARNm que están constitutivamente y constantemente expresados por células («genes constitutivos»), tales como ARNs codificados por los genes *MRPL19*, *PUM1* y *GADPH*.

15

20

El ADN amplificado se puede cuantificar, después de la separación mediante electroforesis y la medida de bandas de ADN. Los resultados referidos al ARNm o los ARNm diana se expresan como unidades relativas en comparación con ARNm codificados por genes « constitutivos ». En algunas realizaciones, la etapa de separación de ADNs amplificados se alcanza después de electroforesis en gel de agarosa, y a continuación coloración de bandas de ADN con bromuro de etidio, antes de la cuantificación del ADN contenido en esas bandas de migración con densitometría. En otras realizaciones, se puede usar un dispositivo de microcanales en el que ADN amplificado se separa mediante electroforesis capilar, antes de la cuantificación de la señal emitida usando un rayo láser. Este dispositivo puede ser un dispositivo LabChip®, por ejemplo de la serie « GX », comercializado por la compañía Caliper LifeSciences (Hopkinton, MA, EE. UU. de A.).

25

30

Los resultados cuantitativos obtenidos mediante qRT-PCR a veces pueden ser más informativos que los datos cualitativos, y pueden simplificar la estandarización y el manejo de la calidad del ensayo. Así, en algunas realizaciones, los ensayos basados en qRT-PCR pueden ser útiles para medir niveles de miARN durante ensayos basados en células. El método de qRT-PCR también puede ser útil para comprobar la terapia del paciente. Métodos basados en qRT-PCR disponibles comercialmente {p. ej., TaqmanR Array™}

35

Se puede usar cualquier plataforma de ensayo adecuada para determinar la expresión o la presencia del miARN en una muestra. Por ejemplo, un ensayo puede estar en la forma de una tira reactiva, una membrana, un chip, un disco, una tira de ensayo, un filtro, una microesfera, un portaobjetos, una placa de múltiples pocillos o una fibra óptica. Un sistema de ensayo puede tener un soporte sólido sobre el que se liga un oligonucleótido correspondiente al miARN. El soporte sólido puede comprender, por ejemplo, un plástico, silicio, un metal, una resina, vidrio, una membrana, una partícula, un precipitado, un gel, un polímero, una lámina, una esfera, un polisacárido, un capilar, una película, una placa o un portaobjetos. Los componentes del ensayo se pueden preparar y envasar conjuntamente como un estuche para detectar un miARN.

40

45

En algunas realizaciones, se puede preparar o adquirir una micromatriz de oligonucleótidos para probar la actividad de un derivado de quinolina o un candidato a fármaco en una muestra biológica. Una micromatriz contiene típicamente un soporte sólido y al menos un oligonucleótido que entra en contacto con el soporte, donde el oligonucleótido corresponde a al menos una porción del biomarcador miR-124. En algunas realizaciones, la porción del biomarcador miR-124 comprende al menos 5, 10, 15, 20 o más bases.

50

Según una realización, la presencia o la expresión de miR-124 se puede ensayar en combinación con otros miARN también usados como biomarcadores. En esta realización, se puede usar una micromatriz para valorar la expresión o la presencia de múltiples miARNs en una muestra, incluyendo miARN-124. En general, el método comprende las siguientes etapas: a) poner en contacto la muestra con una micromatriz que comprende un conjunto de sondas bajo condiciones suficientes para que se produzca la unión específica; y b) examinar la micromatriz para detectar la presencia de cualquier etiqueta detectable, evaluando de ese modo la cantidad de los miARNs diana respectivos en la muestra. El uso de una micromatriz de expresión permite obtener un perfil de expresión de miARN para una muestra dada.

55

60

Métodos para preparar ensayos o micromatrices para ensayar miARNs son muy conocidos en la técnica y no se necesitan detallar adicionalmente en la presente.

65

Se pueden usar micromatrices de ácidos nucleicos para detectar la presencia o la expresión diferencial de miARNs en muestras biológicas. Las micromatrices de polinucleótidos (tales como micromatrices de ADN o ARN) incluyen típicamente regiones de polinucleótidos de secuencia habitualmente diferente ("agentes de captura") ordenados en

una configuración predeterminada sobre un soporte. Las micromatrices son "dirigibles" ya que estas regiones (a veces llamadas "características de la micromatriz") tienen diferentes localizaciones ("direcciones") predeterminadas sobre el soporte de la micromatriz. La región (es decir, una "característica" o un "punto" de la micromatriz) en una localización (es decir, una "dirección") predeterminada particular en la micromatriz detectará una diana de miARN particular. Las micromatrices de polinucleótidos se fabrican típicamente sobre soportes planos bien al depositar polinucleótidos previamente obtenidos sobre el soporte de un modo específico del sitio o bien mediante síntesis in situ específica del sitio de los polinucleótidos sobre el soporte. Las micromatrices para detectar la expresión de miARN se pueden fabricar al depositar (p. ej., mediante métodos basados en contacto o inyección o fotolitografía) bien unidades precursoras (tales como monómeros de nucleótidos o aminoácidos) o bien un agente de captura presintetizado. Después de depositar los agentes de captura de polinucleótido sobre el soporte, típicamente el soporte se procesa (p. ej., se lava y se bloquea, por ejemplo) y se almacena antes del uso.

Una micromatriz para detectar la expresión de miARN tiene al menos dos, tres, cuatro o cinco sondas en cuestión diferentes. Sin embargo, en ciertas realizaciones una micromatriz en cuestión puede incluir un grupo de sondas que tiene al menos 10, al menos 20, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 500 o al menos 1.000 o más sondas que pueden detectar un número correspondiente de miARNs. En algunas realizaciones, las micromatrices en cuestión pueden incluir sondas para detectar al menos una porción o la totalidad de los miARNs identificados de un organismo, o pueden incluir sondas ortólogas procedentes de múltiples organismos.

Una micromatriz de ácidos nucleicos se puede poner en contacto con una muestra o una muestra etiquetada que contiene analitos de miARN bajo condiciones que promueven la unión específica del miARN de la muestra a uno o más agentes de captura presentes sobre la micromatriz para exhibir un patrón de unión observado. Este patrón de unión se puede detectar al interrogar a la micromatriz. Por ejemplo, los miARNs diana de la muestra se pueden etiquetar con una etiqueta adecuada (tal como un compuesto fluorescente) y a continuación la etiqueta se puede observar exactamente (tal como al observar el patrón de fluorescencia) sobre la micromatriz después de la exposición de la micromatriz a la muestra. El patrón de unión observado puede ser indicativo de la presencia y/o la concentración de uno o más componentes de miARN de la muestra.

El etiquetado de miARNs se puede llevar a cabo usando métodos muy conocidos en la técnica, tal como usando ADN ligasa, transferasa terminal, o al etiquetar el esqueleto de ARN, etc. En algunas realizaciones, los miARNs se pueden etiquetar con una etiqueta fluorescente. Colorantes fluorescentes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, colorantes de xanteno, colorantes de fluoresceína, colorantes de rodamina, isotiocianato de fluoresceína (FITC), 6 carboxifluoresceína (FAM), 6 carboxi-2',4',7',4',7-hexaclorofluoresceína (HEX), 6 carboxi 4', 5' dicloro 2', 7' dimetoxifluoresceína (JOE o J), N,N,N',N' tetrametil 6 carboxirrodamina (TAMRA o T), 6 carboxi X rodamina (ROX o R), 5 carboxirrodamina 6G (R6G5 o G5), 6 carboxirrodamina 6G (R6G6 o G6) y rodamina 110; colorantes de cianina, p. ej. colorantes de Cy3, Cy5 y Cy7; colorantes Alexa, p. ej. Alexa-fluor-555; cumarina, dietilaminocumarina, umbeliferona; colorantes de bencimida, p. ej. Hoechst 33258; colorantes de fenantridina, p. ej. Texas Red; colorantes de etidio; colorantes de acridina; colorantes de carbazol; colorantes de fenoxacina; colorantes de porfirina; colorantes de polimetina, colorantes de BODIPY, colorantes de quinolina, pireno, fluoresceína clorotriacililo, R1 10, eosina, JOE, R6G, tetrametilrodamina, lisamina, ROX, naftofluoresceína, y similares.

En algunas realizaciones, una micromatriz de oligonucleótidos para valorar la actividad inmunomoduladora se puede preparar o adquirir, por ejemplo de Affymetrix. La micromatriz puede contener un soporte sólido y una pluralidad de oligonucleótidos que entran en contacto con el soporte. Los oligonucleótidos pueden estar presentes en localizaciones direccionables específicas sobre el soporte sólido; cada una correspondiente a al menos una porción de secuencias de miARN que se pueden expresar diferencialmente durante el tratamiento de un derivado de quinolina o un candidato a fármaco en una célula o un paciente. Las secuencias de miARN comprenden al menos una secuencia de miR-124.

Cuando una micromatriz se usa para valorar miARNs, un método típico puede contener las etapas de 1) obtener la micromatriz que contiene sondas en cuestión unidas a la superficie; 2) hibridación de una población de miARNs a las sondas unidas a la superficie bajo condiciones suficientes para proporcionar unión específica (3) lavados de poshibridación para retirar ácidos nucleicos no unidos en la hibridación; y (4) detección de los miARNs hibridados. Los reactivos usados en cada una de estas etapas y sus condiciones para el uso pueden variar dependiendo de la aplicación particular.

La hibridación se puede llevar a cabo bajo condiciones de hibridación adecuadas, que pueden variar en rigurosidad según se desee. Las condiciones típicas son suficientes para producir complejos de sonda/diana sobre una superficie de la micromatriz entre miembros de unión complementarios, es decir, entre sondas en cuestión unidas a la superficie y miARNs complementarios en una muestra. En ciertas realizaciones, se pueden emplear condiciones de hibridación rigurosas. La hibridación se realiza típicamente bajo condiciones de hibridación rigurosas. Se usan técnicas de hibridación estándar que son muy conocidas en la especialidad (p. ej. bajo condiciones suficientes para proporcionar unión específica de miARNs diana de la muestra a las sondas de la micromatriz) para hibridar una muestra a una micromatriz de ácidos nucleicos. La selección de condiciones apropiadas, incluyendo temperatura, concentración de sales, concentración de polinucleótidos, tiempo de hibridación, rigurosidad de las condiciones de lavado y similares dependerá del diseño experimental, incluyendo la fuente de la muestra, la identidad de los

agentes de captura, el grado de complementariedad esperado, etc., y puede ser determinado como un asunto de experimentación habitual por los expertos normales en la técnica. En general, una "hibridación rigurosa" y "condiciones de lavado de hibridación rigurosas" en el contexto de la hibridación de ácidos nucleicos dependen típicamente de la secuencia, y son diferentes bajo condiciones experimentales diferentes. La hibridación se puede

5 realizar a lo largo de un período de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 horas. La rigurosidad de las condiciones de lavado puede afectar al grado hasta el que las secuencias de miARN se hibridan específicamente a agentes de captura complementarios. Los expertos normales entenderán fácilmente que se pueden utilizar condiciones de hibridación y lavado alternativas pero comparables para proporcionar condiciones de rigurosidad similar.

10 Como una ilustración, en una realización, los experimentos de perfilado de la expresión de miARN se pueden efectuar usando the Affymetrix Genechip miRNA Array 2.0 y siguiendo los protocolos descritos en el manual de instrucciones.

15 En una realización particular, dicha hibridación se puede realizar usando el estuche de hibridación, lavado y tinción GeneChip® (Affymetrix Ref. #900720). Ventajosamente, dicha hibridación se realiza al seguir los protocolos del fabricante.

20 Después del procedimiento de hibridación de miARN, los polinucleótidos unidos a la superficie de la micromatriz se lavan típicamente para retirar ácidos nucleicos no unidos. El lavado se puede realizar usando cualquier protocolo de lavado conveniente, en el que las condiciones de lavado sean típicamente rigurosas, según se describe anteriormente. Por ejemplo, una etapa de lavado se puede realizar usando tampones de lavado vendidos por la compañía Affymetrix (Ref. #900721 y #900722). La hibridación de los miARNs diana a las sondas se detecta a continuación usando técnicas estándar de lectura de la micromatriz. La lectura de la micromatriz hibridada resultante se puede efectuar, por ejemplo, al iluminar la micromatriz y leer la localización y la intensidad de la fluorescencia resultante en cada característica de la micromatriz para detectar complejos de unión de miARN/sonda.

25 se puede efectuar, por ejemplo, al iluminar la micromatriz y leer la localización y la intensidad de la fluorescencia resultante en cada característica de la micromatriz para detectar complejos de unión de miARN/sonda.

miARN-124

Los microARNs (miARNs) son ARNs no codificantes monocatenarios pequeños que pueden actuar en el citoplasma de una célula para provocar una disminución en la expresión de sus ARNs mensajeros diana cognados o la traducción del producto proteínico de ARNm. Los miARNs maduros tienen típicamente una longitud de aproximadamente 19-23 nucleótidos. Esta capacidad de los miARNs para inhibir la producción de sus proteínas diana da como resultado la regulación de muchos tipos de actividades celulares, tales como determinación del destino celular, apoptosis, diferenciación y oncogénesis.

30 Los microARNs (miARNs) son ARNs no codificantes monocatenarios pequeños que pueden actuar en el citoplasma de una célula para provocar una disminución en la expresión de sus ARNs mensajeros diana cognados o la traducción del producto proteínico de ARNm. Los miARNs maduros tienen típicamente una longitud de aproximadamente 19-23 nucleótidos. Esta capacidad de los miARNs para inhibir la producción de sus proteínas diana da como resultado la regulación de muchos tipos de actividades celulares, tales como determinación del destino celular, apoptosis, diferenciación y oncogénesis.

35 miR-124 se clonó inicialmente en ratón. El precursor de miR-124 humano (o miRN-124 o miARN-124 o micro ARN 124) se clonó a partir de células madre embrionarias. Se han identificado hasta ahora 9 haplotipos de precursores de miR-124 (Guo y cols., PLoS ONE, 2009, 4(11):e7944), de los cuales 3 están presentes en el ser humano, hsa-miR-124-1, hsa-miR-124-2 y hsa-miR-124-3. (SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:3).

40 El precursor de microARN miR-124 es una molécula de ARN no codificante pequeño. Los microARNs de ~21 nucleótidos maduros son procesados a partir de secuencias precursoras de horquilla por la enzima Dicer. Las secuencias maduras son SEQ ID NO: 4, UAAGGCACGCGGUGAAUGCC para miR-124-3' y SEQ ID NO: 5, CGUGUUCACAGCGGACCUUGAU para miR-124-5'.

45 miARN-124 se expresa preferentemente en el cerebro, y podría contribuir a la neurogénesis al regular a la baja la expresión de SCP1. La expresión de miR124 en células neuronales de ratón induce un cambio de empalme general a alternativo específico de neuronas al elegir como diana directamente el ARNm de PTBP1. miR-124 incrementa la abundancia de ARNms de PTBP2 y Gabbr1 específicos de neuronas al prevenir el salto de exones dependiente de PTBP1 que conduce al deterioro mediado sin sentido de estos ARNms.

50 En el punto de salida mitótica dentro del sistema nervioso de los vertebrados, cuando las células pierden multipotencia y empiezan a desarrollar conexiones estables que persistirán a lo largo de la vida, se produce un cambio en los mecanismos de remodelación de cromatina dependientes de ATP. Esta traducción podría estar mediada por represión de BAF53A por miR9* (un miARN procesado del brazo opuesto del precursor de tallo-bucle miR9) y miR-124.

55 En el punto de salida mitótica dentro del sistema nervioso de los vertebrados, cuando las células pierden multipotencia y empiezan a desarrollar conexiones estables que persistirán a lo largo de la vida, se produce un cambio en los mecanismos de remodelación de cromatina dependientes de ATP. Esta traducción podría estar mediada por represión de BAF53A por miR9* (un miARN procesado del brazo opuesto del precursor de tallo-bucle miR9) y miR-124.

La encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) es un modelo en roedores de la esclerosis múltiple caracterizado por la inflamación del sistema nervioso central (CNS) asociada con la activación de macrófagos residentes del SNC, o microglía, e infiltración de células inmunitarias periféricas al SNC. Se ha encontrado que miR-124 se expresa igual de altamente en microglía y neuronas. La expresión de miR-124 se reduce en microglía activada durante un episodio de EAE y en microglía activada en cultivo. La transfección de miR-124 desactiva macrófagos derivados de la médula ósea, y la administración intravenosa de miR-124 inhibe el desarrollo de

60 La encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) es un modelo en roedores de la esclerosis múltiple caracterizado por la inflamación del sistema nervioso central (CNS) asociada con la activación de macrófagos residentes del SNC, o microglía, e infiltración de células inmunitarias periféricas al SNC. Se ha encontrado que miR-124 se expresa igual de altamente en microglía y neuronas. La expresión de miR-124 se reduce en microglía activada durante un episodio de EAE y en microglía activada en cultivo. La transfección de miR-124 desactiva macrófagos derivados de la médula ósea, y la administración intravenosa de miR-124 inhibe el desarrollo de

lesiones y reduce la inflamación del SNC en 3 modelos de EAE en ratones. Se ha encontrado que miR-124 promueve la quiescencia de la microglía al desactivar macrófagos a través de la ruta de CEBPA-PU. 1.

5 También se ha demostrado que la expresión miR-124 en fibroblastos humanos induce su conversión en neuronas. Una mayor adición de factores de transcripción neurogénicos ASCL1 y MYT1L mejora la velocidad de conversión y maduración de las neuronas convertidas, mientras que la expresión de estos factores de transcripción sin el susodicho microARN es ineficaz.

10 Una sonda de ácido nucleico aislada adecuada para medir una presencia o expresión de nivel de miR-124 es una sonda de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente a un miR-124, tal como un precursor o un miR-124 maduro.

15 Esta sonda de ácido nucleico puede comprender de 18 a 30 nucleótidos, en particular de 20 a 27, preferiblemente de 20 a 25, preferiblemente de 20, 22 o 25, y más preferiblemente aproximadamente 25 nucleótidos. Como se indica previamente, estas sondas de ácido nucleico se pueden preparar según cualesquiera métodos conocidos en la técnica.

20 Son muy conocidos en la técnica métodos y fórmulas para predecir la temperatura de hibridación óptima para una sonda dada y una diana dada.

Así, el experto en la técnica puede calcular fácilmente una temperatura de hibridación óptima basándose en un grupo de sondas, en una secuencia diana dada y con condiciones particulares de hibridación.

25 Ventajosamente, la temperatura de hibridación óptima de dichas sondas está entre 40°C y 60°C, y más particularmente entre 45°C y 55°C, y preferiblemente es aproximadamente 48°C.

30 Como ejemplos de tampones útiles para hibridar una sonda de ácido nucleico de la invención a un biomarcador de la invención, se pueden mencionar, como un tampón de hibridación, un tampón que comprende 100 mM de MES, 1 M de [Na⁺], 20 mM de EDTA, 0,01% de Tween-20, como un tampón de lavado no riguroso un tampón que comprende 6X SSPE, 0,01% de Tween-20, y como un tampón de lavado riguroso un tampón que comprende 100 mM de MES, 0,1 M de [Na⁺], 0,01% de Tween-20.

35 Una sonda de ácido nucleico adecuada para medir una presencia o expresión de nivel de miR-124 puede ser, por ejemplo, una sonda de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 a SEQ ID NO: 87.

40 Una sonda de ácido nucleico adecuada para medir una presencia o expresión de nivel del precursor miR-124-1 puede ser, por ejemplo, una sonda de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 a SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO 86 y SEQ ID NO 87.

Una sonda de ácido nucleico adecuada para medir una presencia o expresión de nivel del precursor miR-124-2 puede ser, por ejemplo, una sonda de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 35 a SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO 86 y SEQ ID NO 87.

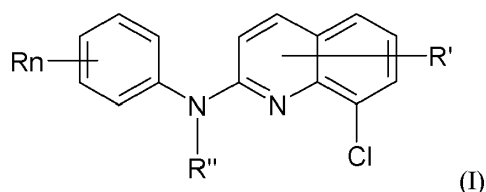
45 Una sonda de ácido nucleico adecuada para medir una presencia o expresión de nivel del precursor miR-124-3 puede ser, por ejemplo, una sonda de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 66 a SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO 86 y SEQ ID NO 87.

50 Una sonda de ácido nucleico adecuada para medir una presencia o expresión de nivel de un miR-124 maduro puede ser, por ejemplo, una sonda de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 86 y SEQ ID NO 87.

Derivados de quinolina

55 Los derivados de quinolina útiles para la invención pueden ser derivados de quinolina eficaces para tratar una infección viral, tales como los descritos en el documento WO 2010/143169.

En particular, los derivados de quinolina útiles para la invención son derivados de quinolina que se pueden representar mediante la siguiente fórmula general (I):



en la que

5 - n es 1 o 2 y R, independientemente, representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo elegido entre un grupo alquilo (C₁-C₃); un grupo -NR₁R₂ en el que R₁ y R₂ son independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₃); un grupo fluoroalcoxi (C₁-C₃); un grupo -NO₂; un grupo fenoxi; y un grupo alcoxi (C₁-C₄),

- R' es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo elegido entre un grupo alquilo (C₁-C₄) y un grupo alcoxi (C₁-C₄),

10 - R'' es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₄),

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Según una realización, R' y R'' son preferiblemente un átomo de hidrógeno.

15 Según otra realización, un derivado de quinolina adecuado para la invención puede ser de fórmula (I), en la que R independientemente, representa un átomo de halógeno o un grupo elegido entre un grupo alquilo (C₁-C₃); un grupo -NR₁R₂ en el que R₁ y R₂ son independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₃); un grupo fluoroalcoxi (C₁-C₃); y un grupo alcoxi (C₁-C₄).

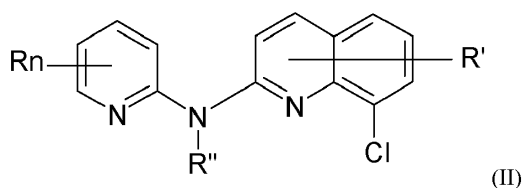
20 Según otra realización, R, independientemente, representa un átomo de flúor o cloro o un grupo elegido entre un grupo metilo o etilo, un grupo -NH₂, un grupo metoxi o etoxi, y un grupo fluoroalcoxi (C₁-C₃).

Según otra realización, n es preferiblemente 1.

25 Según una realización preferida, un derivado de quinolina adecuado para la invención puede ser de fórmula (I), en la que n es 1, R es un grupo fluoroalcoxi (C₁-C₃), y R' y R'' son cada uno un átomo de hidrógeno.

Según una realización preferida, R es un grupo metoxi, etoxi o propoxi sustituido con al menos un átomo de flúor. Preferiblemente, R es un grupo mono-, bi- ou trifluorometoxi.

30 Alternativamente, los derivados de quinolina útiles para la invención son derivados de quinolina que pueden estar representados por un derivado de quinolina de fórmula (II):



35 en la que:

40 - n es 1 o 2 y R, independientemente, representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo elegido entre un grupo alquilo (C₁-C₃); un grupo -CN; un grupo hidroxilo; un grupo -COOR₁; un grupo fluoroalquilo (C₁-C₃); un grupo -NO₂; un grupo -NR₁R₂, siendo R₁ y R₂ un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₃); y un grupo alcoxi (C₁-C₄),

- R' es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo elegido entre un grupo alquilo (C₁-C₄) y un grupo alcoxi (C₁-C₄),

- R'' es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₄),

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Según una realización, un derivado de quinolina adecuado para la invención puede ser de fórmula (II), en la que R' y R'' son preferiblemente un átomo de hidrógeno.

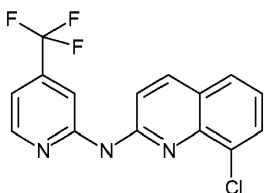
5 Según otra realización, un derivado de quinolina adecuado para la invención puede ser de fórmula (II), en la que R, independientemente, representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo elegido entre un grupo alquilo (C₁-C₃), un grupo fluoroalquilo (C₁-C₃), un grupo hidroxilo, un grupo -CN, un grupo -COOH y un grupo alcoxi (C₁-C₃).

10 Según otra realización, un derivado de quinolina adecuado para la invención puede ser de fórmula (II), en la que R, independientemente, representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo -CN, un grupo alquilo (C₁-C₃), un grupo fluoroalquilo (C₁-C₃), y un grupo hidroxilo. Según otra realización, un derivado de quinolina adecuado para la invención puede ser de fórmula (II), en la que R, independientemente, representa un grupo fluoroalquilo (C₁-C₃).

15 Según otra realización, n es preferiblemente 1.

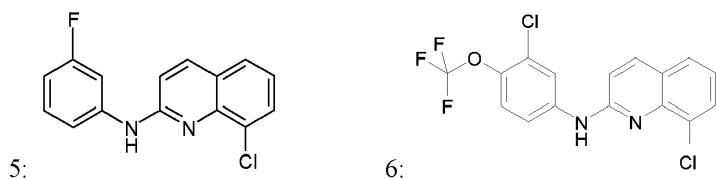
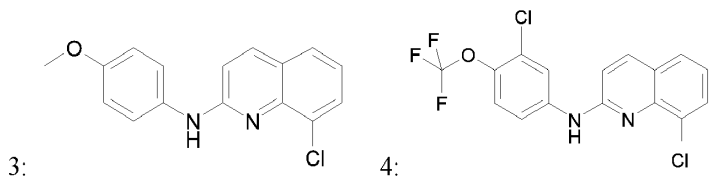
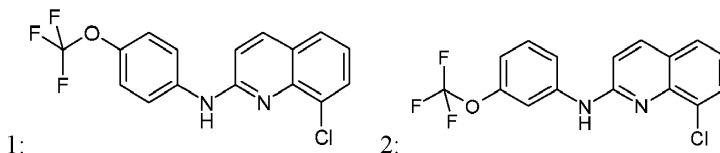
20 Según una realización preferida, un derivado de quinolina adecuado para la invención puede ser de fórmula (II), en la que n es 1, R es un grupo fluoroalquilo (C₁-C₃), y R' y R'' son cada uno un átomo de hidrógeno.

Así, según dicha realización, un derivado de quinolina puede estar representado por la siguiente fórmula:

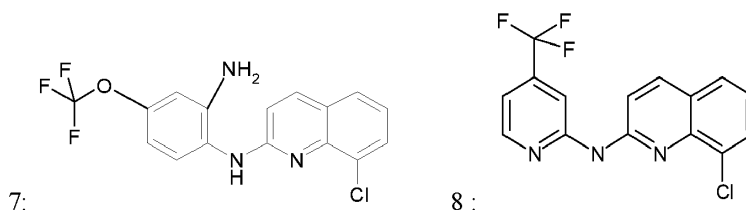


Según una realización, un derivado de quinolina útil para la invención, o una sal del mismo, se puede seleccionar de un grupo que consiste en:

25



30



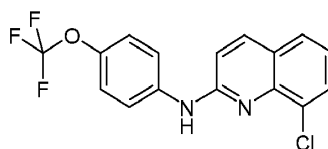
5 Una sal farmacéuticamente aceptable de un derivado de quinolina de la invención y más particularmente de un compuesto que tiene la fórmula general (I) o (II) según la invención puede ser una sal de un compuesto que tiene la fórmula general (I) o (II) y de un metal alcalino, un metal alcalinotérreo o un amonio, que comprende las sales obtenidas con bases de amonio orgánicas, o sales de un compuesto que tiene la fórmula general (I) o (II) y de ácido orgánico o inorgánico.

10 Sales más particularmente adecuadas para la invención pueden ser sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, sales de amonio cuaternario tales como tetrametilamonio o tetraetilamonio, y sales por adición con amoniaco y aminas orgánicas farmacéuticamente aceptables, tales como metilamina, dimetilamina, trimetilamina, etilamina, trietilamina, etanolamina y tris(2-hidroxietil)amina.

15 Las sales de un derivado de quinolina de la invención y más particularmente de un compuesto que tiene la fórmula general (I) o (II) y de un ácido inorgánico adecuado para la invención se pueden obtener con ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico o ácido fosfórico.

20 Las sales de un derivado de quinolina de la invención y más particularmente de un compuesto que tiene la fórmula general (I) o (II) y de un ácido orgánico adecuado para la invención se pueden obtener con ácidos carboxílicos y ácidos sulfónicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico, ácido succínico, ácido malónico, ácido benzoico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico o ácido p-toluenosulfónico.

25 Según una realización preferida, el derivado de quinolina útil para la invención es 8-cloro-N-[4-(trifluorometoxi)fenil]quinolin-2-amina, que puede estar representada por la siguiente fórmula:



Los derivados de quinolina adecuados para la invención se pueden preparar según se describe en el documento WO 2010/143169.

30 El tratamiento puede ser la administración oral o parenteral de un derivado de quinolina. Modos adecuados de administración y régimen se describen en el documento WO 2010/143169.

35 Se puede usar cualquier vía de administración. Por ejemplo, un derivado de quinolina se puede administrar por medios orales, parenterales, intravenosos, transdérmicos, intramusculares, rectales, sublinguales, mucosos, nasales u otros medios. Además, un derivado de quinolina se puede administrar en una forma de composición farmacéutica y/o una forma de dosificación unitaria.

40 Formas de dosificación adecuadas incluyen, pero no se limitan a, cápsulas, comprimidos (incluyendo comprimidos de disolución rápida y liberación retardada), polvos, jarabes, suspensiones y soluciones orales para la administración parenteral.

45 Los ejemplos proporcionados en la presente están destinados a ser meramente ejemplares, y los expertos en la técnica apreciarán, o serán capaces de averiguar usando experimentación no mayor de la habitual, numerosos equivalentes de compuestos, materiales y procedimientos específicos. Se considera que todos estos equivalentes están dentro del alcance de la invención y están abarcados por las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS**Ejemplo 1**

Modulación de la expresión de miARNs con 8-cloro-N-[4-(trifluorometoxifenil)]quinolin-2-amina

- 5 En el contexto de la inhibición de VIH-1 mediante el derivado de quinolina, 8-cloro-N-[4-(trifluorometoxi)fenil]quinolin-2-amina, se ha estudiado si el tratamiento podría modular la expresión de miARNs del hospedador.

10 Con ese propósito, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de cinco donantes sanos se han aislado mediante la centrifugación en un gradiente de FICOLL. Las células se han cultivado a 37°C, 5% de CO₂ hasta una densidad de 1x10⁶ células/ml en medio RPMI Glutamax (Life Technologies Ref 61870-010) suplementado con 10% de suero de ternero fetal (FCS) (Thermo Fischer Ref SV30160.03) 1000 U/ml de IL2 (Peprotech Ref 200-02) y 5 µg/ml de PHA (Roche ref 1249738). Tres días más tarde, las células se han reunido y resuspendido hasta una densidad de 1x10⁶ células/ml en medio RPMI Glutamax complementado con 10% de suero de ternero fetal (FCS) 1000 U/ml de IL-2 y se distribuyeron en placas de 12 pocillos (Falcon Ref 353043) con 1,2 ml/pocillo (4 pocillos por condición).

15 La infección por VIH-1 se ha realizado con 1 ng de cepa de VIH Ada-M R5/pocillo. Las células se trataron durante 6 días con 1,2 ml/pocillo de solución 60 µM de 8-cloro-N-[4-(trifluorometoxi)fenil]quinolin-2-amina o con 0,12% de DMSO (Sigma Ref D4818 como control negativo).

20 A continuación, las células se reunieron por condiciones, se centrifugaron y las pellas se resuspendieron en 700 µl de tampón de lisis Qiazol (Qiagen Ref 217004) para la extracción con el estuche miRNeasy a partir de Qiagen (Qiagen Ref 217004). Los ARNs se extrajeron según las instrucciones del fabricante. La cualidad y la cantidad de ARNs extraídos se controlaron usando Agilent Bioanalyzer 2100 y espectrometría Nanodrop ND-1000. El valor de RIN medio era 8,84 (de 7,2 a 9,7). Una cantidad de ARN total de 90 ng por muestra se etiquetó usando FlashTag™ Biotin HSR ARN Labeling Kit (901911) y se hibridó durante la noche al Affymetrix Genechip miRNA Array 2.0. (901753). Las micromatrices se lavaron y se tiñeron usando el protocolo de Affymetrix estándar y se escanearon usando el Affymetrix Scanner. Se realizaron controles de calidad usando Expression Console metrics de Affymetrix (versión 1.2).

30 Los datos se normalizaron usando el método de normalización Expression Console "RMA+DABG" y un miARN se consideraba expresado si el valor de P de DABG correspondiente era menor o igual a 0,05. Un miARN se consideraba expresado en una condición si se expresaba miARN en al menos 75% de los donantes de PBMCs de esta condición. Una prueba de la t de Student apareada se aplicó sobre miARNs expresados que se consideraban expresados diferencialmente entre dos condiciones si el cambio en número de veces era mayor o igual a 1,5 y el valor de P de la prueba de la T era menor o igual a 0,05.

Resultados

40 La comparación de la expresión de miARN entre células infectadas y no infectadas destacaba una modificación múltiple (regulación al alza o a la baja) resultante de la infección por VIH-1. En particular, se observa que miARN-124 era regulado a la baja en PBMCs infectadas con VIH.

45 En contraste, la comparación entre PBMCs infectadas con VIH tratadas con 8-cloro-N-[4-(trifluorometoxi)fenil]quinolin-2-amina o no tratadas destacaba solo un miARN, miR-124, cuya expresión se incrementaba con confianza (aproximadamente 13 veces) bajo tratamiento.

Según esto, se valida que miR-124 es un biomarcador pertinente para comprobar la eficacia de derivados de quinolina según la invención como fármacos antivirales en un paciente con sida, y en particular la 8-cloro-N-[4-(trifluorometoxi)fenil]quinolin-2-amina.

Ejemplo 2

- 50 *Evaluación de la eficacia de derivados de quinolina sobre la expresión de miR-124 3p.*

Además del Ejemplo 1 que proporciona una valoración de la expresión de mi-ARN en el contexto de la infección por VIH-1, el Ejemplo 2 valora la variación de la expresión de miR-124 en ausencia de VIH-1. El método de cribado se probó para evaluar un grupo de derivados de quinolina y fármacos antirretrovirales conocidos tales como maraviroc, efavirenz, darunavir y azidotimidina (AZT).

55

Materiales y Métodos

Extracción de PBMC usando un gradiente de FICOLL™

Con ese propósito, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de cuatro donantes sanos se han aislado mediante la centrifugación en un gradiente de FICOLL según protocolos estándar.

5 Brevemente, 60-70 ml de capa leucocítica se vierten en un matraz de 175 cm² y el volumen se ajusta hasta 300 ml usando PBS a fin de obtener una dilución de aproximadamente 5 veces de la capa leucocítica. A continuación, se añaden 38 ml de capa leucocítica diluida a tubos Falcon™ de 50 ml que comprenden 12 ml de FICOLL™ (Histopack-1077) a temperatura ambiente. La preparación se centrifuga durante 30 minutos a 1600 rpm (=515 rcf) a temperatura ambiente. El anillo linfocítico se recupera del tubo de Falcon™ con una pipeta de transferencia (Pastette®) y a continuación se lava con PBS usando centrifugación durante 10 minutos a 1200 rpm (= 290 rcf) y a temperatura ambiente hasta que el sobrenadante se vuelve transparente.

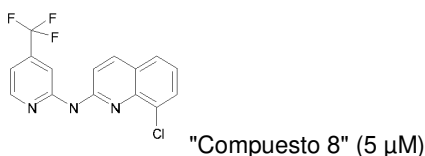
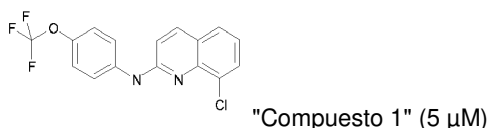
15 A continuación, las células se resuspenden a 37°C hasta una densidad de 1,5x10⁶ células/ml de medio RPMI Glutamax (Life Technologies Ref 61870-010) complementado con 10% de suero de ternero fetal (FCS) (Thermo Fischer Ref SV30160.03) y sin activación. Las células se incuban durante 48 horas a 37°C bajo 5% de CO₂.

Tratamiento de células con moléculas cribadas

20 Se usan placas de seis pocillos para el cribado. Dentro de cada pocillo que comprende 3.10⁶ células/4 ml de RPMI complementado con 10% de suero de ternero fetal y 40 U/ml de IL-2 (Peprotech Ref 200-02) se añaden moléculas cribadas. Se añade al pocillo DMSO al 100% (0,8 µl) y se prueba como un control negativo.

Cada condición probada se establece como se describe posteriormente en la presente y el volumen correspondiente final se ajusta según esto en el pocillo:

25 1) Derivados de quinolina: (8-cloro-N-[4-(trifluorometoxi)fenil]quinolin-2-amina y 8-cloro-N-[4-(trifluorometil)piridin-2-il]quinolin-2-amina - Respectivamente compuestos 1 y 8) en DMSO al 100% - (5 µM y volumen final 0,4 µl) :



2) Otros fármacos antirretrovirales: maraviroc, efavirenz, darunavir, AZT (10 µM para todos - volumen final 0,8 µl).

30 Los pocillos se incuban durante tres días a 37°C bajo 5% de CO₂. El medio se cambia (Día 3) según protocolos estándar. Brevemente, las placas se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos y se retiran 3 ml de sobrenadante. A continuación, se añaden 3 ml de RPMI complementado con 10% de suero de ternero fetal y 40 U/ml de IL-2 con 0,6 µl (para una concentración final de 10 µM) o 0,3 µl (para una concentración final de 5 µM) de una solución de reserva de molécula cribada a 50 mM en DMSO al 100% o 0,6 µl de DMSO al 100% como un control negativo.

35 Extracción de miARNs (Día 6)

Las células se recuperan dentro de tubos Falcon™ de 15 ml, se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos y a continuación se lavan en 10 ml de PBS y se centrifugan adicionalmente a 1200 rpm durante 5 minutos. A continuación, las células se resuspenden en 1 ml de PBS y se recuentan.

40 6x10⁶ células se recuperan y se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos. La pella celular se somete a lisis en 300 µl de tampón de lisis ML procedente del estuche de extracción de miARN Macherey Nagel Nucleospin® (Macherey Nagel Ref 740971), y se almacena adicionalmente a -20°C.

ES 2 716 104 T3

5 Se añaden para cada muestra 5 µl de 2×10^8 copias/µl de control adicionado (Ce_miR-39 de QIAGEN® - *referencia 219610, secuencia 5' UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG 3'*). La extracción de miARN se alcanza usando el protocolo del estuche de extracción de miARN Macherey Nagel Nucleospin® usando un volumen de elución para ARNs de 50 µl y miARNs de 30 µl, y se almacenó adicionalmente a -20°C.

Transcripción inversa de miARNs (Día 6)

La etapa de transcripción inversa es seguida por 12 µl de miARN usando el estuche de transcripción inversa miScript RT II (RT) de QIAGEN® usando el tampón miScript HiSpec, y se almacenó adicionalmente a -20°C.

PCR cuantitativa de miARNs (Día 6)

10 La etapa de PCR cuantitativa se alcanza usando el estuche de PCR miScript SYBR® Green y miScript Primer Assays de QIAGEN® según el protocolo del fabricante.

Composición de la mezcla de reacción miScript para placas de 384 pocillos:

Mezcla	µl/reacción
2X SYBR® Green mix	5
10X Universal Primer	1
10X Primer Assay	1
H ₂ O	2
<u>Volumen total de la mezcla:</u>	9
<u>ADNc de plantilla en H₂O (*)</u>	1
<u>Volumen final:</u>	10

(*) ADNc preparado usando el estuche de RT miScript II

15 La reacción se repite por triplicado en una placa de 384 pocillos según el protocolo del fabricante en un sistema de PCR en tiempo real LightCycler® 380 Roche. Las condiciones del ciclo también se establecen según el protocolo del fabricante:

Etapa	Tiempo	Temperatura
<u>Etapa de activación inicial</u>	15 min	95°C
<u>Ciclación en 3 etapas:</u>		
Desnaturalización	15 s	94°C
Renaturalización	30 s	55°C
Extensión	30 s	70°C
Número de ciclos	40 ciclos	

20 La cuantificación relativa y absoluta de qPCR son técnicas conocidas en la especialidad y se pueden conseguir como se detalla adicionalmente posteriormente.

1) Cuantificación relativa

25 A partir de una dilución hasta 1/10th en H₂O para la qPCR de miR-124 (Hs_miR-124a) o hasta 1/100^o para la qPCR de referencia/gen constitutivo (Hs_miR-26a y Hs_miR-191, usando miScript Primer Assays (Hs_miR-124a, Hs_miR-26a y Hs_miR-191).

30 El análisis se consigue usando modelos de cuantificación relativa sin corrección para la eficacia ($2^{-\Delta\Delta C_p}$) usando el promedio de valores de puntos de cruce (Cp) de triplicados de miR-124 y el promedio del promedio de triplicados de miR-26a y miR-191.

2) Cuantificación absoluta

5 A partir de una dilución hasta 1/10th en H₂O para la qPCR de miR-124 y miScript Primer Assays (Hs_miR-124a y Ce_miR-39). Las curvas de calibración se alcanzan según protocolos estándar. El análisis se alcanza al normalizar el promedio de triplicados de miR-124 con el promedio de triplicados de miR-39 y normalizando adicionalmente con el número de células.

Resultados

10 Los resultados muestran un buen acuerdo entre la cuantificación relativa y absoluta para todas las moléculas. Las muestras de control de DMSO tienen un cambio en número de veces de 1, lo que significa que no hay variación en la expresión de miR-124a. Todos los derivados de quinolina probados muestran una modulación de miR-124 correspondiente a un incremento de diez veces de la expresión de miR-124.

En comparación, otros fármacos antirretrovirales no inducen una modulación significativa de la expresión de miR-124.

15 Así, este Ejemplo muestra que el miR-124 es un biomarcador adecuado para cribar un candidato a fármaco o un candidato a vacuna que se presume eficaz para prevenir y/o tratar una infección viral. También es particularmente útil para valorar la actividad de un derivado de quinolina de la invención.

Listado de secuencias

20 <110> Centre National de la Recherche scientifique

SPLICOS

Université de Montpellier 2

<120> miARN-124 como un biomarcador

<130> PR99696

25 <150> EP13305053.4

< 151> 2013-01-17

<160> 87

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

30 < 211> 85

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> fuente

35 < 222> 1..85

< 223> /tipo_mol="ADN"

ES 2 716 104 T3

```

/organismo="Homo sapiens"

<400> 1
    aggcctctct ctccgtgttc acagcggacc ttgatttaa tgtccataca attaaggcac      60
    gcggtgaatg ccaagaatgg ggctg                                           85

<210> 2
5   < 211> 109
    < 212> ADN
    < 213> Homo sapiens
    <220>
    < 221> fuente
10  < 222> 1..109
    < 223> /tipo_mol="ADN"
    /organismo="Homo sapiens"
    <400> 2
    atcaagatta gaggctctgc tctccgtgtt cacagcggac cttgatttaa tgtcatacaa      60
    ttaaggcacg cggtgaatgc caagagcggg gcctacggct gcacttgaa                109

15  <210> 3
    < 211> 87
    < 212> ADN
    < 213> Homo sapiens
    <220>
20  < 221> fuente
    < 222> 1..87
    < 223> /tipo_mol="ADN"
    /organismo="Homo sapiens"
    <400> 3
    tgagggccccc tctgcgtgtt cacagcggac cttgatttaa tgtctataca attaaggcac      60
25  gcggtgaatg ccaagagagg cgcctcc                                           87

    <210> 4

```

ES 2 716 104 T3

< 211> 20
< 212> ARN
< 213> Homo sapiens
<220>
5 < 221> fuente
< 222> 1..20
< 223> /tipo_mol="ARN"
/organismo="Homo sapiens"
<400> 4
10 uaaggcacgc ggugaaugcc 20
<210> 5
< 211> 22
< 212> ARN
< 213> Homo sapiens
15 <220>
< 221> fuente
< 222> 1..22
< 223> /tipo_mol="ARN"
/organismo="Homo sapiens"
20 <400> 5
cguguucaca gcgaccuug au 22
<210> 6
< 211> 25
< 212> ADN
25 < 213> Secuencia Artificial
<220>
< 221> fuente
< 222> 1..25

ES 2 716 104 T3

< 223> /tipo_mol="ADN" /nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
<400> 6
gcacaagtgt cgctggaac taaat 25
5 <210> 7
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
10 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN" /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 7
15 cacaagtgtc gcttgaact aaatt 25
 <210> 8
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
20 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
25 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 8
 tatgttaatt ccgtgcgcca ctac 25
 <210> 9

< 211> 25
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>
5 < 221> fuente
< 222> 1..25
< 223> /tipo_mol="ADN"
/nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
10 <400> 9
atgtaattc cgtgcgccac ttacg 25
<210> 10
< 211> 25
< 212> ADN
15 < 213> Secuencia Artificial
<220>
< 221> fuente
< 222> 1..25
< 223> /tipo_mol="ADN"
20 /nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
<400> 10
tgtaattcc gtgcgccact tacgg 25
<210> 11
25 < 211> 25
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>

< 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 5 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 11
 gttaattccg tgcgccactt acggt 25
 <210> 12
 < 211> 25
 10 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 15 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 12
 ttaattccgt gcgccactta cgggt 25
 20 <210> 13
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"

/organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 13
 taattccgtg cgccacttac ggtc 25
 <210> 14
 5 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 10 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 14
 15 aattccgtgc gccacttacg gttct 25
 <210> 15
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 25 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 15
 gcctggaact aaattacag gtatg 25
 <210> 16

< 211> 25
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>
5 < 221> fuente
< 222> 1..25
< 223> /tipo_mol="ADN"
/nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
10 <400> 16
cctggaacta aatttacagg tatgt 25
<210> 17
< 211> 25
< 212> ADN
15 < 213> Secuencia Artificial
<220>
< 221> fuente
< 222> 1..25
< 223> /tipo_mol="ADN"
20 /nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
<400> 17
ctggaactaa atttacaggt atggt 25
<210> 18
25 < 211> 25
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>

< 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 5 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 18
 ggaactaaat ttacaggtat gtaa 25
 <210> 19
 < 211> 25
 10 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 15 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 19
 gaactaaatt tacaggtatg ttaat 25
 20 <210> 20
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"

/organismo="Secuencia Artificial"
/organismo="Secuencia Artificial"
<400> 20
aactaaattt acaggtatgt taatt 25
5 <210> 21
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
10 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
15 <400> 21
 ctaaatttac aggtatgtta attcc 25
 <210> 22
 < 211> 25
 < 212> ADN
20 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
25 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 22

taaattaca ggtatgtaa ttccg 25
<210> 23
< 211> 25
< 212> ADN
5 < 213> Secuencia Artificial
<220>
< 221> fuente
< 222> 1..25
< 223> /tipo_mol="ADN"
10 /nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
<400> 23
aaattacag gtatgtaat tccgt 25
<210> 24
15 < 211> 25
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>
< 221> fuente
20 < 222> 1..25
< 223> /tipo_mol="ADN"
/nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
<400> 24
25 tccgagaga gaggacaag tgtcg 25
<210> 25
< 211> 25
< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial
<220>
< 221> fuente
< 222> 1..25
5 < 223> /tipo_mol="ADN"
/nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
<400> 25
agagaggcac aagtgtgcc tggaa 25
10 <210> 26
< 211> 25
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>
15 < 221> fuente
< 222> 1..25
< 223> /tipo_mol="ADN"
/nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
20 <400> 26
acaagtgtcg cctggaacta aatt 25
<210> 27
< 211> 25
< 212> ADN
25 < 213> Secuencia Artificial
<220>
< 221> fuente
< 222> 1..25

< 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 27
 5 gcctggaact aaattacag gtatg 25
 <210> 28
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 15 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 28
 ctggaactaa atttacaggt atgtt 25
 <210> 29
 < 211> 25
 20 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 25 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 29

ggaactaaat ttacaggtat gtaa 25

<210> 30

< 211> 25

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 221> fuente

< 222> 1..25

< 223> /tipo_mol="ADN"

10 /nota="sonda"

/organismo="Secuencia Artificial"

<400> 30

taaatttaca ggtatgtaa ttccg 25

<210> 31

15 < 211> 25

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 221> fuente

20 < 222> 1..25

< 223> /tipo_mol="ADN"

/nota="sonda"

/organismo="Secuencia Artificial"

<400> 31

25 aaatttacag gtatgtaat tccgt 25

<210> 32

< 211> 25

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 5 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 32
 caggtatgtt aattccgtgc gccac 25
 10 <210> 33
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 20 <400> 33
 ggtatgtaa ttccgtgcbc cactt 25
 <210> 34
 < 211> 25
 < 212> ADN
 25 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25

< 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 34
 5 ttccgtgcg cacttacggt tctta 25
 <210> 35
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 15 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 35
 gcacaagtgt cgcttgaac taaat 25
 <210> 36
 < 211> 25
 20 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 25 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 36

tatgtaatt ccgtagcga cttac 25
 <210> 37
 < 211> 25
 < 212> ADN
 5 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 10 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 37
 cacaagtgtc gcctggaact aaatt 25
 <210> 38
 15 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 20 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 38
 25 atgtaattc cgtgcccac ttacg 25
 <210> 39
 < 211> 25
 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 5 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 39
 tgtaattcc gtgcgcact tacgg 25
 10 <210> 40
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 20 <400> 40
 gtaattccg gtgcgcactt acggt 25
 <210> 41
 < 211> 25
 < 212> ADN
 25 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25

< 223> /tipo_mol="ADN"
/nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
<400> 41
5 ttaattccgt ggccactta cggtt 25
<210> 42
< 211> 25
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
10 <220>
< 221> fuente
< 222> 1..25
< 223> /tipo_mol="ADN"
/nota="sonda"
15 /organismo="Secuencia Artificial"
<400> 42
taattccgtg cgccacttac gggtc 25
<210> 43
< 211> 25
20 < 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>
< 221> fuente
< 222> 1..25
25 < 223> /tipo_mol="ADN"
/nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
<400> 43

aattccgtgc gccacttacg gttct 25

<210> 44

< 211> 25

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 221> fuente

< 222> 1..25

< 223> /tipo_mol="ADN"

10 /nota="sonda"

/organismo="Secuencia Artificial"

<400> 44

tagttctaata ctccgagacg agagg 25

<210> 45

15 < 211> 25

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 221> fuente

20 < 222> 1..25

< 223> /tipo_mol="ADN"

/nota="sonda"

/organismo="Secuencia Artificial"

<400> 45

25 ccacttacgg ttctgcctc ggatg 25

<210> 46

< 211> 25

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 5 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 46
 gttctaattct ccgagacgag aggca 25
 10 <210> 47
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 20 <400> 47
 acttacggtt ctcgcctcgg atgcc 25
 <210> 48
 < 211> 25
 < 212> ADN
 25 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25

< 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 48
 5 tctaactccc gagacgagag gcaca 25
 <210> 49
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 15 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 49
 tacggttctc gcctcggatg ccgac 25
 <210> 50
 < 211> 25
 20 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 25 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 50

aatctccgag acgagaggca caagt 25
 <210> 51
 < 211> 25
 < 212> ADN
 5 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 10 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 51
 ttctcgctc ggatgccgac gtgaa 25
 <210> 52
 15 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 20 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 52
 25 tctccgagac gagaggcaca agtgt 25
 <210> 53
 < 211> 25
 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial
<220>
< 221> fuente
< 222> 1..25
5 < 223> /tipo_mol="ADN"
/nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
<400> 53
ctcgcctcgg atgccgacgt gaact 25
10 <210> 54
< 211> 25
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>
15 < 221> fuente
< 222> 1..25
< 223> /tipo_mol="ADN"
/nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
20 <400> 54
tcgcctcgga tgccgacgtg aactt 25
<210> 55
< 211> 25
< 212> ADN
25 < 213> Secuencia Artificial
<220>
< 221> fuente
< 222> 1..25

< 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 55
 5 tagttctaattctccgagagc agagg 25
 <210> 56
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 15 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 56
 tctaattctcc gagacgagag gcaca 25
 <210> 57
 < 211> 25
 20 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 25 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 57

aatctccgag acgagaggca caagt 25
 <210> 58
 < 211> 25
 < 212> ADN
 5 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 10 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 58
 tctccgagac gagaggcaca agtgt 25
 <210> 59
 15 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 20 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 59
 25 acaagtgtcg cctggaacta aatta 25
 <210> 60
 < 211> 25
 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial
<220>
< 221> fuente
< 222> 1..25
5 < 223> /tipo_mol="ADN"
/nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
<400> 60
acagtatgtt aattccgtgc gccac 25
10 <210> 61
< 211> 25
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>
15 < 221> fuente
< 222> 1..25
< 223> /tipo_mol="ADN"
/nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
20 <400> 61
ccacttacgg ttctgcctc ggatg 25
<210> 62
< 211> 25
< 212> ADN
25 < 213> Secuencia Artificial
<220>
< 221> fuente
< 222> 1..25

< 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 62
 5 acttacggtt ctcgcctcgg atgcc 25
 <210> 63
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 15 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 63
 tacggttctc gcctcggatg ccgac 25
 <210> 64
 < 211> 25
 20 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 25 < 223> /tipo_mol="ADN" /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 64

ES 2 716 104 T3

ttctgcctc ggatgccgac gtgaa 25
<210> 65
< 211> 25
< 212> ADN
5 < 213> Secuencia Artificial
<220>
< 221> fuente
< 222> 1..25
< 223> /tipo_mol="ADN"
10 /nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
<400> 65
ctcgcctcgg atgccgacgt gaact 25
<210> 66
15 < 211> 25
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>
< 221> fuente
20 < 222> 1..25
< 223> /tipo_mol="ADN"
/nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
<400> 66
25 gcacaagtgt cgctggaac taaat 25
<210> 67
< 211> 25
< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial
<220>
< 221> fuente
< 222> 1..25
5 < 223> /tipo_mol="ADN"
/nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
<400> 67
tatgttaatt ccgtgcgcca ctac 25
10 <210> 68
< 211> 25
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>
15 < 221> fuente
< 222> 1..25
< 223> /tipo_mol="ADN"
/nota="sonda"
/organismo="Secuencia Artificial"
20 <400> 68
cacaaggtgc gcctggaact aaatt 25
<210> 69
< 211> 25
< 212> ADN
25 < 213> Secuencia Artificial
<220>
< 221> fuente
< 222> 1..25

< 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 69
 5 atgtaattc cgtgcgccac ttacg 25
 <210> 70
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN" /nota="sonda" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 70
 15 tgtaattcc gtgcgccact tacgg 25
 <210> 71
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 25 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 71
 gttaattccg tgcgccactt acggt 25
 <210> 72

< 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 10 <400> 72
 ttaattccgt ggcactta cggtt 25
 <210> 73
 < 211> 25
 < 212> ADN
 15 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 20 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 73
 taattccgtg cgccacttac gggtc 25
 <210> 74
 25 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>

< 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 5 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 74
 aattccgtgc gccacttacg gttct 25
 <210> 75
 < 211> 25
 10 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 15 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 75
 actcccgggg agacgcacaa gtgtc 25
 20 <210> 76
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"

/organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 76
 ctcccgggga gacgcacaag tgcg 25
 <210> 77
 5 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 10 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 77
 15 ccgggggagac gcacaagtgt cgcct 25
 <210> 78
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 25 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 78
 acgcacaagt gtcgcctgga actaa 25
 <210> 79

< 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 10 <400> 79
 gtgtgcctg gaactaaatt acaga 25
 <210> 80
 < 211> 25
 < 212> ADN
 15 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 20 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 80
 gcctggaact aaattacaga tatgt 25
 <210> 81
 25 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>

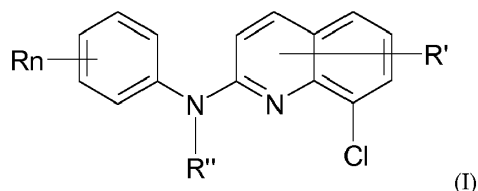
< 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 5 /organismo="Secuencia Artificial"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 81
 ttacagatat gttaattccg tgcg 25
 <210> 82
 10 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 15 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 82
 20 agatatgta attccgtgcg ccact 25
 <210> 83
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"

/nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 83
 ttccgtgcg cacttacggt tctct 25
 5 <210> 84
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 15 <400> 84
 gccacttacg gttctctccg cggag 25
 <210> 85
 < 211> 25
 < 212> ADN
 20 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..25
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 25 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 85
 ccacttacgg ttctctccgc ggagg 25

<210> 86
 < 211> 22
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..22
 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 10 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 86
 gcacaagtgt cgcttgaac ta 22
 <210> 87
 < 211> 20
 15 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 221> fuente
 < 222> 1..20
 20 < 223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="sonda"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 87
 attccgtgcg ccacttacgg 20

REIVINDICACIONES

1. Un uso *in vitro* o *ex vivo* de al menos un miARN, siendo dicho al menos un miARN miR-124, como un biomarcador de una infección viral, o de una eficacia de un tratamiento terapéutico de dicha infección viral.
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, en el que un nivel de expresión medido de dicho miR-124 en una muestra biológica aislada se compara con un valor de referencia de control, y en el que una modulación de dicho nivel medido con relación a dicho valor de referencia de control es indicativa de una infección viral, o de una eficacia de un tratamiento terapéutico de dicha infección viral.
- 10 3. El uso según la reivindicación 1, en el que la eficacia de un tratamiento terapéutico de dicha infección viral se determina al valorar el efecto biológico de un posible compuesto, para alterar la actividad fisiológica de una proteína o una célula.
- 15 4. Un uso *in vitro* o *ex vivo* de al menos un miARN, siendo dicho al menos un miARN miR-124, como un biomarcador para cribar un candidato a fármaco o candidato a vacuna, en particular un derivado de quinolina, que se presume eficaz para prevenir y/o tratar una infección viral.
- 20 5. El uso según las reivindicaciones precedentes 3 o 4, en el que un nivel de expresión medido de dicho miR-124 en una muestra biológica aislada en presencia de dicho candidato comparado con un valor de referencia de control, y en el que una modulación de dicho nivel medido con relación a dicho valor de referencia de control es indicativa del efecto biológico de dicho candidato, y en particular de la eficacia de dicho candidato a fármaco o candidato a vacuna para prevenir y/o tratar una infección viral.
- 25 6. El uso según las reivindicaciones 2 o 5, en el que dicha muestra biológica se selecciona en un grupo que consiste en una muestra de tejido biológico, una muestra de sangre entera, una muestra de frotis, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de saliva, una muestra de fluido vaginal, una muestra de esperma, una muestra de fluido faríngeo, una muestra de fluido bronquial, una muestra de fluido fecal, una muestra de fluido cerebroespinal, una muestra de fluido lagrimal y una muestra de sobrenadante de cultivo tisular.
- 30 7. El uso según las reivindicaciones 3 a 6, en el que dicho candidato a fármaco o candidato a vacuna es un derivado de quinolina de fórmula (I):



35 en la que

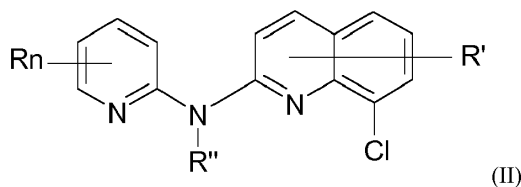
- n es 1 o 2 y R, independientemente, representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo elegido entre un grupo alquilo (C₁-C₃); un grupo -NR₁R₂ en el que R₁ y R₂ son independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₃); un grupo fluoroalcoxi (C₁-C₃); un grupo -NO₂; un grupo fenoxi; y un grupo alcoxi (C₁-C₄),

40 - R' es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo elegido entre un grupo alquilo (C₁-C₄) y un grupo alcoxi (C₁-C₄),

- R'' es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₄),

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

45 8. El uso según las reivindicaciones 3 a 6, en el que dicho candidato a fármaco o candidato a vacuna es un derivado de quinolina de fórmula (II):



en la que

- n es 1 o 2 y R, independientemente, representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo elegido entre un grupo alquilo (C₁-C₃); un grupo -CN; un grupo hidroxilo; un grupo -COOR₁; un grupo fluoroalquilo (C₁-C₃); un grupo -NO₂; un grupo -NR₁R₂, siendo R₁ y R₂ un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₃); y un grupo alcoxi (C₁-C₄),

- R' es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo elegido entre un grupo alquilo (C₁-C₄) y un grupo alcoxi (C₁-C₄),

- R'' es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₄),

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

9. Un uso *in vitro* o *ex vivo* de al menos un miARN, siendo dicho al menos un miARN miR-124, como un biomarcador de una actividad de un derivado de quinolina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en una infección viral.

10. El uso según la reivindicación 9, en el que dicho derivado de quinolina es de fórmula (I) según se define en la reivindicación 7, o de fórmula (II) según se define en la reivindicación 8, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo 8-cloro-N-[4-(trifluorometoxi)fenil]quinolin-2-amina u 8-cloro-N-[4-(trifluorometil)piridin-2-il]quinolin-2-amina.

11. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en el que una expresión de nivel en una muestra biológica aislada se compara con un valor de referencia de control, y en el que un incremento de dicho nivel medido con relación a dicho valor de referencia de control es indicativo de una actividad de dicho derivado de quinolina.

12. Un método *in vitro* o *ex vivo* para valorar una infección viral en un paciente que se presume que está infectado con un virus, que comprende al menos las etapas de:

a- medir una presencia o un nivel de expresión de al menos un miARN, siendo dicho al menos un miARN miR-124, en una muestra biológica previamente obtenida de dicho paciente; y

b- comparar dicha presencia o nivel de expresión con un valor de referencia de control,

en el que una presencia o nivel de expresión modulados de dicho miARN con relación a dicho valor de referencia de control es indicativo de una infección viral.

13. Un método *in vitro* o *ex vivo* para valorar una actividad de un derivado de quinolina según una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 para prevenir y/o tratar una infección viral en un paciente tratado con dicho derivado de quinolina, que comprende al menos las etapas de:

a- medir una presencia o un nivel de expresión de al menos un miARN, siendo dicho al menos un miARN miR-124, en una primera muestra biológica previamente obtenida de dicho paciente antes de administrar dicho derivado de quinolina y en una segunda muestra biológica previamente obtenida de dicho paciente después de administrar dicho derivado de quinolina; y

b- determinar si dicha presencia o nivel de expresión es modulado en la segunda muestra biológica obtenida después del tratamiento en comparación con la segunda muestra biológica obtenida antes del tratamiento;

en el que una presencia o nivel de expresión modulados de dicho miARN es indicativo de una actividad de dicho derivado de quinolina.

14. Un método *in vitro* o *ex vivo* para cribar un candidato a fármaco o un candidato a vacuna que se presume eficaz para prevenir y/o tratar una infección viral, que comprende al menos las etapas de:

a- tratar al menos una célula aislada capaz de expresar al menos un miARN, siendo dicho al menos un miARN miR-124, con dicho candidato, estando dicha célula bajo condiciones adecuadas para expresar dicho al menos un miARN,

b- medir una presencia o nivel de expresión de dicho al menos un miARN,

c- comparar dicha presencia o nivel de expresión medidos con una medida o nivel de expresión de dicho al menos un miARN en una célula aislada no tratada,

en el que una presencia o nivel de expresión modulados de dicho miARN es indicativo de la eficacia de dicho candidato a fármaco o candidato a vacuna sobre una infección viral.

5 15. Un uso *in vitro* o *ex vivo* de una sonda de ácido nucleico aislada capaz de hibridarse específicamente a miR-124, como un agente diagnóstico para medir una presencia o una expresión de nivel de miR-124, para diagnosticar una infección viral o para valorar una actividad de un candidato a fármaco o candidato a vacuna para prevenir y/o tratar una infección viral.

10 16. El uso según la reivindicación 15, en el que dicha sonda de ácido nucleico consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 a SEQ ID NO: 87.