

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 580**

21 Número de solicitud: 201431474

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

07.10.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.05.2015

Fecha de la concesión:

24.02.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

02.03.2016

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE JAÉN (100.0%)
Campus Las Lagunillas, s/n
23006 Jaén (Jaén) ES

72 Inventor/es:

FRANCO JAIME, Diego;
ARÁNEGA JIMÉNEZ, Amelia Eva y
HERNÁNDEZ TORRES, Francisco

54 Título: **MicroARN modificados**

57 Resumen:

MicroARN modificados.

La presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico, preferiblemente, pre-microARN modificados por su unión a moléculas fluorescentes de tipo FRET, pero que presentan una estructura molecular semejante a la endógena, permitiendo así su metabolización a través de su ruta biológica de actuación dentro de su célula diana. Adicionalmente, la presente invención describe los diferentes usos de los pre-microARN modificados, tanto para terapia como para la investigación de los diferentes patrones de maduración y procesos biológicos en los que los miRNAs están inmersos.

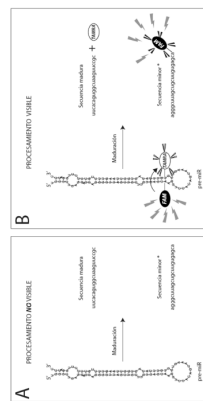


FIGURA 1

ES 2 536 580 B1

MicroARN modificados**DESCRIPCIÓN**

5 La presente invención se refiere a pre-microARNs que están marcados con al menos dos moléculas fluorescentes en una posición determinada dentro de la molécula lineal del pre-microARN, donde el espectro de emisión de una de las moléculas fluorescentes, denominada “donadora” es capaz de activar el espectro de absorción de la otra molécula fluorescente, denominada “receptora”. Además, la presente
 10 invención también se refiere al uso de dichos pre-microARNs como medicamentos y específicamente para el tratamiento de patologías relacionadas con microARNs y a métodos para la detección y trazabilidad o seguimiento de la presencia de miARNs maduros en una muestra de un sujeto al que previamente se le ha administrado un pre-microARN descrito en la presente invención.

15

ESTADO DE LA TÉCNICA

Los micro ARNs (miARNs o miRNAs por sus siglas en inglés) son ARN monocatenarios cortos, con una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos, que se
 20 transcriben como un RNA primario (pri-miR) de mayor longitud, que luego es procesado para dar lugar a un precursor, pre-miRNA, de aproximadamente 70-90 nucleótidos que, habitualmente, forma una estructura en horquilla debido a apareamientos internos de sus regiones autocomplementarias (pre-microARN). Una vez producido el pre-microRNA, éste es transportado al citoplasma y procesado por la
 25 RNasa III Dicer en animales o por la nucleasa DCL1 en plantas, para producir el miRNA maduro y activo. Los microARN activos presentan la capacidad de regular la expresión de otros genes mediante diversos procesos, utilizando para ello la ruta de ribointerferencia. Con una mayor estabilidad y valor predictivo que las moléculas de ARNm, los microARNs se han convertido en una herramienta muy importante en el
 30 diagnóstico y el pronóstico de diferentes enfermedades. Este hecho convierte a estas moléculas en potenciales herramientas en el campo de la biomedicina y la terapia génica, ya que podrían modular la expresión de genes rompiendo el bucle de desregulación génica con el que ciertas patologías cursan, mejorando notablemente el cuadro clínico del paciente y su calidad de vida. Sin embargo, la homología de
 35 secuencia que presentan los microARNs, junto con una amplia abundancia y unido a sus estructuras secundarias comunes, hace que sean necesarias técnicas muy

precisas para su detección, trazabilidad y cuantificación, para que sean útiles como herramientas terapéuticas y/o diagnósticas.

En este sentido, ya en la actualidad se están utilizando microARNs como terapia para el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer, el cáncer o la cardiomiopatía hipertrófica, entre otras. El resultado, aunque está siendo esperanzador, todavía dista mucho del objetivo final, que implicaría la remisión del cuadro patológico. Las vías de administración de dichos microRNAs a los sujetos a tratar son diversas. Entre dichas vías de administración se encuentra la inyección sistémica de dichos microRNAs en el torrente sanguíneo del sujeto a tratar. Este abordaje genera un importante problema de trazabilidad de los microARNs administrados, ya que no podemos determinar cuántas de las moléculas de microRNAs inyectadas son capaces de llegar a su órgano diana y cuantas, simplemente, quedan en el torrente sanguíneo hasta que son eliminadas sin llegar a su nicho de actuación. Otra de las vías de administración de los microRNAs a un sujeto, para su tratamiento, es la inyección directa de dichos microRNAs en los órganos diana. Sin embargo, y a pesar de su naturaleza invasiva, esta metodología tampoco asegura que los microARNs administrados sean capaces de atravesar la membrana celular y llegar al citoplasma, donde estas moléculas son activadas. Además, incluso en el supuesto de que las moléculas de microARNs sean capaces de llegar al interior celular, tampoco hay modo de averiguar si están siendo procesadas y activadas.

Por lo tanto, existe una necesidad en el estado de la técnica para el desarrollo de moléculas de microARNs que permitan trazar la presencia de las mismas en el interior de cualquier órgano y/o célula de un organismo al que previamente se le han administrado dichos microARNs con fines terapéuticos y/o de diagnóstico, además de permitir distinguir en qué momento y en qué tipo celular están siendo procesadas de manera activa, dichas moléculas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Para superar los problemas previamente mencionados, la presente invención describe moléculas precursoras de microARNs, denominadas pre-microARNs modificados respecto a los pre-microARN endógenos o nativos, que permiten trazar su presencia y activación a microARN en el interior de cualquier órgano y/o tejido de un organismo, tanto *in vivo* como *in vitro*, en una muestra aislada obtenida de dicho individuo, al que

previamente se le ha administrado dichos pre-microARNs con fines terapéuticos y/o de diagnóstico. Además, gracias a los pre-microARN descritos en la presente invención se determina si dicho pre-microARN ha sido procesado y se encuentra activo como microARN en el órgano y/o tejido diana al que iba dirigido.

5

Los pre-microARN modificados según se describe en la presente invención presentan una serie de ventajas y efectos técnicos respecto a pre-microARN endógenos o incluso frente a pre-microARN o microARN modificados, que permiten además de una fácil administración sistémica de los mismos, la trazabilidad del tránsito sistémico de dichos pre-microARN, tanto con una finalidad terapéutica y/o diagnóstica, como con una finalidad científica que ayudará a conocer y describir patrones de maduración de microARNs, tanto *in vivo* como *in vitro*, que servirán para analizar los procesos biológicos en los que están implicadas dichas moléculas. Adicionalmente, el uso de dichos pre-microARNs permite conocer si han alcanzado el órgano diana al que iban dirigidos y si están en su configuración madura y activa en el interior celular.

10

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de pre-microARN, que presenta una estructura molecular semejante a la endógena, y que se caracteriza por que está unida o marcada con al menos dos moléculas fluorescentes, preferentemente fluoróforos, donde una de dichas moléculas fluorescentes, denominada “donadora”, está unida al último nucleótido de la secuencia 5p o secuencia minor de dicho pre-miRNA y la otra molécula fluorescente, denominada “receptora” o “aceptora”, está unida en el nucleótido complementario al nucleótido marcado de la secuencia 5p, en la secuencia 3p o secuencia madura, y en donde además, el espectro de emisión de la molécula donadora excita al espectro de absorción de la molécula receptora (Figura 1).

20

25

Los pre-microARN diseñados en la presente invención, como hemos mencionado previamente, presentan una estructura semejante a la estructura endógena para permitir así la metabolización de los mismos a través de su ruta biológica de actuación dentro de la célula y posteriormente su detección mediante el análisis de la fluorescencia emitida, haciendo uso de la tecnología FRET (*Fluorescent Resonance Energy Transger*, en sus siglas en inglés). Este diseño permite tener un pre-microARN, precursor de un microARN que emite fluorescencia al excitarse con una determinada longitud de onda pero que, al ser metabolizado en su configuración

30

35

molecular activa, podrá ser trazada su localización y estado de activación, mediante la excitación-emisión con otra longitud de onda diferente.

La tecnología FRET implica la participación de dos fluoróforos a los que se les denomina comúnmente como pareja o par de sondas o fluoróforos FRET, donde uno de ellos, denominado “fluoróforo aceptor” es excitado por la longitud de onda que emite el otro “fluoróforo donador” después de que éste último fuese excitado previamente por una radiación electromagnética a una determinada longitud de onda, específicamente a la longitud de onda de su pico de absorbancia. La aceptación de la energía donada por un aceptor FRET requiere el cumplimiento de dos premisas. La compatibilidad entre el aceptor y donador, así como la proximidad física entre ellos. Un aceptor compatible es una molécula cuyo espectro de absorción se solapa con el espectro de emisión de una molécula donadora. Así, si el espectro de absorbancia del aceptor solapa con el espectro de emisión del donador, la energía emitida por el donador o emisor será capaz de excitar a dicho aceptor, siempre y cuando ambos se encuentren lo suficientemente cerca físicamente. La tecnología FRET ya ha servido para generar las “*Molecular Beacons*” o las “*Sondas Taqman*”. Estas moléculas son oligonucleótidos modificados a los que se les añaden elementos de naturaleza fluorescente que tienen como finalidad monitorizar el proceso de amplificación de ADN en tiempo real que tiene lugar durante una PCR (*Polymerase Chain Reaction*). En cambio, en la presente invención la tecnología FRET se utiliza para el marcaje de oligonucleótidos, específicamente pre-microARNs, a los que se les une la pareja de fluoróforos FRET compatible para su trazabilidad tanto *in vitro* sobre cultivos celulares, como *in vivo*, pudiendo ser inyectadas de manera sistémica o localizada a un individuo vivo. Por lo tanto, dichos pre-microARN servirán para mimetizar el comportamiento de microRNAs endógenos y monitorizar el proceso de maduración que los conduce a su conformación madura y activa.

A efectos de la presente invención, los términos “microARN” o “miARN”, que se usan indistintamente a lo largo del presente documento, se utiliza de acuerdo con su sentido corriente y normal y se refiere a una molécula de microARN que se encuentra en organismos eucariotas y que está implicada en la regulación génica basada en ARN. Véase, por ejemplo, Carrington et al., *Science*, 301(5631):336-338, 2003, que se incorpora aquí por referencia. El término miARN se utiliza para referirse a la molécula de ARN procesado a partir de un precursor o pre-miARN. A efectos de la presente invención, los términos “pre-microRNA”, pre-miRNA”, pre-microARN” y pre-

microARN", se utilizan indistintamente y se refieren a una molécula de ácido nucleico de aproximadamente 70-90 nucleótidos que, habitualmente, forma una estructura en horquilla debido a apareamientos internos y que en el citoplasma, tras ser procesados por nucleasas dan lugar a los miRNAs maduros y activos. Se han identificado y secuenciado miARNs y pre-microARNs en diferentes organismos (<http://www.mirbase.org/>). A efectos de la presente invención, un experto medio en el campo técnico de la misma puede llegar a la obtención de la secuencia y caracterización molecular de los miARNs y pre-miRNAs endógenos, por ejemplo en la base de datos <http://www.mirbase.org/>, para construir los pre-miRNAs de la invención, según se describe en la presente invención. Además, la presente invención no pretende ser limitante respecto a los pre-miARNs y miARN conocidos en el momento de la presentación de la invención, sino que puede aplicarse a cualquier pre-miARN y miARN que pueda ser detectado como nuevo en un futuro.

En la presente invención, el término "fluoróforo" o "sonda" se refiere a una molécula fluorescente que posee un grupo funcional que absorbe energía de una longitud de onda específica y la emite en otra determinada de mayor longitud de onda (es decir, con menor energía), y en el que la cantidad de energía emitida (rendimiento cuántico) depende tanto del propio grupo funcional fluorescente como de su ambiente químico.

El término "fluoróforo aceptor" se refiere, en la presente invención, a una especie que participa en un proceso de transmisión de energía de resonancia (FRET) aceptando la energía transferida por otra especie que se encuentra en estado excitado y que se le denomina "donador".

El término "fluoróforo donador" se refiere, en la presente invención, a una especie que participa en un proceso de transmisión de energía de resonancia (FRET) donando su energía cuando se encuentra en estado excitado a otra especie que se encuentra en estado de reposo y que se le denomina "aceptor".

En una realización preferida de los pre-miARNs de la invención, estos se caracterizan por que las moléculas fluorescentes son preferentemente parejas de sondas FRET.

En una realización más preferida de los pre-miARN de la invención, las parejas de sondas FRET se seleccionan de entre cualquiera de las que se muestran en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1. Parejas de sondas FRET.

Donador	Aceptor
Fluoresceína (FAM)	Tetrametilrhodamina (TAMRA)
Ácido iodoacetil-amino-naftaleno-sulfónico (IAEDANS)	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
IAEDANS	5-(Iodoacetamido)fluoresceína (5-IAF)
Fluoresceína (FAM)	Fluoresceína (FAM)
Ácido aminoetil-amino-naftaleno-sulfónico (EDANS)	4-(4-dimetilaminofenil)azobenzoico (DABCYL)
Triptófano	IAEDANS
Triptófano	Dansyl
Triptófano	Pireno
Dansyl	Fluoresceína (FAM)
Naftaleno	Dansyl
Pireno	Coumarina
β -Ficoeritrina	Cianina (Cy5)

5

En una realización más preferida de los pre-miARN de la invención, las parejas de sondas FRET se seleccionan del grupo que comprende: FAM-TAMRA y β -Ficoeritrina-Cianina (Cy5).

10

Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere al uso de los pre-microARN descritos en la presente invención para la elaboración de un medicamento. Alternativamente, los pre-microARN de la invención pueden usarse como medicamento.

15

El término "medicamento", tal y como se usa en esta descripción, hace referencia a cualquier sustancia usada para la prevención, el diagnóstico, el alivio, el tratamiento o la curación de enfermedades en el hombre y los animales. Preferentemente, el medicamento de la invención se refiere a los pre-miRNAs descritos aquí.

Otro de los objetos descritos en la presente invención se refieren al uso de los pre-microARN de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o patologías asociadas a la desregulación de la expresión de miRNAs. Alternativamente, la presente invención describe los pre-microARNs para su uso en el tratamiento de enfermedades o patologías asociadas a la desregulación de la expresión de miRNAs.

A efectos de la presente invención las enfermedades o patologías asociadas a la desregulación de la expresión de microARNs se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: cáncer, alzheimer, diabetes, enfermedades cardíacas y enfermedades inmunológicas.

Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos un pre-microARN de la invención.

En una realización más preferida, la composición de la invención se caracteriza por que es una composición farmacéutica o veterinaria.

En otra realización preferida, la composición de la invención se caracteriza por que además comprende al menos un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente o veterinariamente aceptable.

A efectos de la presente invención el término excipientes y/o vehículos farmacéuticamente y/o veterinariamente aceptables se refiere a componentes de un compuesto farmacológico distintos del principio activo (definición obtenida de la Agencia Europea del Medicamento - AEM). Incluyen preferiblemente un "portador, adyuvante y/o vehículo". Los portadores son formas en las que se incorporan sustancias para mejorar la administración y la eficacia de los fármacos. Se usan portadores de fármacos en sistemas de administración de fármacos tales como la tecnología de liberación controlada para prolongar las acciones del fármaco in vivo, disminuir el metabolismo del fármaco y reducir la toxicidad del fármaco. También se usan portadores en diseños para aumentar la eficacia de la administración del fármaco a los sitios diana de acciones farmacológicas (U.S. National Library of Medicine. National Institutes of Health). Adyuvante es una sustancia añadida a una formulación de productos farmacológicos que afecta a la acción del principio activo de una manera previsible. Vehículo es un excipiente o una sustancia, preferiblemente sin

acción terapéutica, usada como medio para proporcionar volumen para la administración de medicamentos (Stedman's Medical Spellchecker, © 2006 Lippincott Williams & Wilkins). Tales portadores, adyuvantes o vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los del petróleo o de
 5 origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, excipientes, disgregantes, agentes humectantes o diluyentes. Se describen portadores farmacéuticos o veterinarios adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. La selección de estos excipientes y las cantidades que van a usarse dependerán de la forma de
 10 aplicación de la composición farmacéutica o veterinaria.

La dosificación diaria para seres humanos y animales puede variar dependiendo de factores que tienen su base en la respectiva especie u otros factores, tales como edad, sexo, peso o grado de enfermedad y etc. Las formulaciones se pueden preparar
 15 según métodos convencionales tales como los que se describen en las Farmacopeas Española, Europea o de Estados Unidos de América, o en textos de referencia similares, por ejemplo "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

20 Los compuestos y composiciones de esta invención pueden usarse con otros fármacos para proporcionar una terapia de combinación. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición, o pueden proporcionarse como una composición aparte para la administración al mismo tiempo o en un tiempo diferente.

25 En otra realización preferida, la composición de la invención se caracteriza por que además puede comprender al menos otro principio activo.

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente
 30 activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una
 35 forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Otro aspecto de la invención se refiere a la composición aquí descrita para su uso en el tratamiento de enfermedades o patologías asociadas a la desregulación de la expresión de miRNAs. En una realización preferida, dichas patologías se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: cáncer, alzheimer, diabetes, enfermedades
5 cardíacas y enfermedades inmunológicas.

Las composiciones farmacéuticas, veterinarias y medicamentos de la presente invención pueden utilizarse en un método de tratamiento y/o de prevención de forma aislada o conjuntamente con otros compuestos farmacéuticos destinados al
10 tratamiento y/o prevención de las enfermedades o patologías asociadas a la desregulación de la expresión de microARNs. Preferiblemente, dichas patologías se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: cáncer, alzheimer, diabetes, enfermedades cardíacas y enfermedades inmunológicas. Las composiciones farmacéuticas y veterinarias de la presente invención pueden formularse para su
15 administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica.

Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica,
20 intraarticular, intrasinovial, intralesional, intraarterial, intracardíaca, intramuscular, intranasal, subcutánea, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, mediante administración percutánea, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter. La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la
25 edad, peso, sexo o tolerancia del individuo. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de las composiciones farmacéuticas de la invención que produzca el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichas composiciones farmacéuticas y el efecto terapéutico a conseguir.

30 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento, o alternatively, a la composición de la invención para su uso como medicamento. En una realización preferida, el medicamento es para el tratamiento de enfermedades o patologías asociadas a la
35 desregulación de la expresión de microARNs. En una realización más preferida, las

patologías se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: cáncer, alzheimer, diabetes, enfermedades cardíacas y enfermedades inmunológicas.

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere a un método *in vitro* para detectar la presencia de un miRNA maduro en una muestra biológica obtenida de un individuo al que previamente se le ha administrado un pre-miRNA o una composición según se describen en la presente invención, que comprende las siguientes etapas:

- a) excitar la muestra biológica a la longitud de onda de absorción de la molécula fluorescente donadora;
- b) obtener una imagen a la longitud de onda de emisión de la molécula fluorescente donadora y, opcionalmente,
- c) obtener una imagen a la longitud de onda de emisión de la molécula fluorescente receptora,

donde,

- i) la presencia de fluorescencia en la imagen obtenida a la longitud de onda de emisión de la molécula fluorescente donadora es indicativo de que el pre-miRNA ha sido procesado a miRNA maduro en el órgano diana y
- ii) la presencia de fluorescencia en la imagen obtenida a la longitud de onda de emisión de la molécula fluorescente receptora es indicativo de que el pre-miRNA no ha sido procesado a miRNA maduro en el órgano diana.

Una "muestra biológica aislada" incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. A efectos de la presente invención, la muestra biológica es preferentemente una muestra de biopsia obtenida de un órgano diana.

El término "individuo" o "sujeto" usado indistintamente a lo largo del presente documento, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término "individuo" no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

En una realización preferida de este aspecto de la invención la muestra biológica aislada de un individuo es una muestra de células o tejido, preferentemente una muestra de una biopsia. Dichas muestras biológicas pueden obtenerse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, éste se caracteriza por que las moléculas fluorescentes donadoras se seleccionan de la lista que comprende cualquiera de las siguientes: fluoresceína (FAM), ácido iodoacetil-amino-naftaleno-sulfónico (IAEDANS), ácido aminoetil-amino-naftaleno-sulfónico (EDANS), triptófano, dansyl, naftaleno, pireno y β -ficoeritrina.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, éste se caracteriza por que las moléculas fluorescentes receptoras se seleccionan de la lista que comprende cualquiera de las siguientes: tetrametilrhodamina (TAMRA), isotiocianato de fluoresceína (FITC), 5-(Iodoacetamido) de fluoresceína (5-IAF), fluoresceína (FAM), 4-(4-dimetilaminofenil)azobenzoico (DABCYL), IAEDANS, dansyl, pireno, coumarina, cianina (Cy5).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, éste se caracteriza por que las imágenes de las etapas b) y opcionalmente c) se obtienen mediante microscopio de fluorescencia.

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere a un método de tratamiento y/o prevención de enfermedades o patologías asociadas a la desregulación de la expresión de microARNs que comprende la administración a un individuo en necesidad del mismo de al menos un pre-miRNA de la invención o de la composición según se describe en la presente invención.

En una realización preferida las enfermedades o patologías asociadas a la desregulación de la expresión de microARNs se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: cáncer, alzheimer, diabetes, enfermedades cardíacas y enfermedades inmunológicas.

El término "terapia" o "tratamiento", tal como aquí se utiliza, hace referencia al conjunto de medios de cualquier clase, higiénicos, farmacológicos, quirúrgicos o físicos, cuya finalidad es la prevención y/o curación o alivio de una enfermedad o patología o de sus síntomas. En un caso concreto, dicho tratamiento es un tratamiento farmacológico, es decir, un tratamiento que comprende la administración de un fármaco a un sujeto para prevenir, aliviar y/o curar una enfermedad o para aliviar, reducir o eliminar uno o más síntomas asociados a dicha enfermedad. En el contexto

de la presente invención, el tratamiento aplicado al sujeto es un tratamiento de tipo farmacológico basado en la administración de los pre-miRNAs o de la composición de la invención y está dirigido a tratar una patología o enfermedad susceptible de ser tratada con dicho fármaco.

5

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

FIG. 1. Representación esquemática de la patente. A) maduración natural del pre-miR. Este procesamiento no puede ser monitorizado. B) maduración del pre-miR modificado por esta patente. Este procesamiento puede ser monitorizado mediante una pareja de fluoróforos FRET. Fluoresceína (FAM) y TAMRA en este ejemplo

20

Figura 2. Resultados *in vitro*. Las flechas blancas indican puntos en los que el procesamiento del pre-miR no ha comenzado. El mantenimiento íntegro de la molécula de pre-miR hace que sólo pueda detectarse luz en el espectro del rojo (TAMRA). Por el contrario, las flechas negras indican los lugares dónde se esta madurando el pre-miR. Puede detectarse luz del espectro verde (FAM), debido al proceso de maduración, y del espectro rojo, debido a la presencia de moléculas de pre-miR remanentes que aún no han madurado..

25

EJEMPLOS

30

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

35

Ejemplo 1. Análisis *in vitro* de la trazabilidad y maduración de microARNs mediante la administración de los pre-microARNs de la invención.

Fibroblastos 3T3 de ratón fueron cultivados a 37°C y 5% de CO₂ en medio de cultivo DMEN *High glucose* (Invitrogen) suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomicina. Una vez
 5 las células adquirían un 80% de confluencia (tras 24 horas aproximadamente de cultivo), el medio se reemplazó por medio nuevo suplementado al que no se le añadía ni penicilina ni estreptomicina para a continuación llevar a cabo la transfección de dichos cultivos celulares con un pre-microRNA marcado según se describe en el presente documento.

10

El pre-miRNA utilizado es el pre-miRNA 27a de ratón (SEQ ID NO: 1) (UGGCCUGAGGAGCAGGGCUUAGCUGCUUGUGAGC**A**AGGUCCACAGCAAAGUC
 15 G**U**GUUCACAGUGGCUAAGUUCGCCCCUGGACCC) que está marcado con dos moléculas fluorescentes, los fluoróforos FAM (adenina subrayada y en negrita) y TAMRA (uracilo subrayado y en negrita) en los nucleótidos 35 y 54, respectivamente. El marcaje de dichos nucleótidos específicos con los fluoróforos FAM y TAMRA se encargó a la empresa BioSynthesis (USA). Como pre-miRNA control se utilizó el pre-miRNA 27a (SEQ ID NO: 1) marcado con una única molécula fluorescente, un fluoróforo FAM en la misma posición que en el pre-miRNA de la invención, nucleótido
 20 35.

20

FAM presenta un pico de absorbancia y emisión de 494 nm y 518 nm, respectivamente. TAMRA presenta un pico de absorbancia y emisión de 565 nm y 580 nm, respectivamente. Si FAM y TAMRA se posicionan lo suficientemente próximos, el
 25 pre-miARN modificado de la invención podrá ser excitado con una longitud de onda de 494 nm generando un pico de emisión a 580 nm. Esto es debido a que el fluoróforo FAM (donador) transferirá su energía al fluoróforo TAMRA (aceptor). Sin embargo, si el pre-miARN se desorganiza, por ejemplo debido a un procesamiento similar al que acontece durante los procesos de maduración de microRNAs endógenos, la
 30 excitación a 494 nm dará lugar a un pico de emisión a 518 nm, ya que deja de cumplirse el criterio de proximidad entre ambos fluoróforos.

30

La transfección de los cultivos celulares de fibroblastos con los pre-miRNA descritos previamente (pre-miRNA de la invención y pre-miRNA control) se llevó a cabo
 35 mediante el kit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración final de los pre-miRNAs fue de 80 nM. Transcurridas 24

horas de la adición de los pre-microRNAs se analizaron los resultados obtenidos mediante el un microscopio confocal acoplado a una cámara fotográfica para la obtención de las imágenes.

- 5 Como se puede observar en la Figura 2A, el pre-microRNA 27a de la invención ha sido procesado a miRNA 27a en el interior de los fibroblastos, y por lo tanto es un miRNA 27a maduro, ya que como se puede ver en dicha figura (ver flechas negras) se observan puntos verdes cuando el cultivo se excita con una longitud de onda de 494 nm y se captura la imagen a una longitud de onda de 518 nm. En la figura 2B el cultivo
- 10 ha sido excitado con una longitud de onda de 494 nm y se ha capturado la imagen a una longitud de onda de 580 nm. Se observan multitud de puntos rojos (flechas blancas) que indican que el pre-miRNA de la invención no ha sido procesado ni se ha transformado en miRNA maduro. Al no haber sido el pre-miRNA 27a procesado en el citoplasma de los fibroblastos, los dos fluoróforos FAM-TAMRA están juntos
- 15 espacialmente y la emisión de FAM excita a TAMRA. Por otro lado, existen lugares de colocalización de señal verde y roja (Figura 2A-B, flechas negras) Esto es debido a que puede detectarse luz del espectro verde (FAM), como consecuencia del proceso de maduración, y del espectro rojo, como consecuencia de la presencia de moléculas de pre-miR remanentes que aún no han madurado.

REIVINDICACIONES

1. Pre-microARN modificado caracterizado por que está marcado con al menos dos moléculas fluorescentes donde una de dichas moléculas fluorescentes denominada “donador” está unida al último nucleótido de la secuencia 5p del pre-miRNA y la otra molécula fluorescente, denominada “receptor”, está unida al nucleótido complementario del nucleótido marcado en la secuencia 5p, en la secuencia 3p, y donde el espectro de emisión de la molécula donadora excita al espectro de absorción de la molécula receptora.
2. Pre-microARN según la reivindicación 1 dónde las moléculas fluorescentes donadoras se seleccionan de la lista que comprende: fluoresceína (FAM), ácido iodoacetil-amino-naftaleno-sulfónico (IAEDANS), ácido aminoetil-amino-naftaleno-sulfónico (EDANS), triptófano, dansyl, naftaleno, pireno y β -ficoeritrina.
3. Pre-microARN según la reivindicación 1 dónde las moléculas fluorescentes receptoras se seleccionan de la lista que comprende: tetrametilrhodamina (TAMRA), isotiocianato de fluoresceína (FITC), 5-(Iodoacetamido) de fluoresceína (5-IAF), fluoresceína (FAM), 4-(4-dimetilaminofenil)azobenzoico (DABCYL), IAEDANS, dansyl, pireno, coumarina, cianina (Cy5).
4. Pre-microARN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 caracterizado por que las moléculas fluorescentes son preferentemente parejas de moléculas fluorescentes FRET.
5. Pre-microARN según la reivindicación 4 donde las parejas de moléculas fluorescentes FRET se seleccionan de la lista que comprende cualquiera de las enumeradas en la Tabla 1. Parejas de sondas FRET, de la descripción.
6. Pre-microARN según la reivindicación 5 dónde la pareja de moléculas fluorescentes FRET se seleccionan de la lista que comprende: FAM-TAMRA y β -ficoeritrina-fianina (Cy5).
7. Uso de los pre-microARN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la elaboración de una composición farmacéutica.

8. Composición que comprende al menos un pre-microARN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 5 9. Composición según la reivindicación 8 caracterizada por que es una composición farmacéutica o veterinaria.
- 10 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9 caracterizada porque además comprende excipientes y/o vehículos farmacéutica y/o veterinariamente aceptables.
- 11 11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 caracterizada por que además comprende al menos otro principio activo.
- 15 12. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para la elaboración de un medicamento.
- 20 13. Método *in vitro* para detectar la presencia de un miRNA maduro en una muestra biológica obtenida de un individuo al que previamente se le ha administrado un pre-miRNA según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que comprende las siguientes etapas:
 - a) excitar la muestra biológica a la longitud de onda de absorción de la molécula fluorescente donadora;
 - b) obtener una imagen a la longitud de onda de emisión de la molécula fluorescente donadora y, opcionalmente,
 - 25 c) obtener una imagen a la longitud de onda de emisión de la molécula fluorescente receptora,donde,
 - i) la presencia de fluorescencia en la imagen obtenida a la longitud de onda de emisión de la molécula fluorescente donadora es indicativo de que el
 - 30 pre-miRNA ha sido procesado a miRNA en el órgano diana y
 - ii) la presencia de fluorescencia en la imagen obtenida a la longitud de onda de emisión de la molécula fluorescente receptora es indicativo de que el pre-miRNA no ha sido procesado a miRNA en el órgano diana.
- 35 14. Método *in vitro* según la reivindicación 13 caracterizado por que la muestra biológica se selecciona de entre cualquiera de las siguientes: células y/o tejidos.

15. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14 caracterizado por que las moléculas fluorescentes donadoras se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: fluoresceína (FAM), ácido iodoacetil-amino-naftaleno-sulfónico (IAEDANS), ácido aminoetil-amino-naftaleno-sulfónico (EDANS), triptófano, dansyl, naftaleno, pireno y β -ficoeritrina.
5
16. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14 caracterizado por que las moléculas fluorescentes receptoras se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: tetrametilrhodamina (TAMRA), isotiocianato de fluoresceína (FITC), 5-(Iodoacetamido) de fluoresceína (5-IAF), fluoresceína (FAM), 4-(4-dimetilaminofenil)azobenzoico (DABCYL), IAEDANS, dansyl, pireno, coumarina, cianina (Cy5).
10
17. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 caracterizado por que las moléculas fluorescentes son preferentemente parejas de moléculas fluorescentes FRET.
15
18. Método *in vitro* según la reivindicación 17 donde las parejas de moléculas fluorescentes FRET se seleccionan de entre cualquiera de las enumeradas en la Tabla 1. Parejas de sondas FRET, de la descripción.
20
19. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 18 dónde la pareja de moléculas fluorescentes FRET se seleccionan de la lista que comprende FAM-TAMRA y β -ficoeritrina-fianina (Cy5).
25
20. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19 caracterizado por que las imágenes de las etapas b) y, opcionalmente en la etapa c), se obtienen mediante microscopio de fluorescencia.

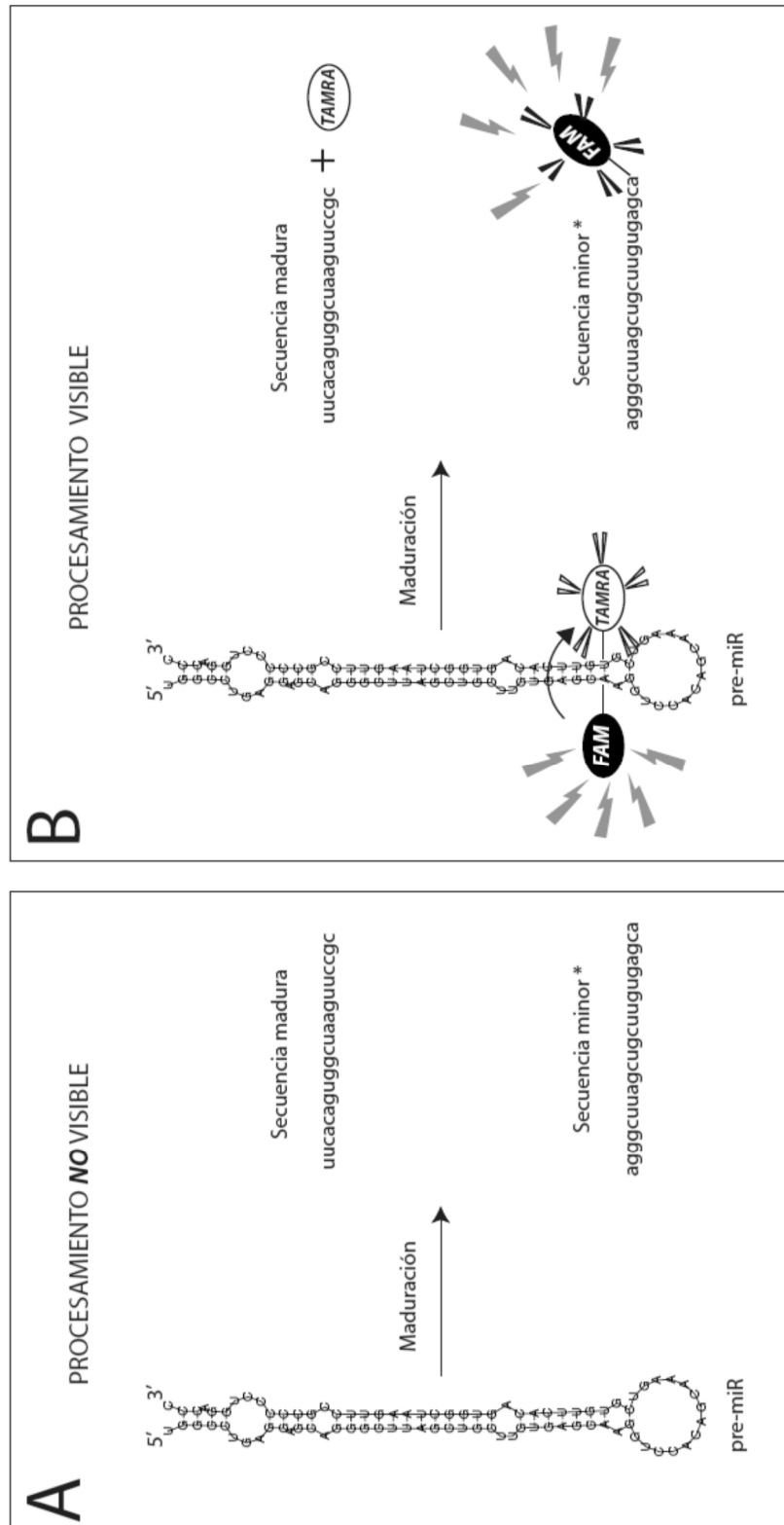


FIGURA 1

Pre-miR_FAM-TAMRA patente 30 pM

Fibroblastos 3T3

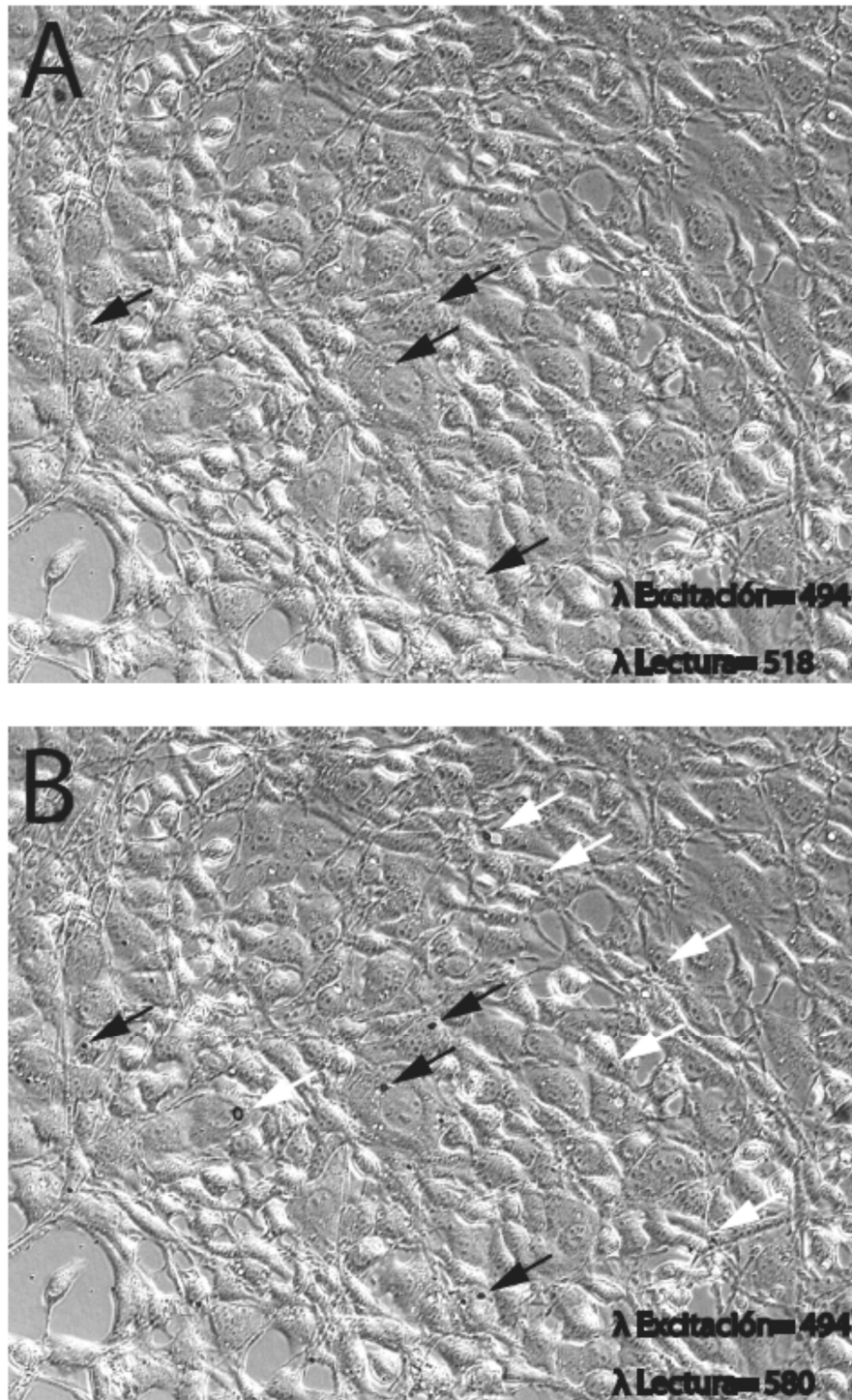


FIGURA 2

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Jaén
 <120> MicroARN modificados
 <130> ES1881.14
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 87
 <212> RNA
 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> base marcada con el fluoróforo FAM

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (54)..(54)
 <223> base marcada con el fluoróforo TAMRA

 <400> 1
 uggccugagg agcagggcuu agcugcuugu gagcaagguc cacagcaaag ucguguucac 60
 aguggcuaag uuccgcccc uggaccc 87



- ②① N.º solicitud: 201431474
②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.10.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SHIBO, L. <i>et al.</i> Terminal dual-labeling of a transcribed RNA. Bioorganic & medicinal chemistry letters England 01.12.2013 VOL: 23 No: 23 Págs: 6304-6306 ISSN 1464-3405 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.bmcl.2013.09.079 pubmed:24135725. Ver todo el documento.	1-20
X	DAVIES, B.P., <i>et al.</i> A fluorescence probe for assaying micro RNA maturation. Bioorganic & Medicinal Chemistry, PERGAMON, GB 2007 VOL: 16 No: 1 Págs: 49-55 ISSN 0968-0896 Doi: doi:10.1016/j.bmc.2007.04.055. Ver todo el documento.	1-20
X	SCHÖNIGER C., <i>et al.</i> Perspectives in targeting miRNA function. Bioorganic & medicinal chemistry England 15.10.2013 VOL: 21 No: 20 Págs: 6115-6118 ISSN 1464-3391 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.bmc.2013.03.040 pubmed:23602624. Ver todo el documento, especialmente el apartado 4.	1-20
A	HUNT E.A., <i>et al.</i> Direct detection and quantification of microRNAs. Analytical biochemistry United States 1 Abr 2009 01.04.2009 VOL: 387 No: 1 Págs: 1-12 ISSN 1096-0309 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.ab.2009.01.011 pubmed:19454247. Ver todo el documento, especialmente el apartado 2.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
23.04.2015

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/68 (2006.01)

G01N21/64 (2006.01)

G01N33/52 (2006.01)

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

C12Q, G01N

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

INVENES, EPODOC, WPIAP, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTUS5, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, TXTCA1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, XPESP2.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.04.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-20	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-20	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SHIBO, L. <i>et al.</i> Bioorganic & medicinal chemistry letters England 01.12.2013 VOL: 23 No: 23 Págs: 6304-6306 ISSN 1464-3405 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.bmcl.2013.09.079 pubmed:24135725.	01.12.2013
D02	DAVIES, B.P., <i>et al.</i> Bioorganic & Medicinal Chemistry, PERGAMON, GB 2007 VOL: 16 No: 1 Págs: 49-55 ISSN 0968-0896 Doi: doi:10.1016/j.bmc.2007.04.055.	2007
D03	SCHÖNIGER C. <i>et al.</i> Bioorganic & medicinal chemistry England 15.10.2013 VOL: 21 No: 20 Págs: 6115-6118 ISSN 1464-3391 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.bmc.2013.03.040 pubmed:23602624.	15.10.2013
D04	HUNT E.A., <i>et al.</i> Analytical biochemistry United States 1 Abr 2009 01.04.2009 VOL: 387 No: 1 Págs: 1-12 ISSN 1096-0309 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.ab.2009.01.011 pubmed:19454247.	01.04.2009

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

La presente solicitud de patente describe y reivindica pre-microARN (pre-miRNA) modificados caracterizados porque están marcados con dos moléculas fluorescentes, de modo que la molécula fluorescente donadora está unida al último nucleótido de la secuencia 5p del pre-miRNA y la molécula receptora está unida en la secuencia 3p al nucleótido complementario del nucleótido marcado en la secuencia 5p, y donde el espectro de emisión de la molécula donadora excita el espectro de absorción de la molécula receptora. Se reivindican las diferentes moléculas fluorescentes que se podrían usar. También se reivindica el uso farmacéutico de estos pre-miRNAs, y un método in vitro para detectar la presencia de un miRNA maduro en una muestra midiendo la fluorescencia emitida tras administrarle un pre-miRNA marcado como los de las reivindicaciones anteriores.

NOVEDAD y ACTIVIDAD INVENTIVA

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que describa los pre-miRNAs objeto de la solicitud, sus usos y el método tal y como están reivindicados, por lo que las reivindicaciones 1 a 20 de la solicitud son nuevas según el artículo 6 de la Ley 11/1986 de Patentes.

Se han encontrado documentos que divulgan pre-miRNAs marcados con dos moléculas fluorescentes, que afectan la actividad inventiva las reivindicaciones 1 a 20 de la solicitud según el artículo 8 de la Ley 11/1986 de Patentes, pues llevarían al experto en la materia de forma evidente al objeto de la invención.

Los documentos D01 y D02 se consideran los más cercanos del estado de la técnica. En ellos se describen pre-miRNAs marcados en los extremos 5' y 3' con dos sondas fluorescentes, un donador FRET y un "quencher" (concretamente, las moléculas fluoresceína y DABCYL, que el solicitante incluye en las reivindicaciones 2 y 3), que corresponderían a la molécula donadora y receptora de la reivindicación 1 de la presente solicitud. Como en la solicitud, sólo se mide fluorescencia emitida por la molécula donadora si el pre-miRNA ha sido procesado a miRNA. Aunque en estos documentos del estado de la técnica no se mide la fluorescencia de la molécula receptora, como en la solicitud, esa medida es algo evidente de realizar, y no aporta mayor información que la medida única de la fluorescencia emitida por la molécula donadora. Por otra parte, el lugar donde se sitúan las moléculas fluorescentes en los pre-miRNAs de la solicitud y de los documentos D01 y D02 no son los mismos, pero resulta obvio que las dos opciones resuelven igualmente el problema técnico planteado en la solicitud: detectar la maduración de pre-miRNAs a miRNAs maduros usando pre-miRNAs marcados con dos moléculas fluorescentes, de modo que la fluorescencia emitida es diferente en el pre-miRNA que en el miRNA ya procesado. Al tratarse de dos alternativas igualmente útiles para resolver el mismo problema técnico, ni las reivindicaciones 1 a 6, de producto, ni las reivindicaciones 7 a 12, de uso, ni las reivindicaciones 13 a 20, de método, tienen actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes, a la luz de la información divulgada en D01 y D02

En el documento D03 se divulga también un pre-miRNA marcado con dos sondas fluorescentes, un donador y un "quencher", en los extremos 5' y 3', de modo que la medida de la fluorescencia emitida por el fluoróforo donador es indicativa del procesamiento del pre-miRNA a miRNA maduro. La diferencia con los documentos mencionados anteriormente es que en D03 no se especifica que las moléculas fluorescentes unidas al pre-miRNA sean fluoresceína y DABCYL, sino que habla de un fluoróforo, en general, unido al extremo 5', y de un "quencher" unido en 3'. Dado que el uso de moléculas fluorescentes es ampliamente extendido en este campo técnico, resultará evidente para el experto en la materia utilizar las moléculas fluorescentes adecuadas para conseguir el efecto deseado. Por tanto, igual que los documentos D01 y D02, el documento D03 afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 20 de la presente solicitud, según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

Finalmente, se cita el documento D04 por considerarse cercano a la solicitud, pero sin afectar su novedad ni su actividad inventiva. Se tratar de una revisión de los métodos de detección de miRNAs, que incluye métodos fluorescentes, además de colorimétricos, bioluminiscentes, enzimáticos y electroquímicos).