

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 954 008**

21 Número de solicitud: 202230311

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

06.04.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.11.2023

71 Solicitantes:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (100.0%)

Avda. Blasco Ibáñez, 13

46010 Valencia (Valencia) ES

72 Inventor/es:

CERRO HERREROS, Estefanía;

LLAMUSÍ TROISI, Beatriz;

MORENO CERVERA, Nerea;

GONZÁLEZ MARTÍNEZ, Irene;

OVERBY, Sarah Joann y

ARTERO ALLEPUZ, Rubén Darío

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **Antagonistas de los microRNA humanos miR-100, miR-20, miR-222, miR-181, y miR-92 y usos de los mismos**

57 Resumen:

Antagonistas de los microRNA humanos miR-100, miR-20, miR-222, miR-181, y miR-92 y usos de los mismos.

La invención proporciona inhibidores de los microRNA humanos miR-100, miR-20a, miR-222, miR-181c, o miR-92a que son represores de los genes MBNL1 y/o MBNL2, y el uso de dichos inhibidores como medicamento, especialmente frente a distrofia miotónica tipo 1.

ES 2 954 008 A1

Antagonistas de los microRNA humanos miR-100, miR-20, miR-222, miR-181, y miR-92
y usos de los mismos

DESCRIPCIÓN

5 CAMPO TÉCNICO

La invención se refiere al campo de la biomedicina. En particular, la invención se refiere a moléculas que son antagonistas de los microRNA humanos miR-100, miR-20, miR-222, miR-181, y miR-92 y a su uso como medicamento, preferiblemente como medicamento para el tratamiento de la distrofia miotónica de tipo 1.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La distrofia muscular (DM) representa un grupo de más de 30 enfermedades genéticas caracterizadas por una progresiva debilidad y degeneración de los músculos esqueléticos que controlan el movimiento. Algunas formas de DM se presentan en la infancia o la niñez, mientras que otras pueden no aparecer hasta una edad mediana o posterior. El pronóstico para las personas con DM varía según el tipo y la progresión del trastorno. Algunos casos pueden ser leves y progresar muy lentamente a lo largo de una vida normal, mientras que otros producen debilidad muscular grave, discapacidad funcional y pérdida de la capacidad de caminar. Dentro de las distrofias musculares se distinguen aquellas en las que los pacientes tienen problemas para relajar la musculatura después de una contracción voluntaria, lo que se conoce como miotonía. Hay dos tipos de distrofia miotónica, el tipo 1 (DM1) y el tipo 2 (DM2).

La DM1 se clasifica a su vez en tres subtipos que a veces tienen señales y síntomas en común: leve, clásico, y congénito (que está presente al nacer). Los síntomas de la forma leve son los menos graves, con una esperanza de vida normal. La forma clásica se caracteriza por debilidad muscular y atrofia, incapacidad de los músculos de relajarse rápidamente después de contraerse (miotonía), cataratas, y función anormal del corazón. Algunos adultos con la forma clásica pueden tener discapacidad física. Por último, la forma congénita se caracteriza por debilidad generalizada grave al nacer (hipotonía), que resulta en problemas con la respiración y puede llevar a muerte prematura.

La DM1 es causada por mutaciones en el gen *DMPK* y se hereda de manera autosómica dominante. En particular, estas mutaciones se corresponden con la expansión de una repetición del trinucleótido CTG en la región 3' no codificante del gen *DMPK*. Un número de repeticiones mayor a 34 CTG se considera anormal, y las pruebas genéticas moleculares

detectan variantes patógenas en casi el 100% de los individuos afectados. La expresión de alelos expandidos en DM1 da como resultado la retención nuclear de mRNA de DMPK mutante. Los transcritos mutantes secuestran los factores de corte y empalme (proceso al que se aludirá en adelante por el termino ingles *splicing*) que son similares a la proteína de *Drosophila* Muscleblind (MBNL, abreviatura en inglés de Muscleblind-like), lo que da lugar a un *splicing* alternativo anormal de multitud de otros transcritos y la expresión de formas fetales de las correspondientes proteínas en adultos que padecen DM1. La proteína Muscleblind de *Drosophila* tiene homólogos en vertebrados llamados MBNL1-3, que también son conocidos por su capacidad de regular el *splicing*. MBNL1 se expresa fuertemente en tejido muscular esquelético y cardíaco y durante la diferenciación de los mioblastos. Su expresión es menor en otros tejidos tales como cerebro, placenta, pulmones, hígado, riñón y páncreas. MBNL2 tiene una expresión solapante en gran medida y se detecta en corazón, cerebro, placenta, pulmones, hígado, músculo esquelético, riñones y páncreas. MBNL3, por su parte, se expresa en placenta y células satélite.

Aunque las anormalidades en el mecanismo de *splicing* se consideran el principal factor que subyace en la patogénesis de DM1, se ha visto que otros mecanismos pueden estar también implicados en esta enfermedad, tales como cambios adicionales en la expresión génica, transcritos antisentido, secuestro de otras proteínas de unión al RNA o de miRNAs, la eficacia de la traducción, la desregulación de la poliadenilación alternativa y la desregulación de miRNA.

Actualmente no existe un tratamiento específico para la debilidad progresiva en personas con DM1 y por tanto es de interés explorar nuevas estrategias terapéuticas. Entre los enfoques terapéuticos realizados en modelos animales de DM1, los resultados más interesantes derivan del bloqueo de la interacción entre MBNLs y el RNA tóxico utilizando moléculas pequeñas, péptidos, morfolidos u oligonucleótidos antisentido, y espaciómeros ("gapmers") para degradar los transcritos *DMPK* mutantes. Sin embargo, una alternativa menos explorada en DM1 es la modulación terapéutica de la expresión de los genes *MBNL1* y *MBNL2*, en particular la sobreexpresión de dichos genes para el aumento de los niveles de dichas proteínas, especialmente en los tejidos donde normalmente se transcriben. Es preferible, además, que dicho incremento de nivel se produzca, al menos, en uno o más de los tejidos y órganos relevantes donde aparecen síntomas especialmente significativos de la enfermedad, como músculo esquelético y liso, corazón y sistema nervioso. En particular, los autores de la presente invención han descrito previamente que antagonistas frente a los microRNA humanos miR-23-3p y miR-218-5p tienen potencial terapéutico en el tratamiento de DM1 al ser capaces de modular las proteínas MBNL endógenas (patente ES2659845B1).

Por tanto, dado que se sabe que los microRNAs (comúnmente abreviados como miRs) están implicados en numerosos procesos biológicos importantes como el metabolismo, el ciclo celular, la migración, la transición epitelio-mesenquimal (EMT), la diferenciación y la supervivencia celular, y patológicos como el cáncer, y dado que su regulación se puede conseguir con el uso de moléculas antagonistas, la presente invención describe antagonistas de los microRNAs miR-100, miR-20, miR-222, miR-181, y miR-92 para aumentar los niveles de la proteína MBNL1 y MBNL2, y propone el uso de dichos inhibidores en el tratamiento de la DM1.

10 SUMARIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención se refiere a un antagonista del microRNA humano miR-100 capaz de aumentar los niveles intracelulares de las proteínas MBNL1 y/o MBNL2. Preferiblemente, los niveles intracelulares de las proteínas MBNL1 y/o MBNL2 son aumentados en una célula muscular, preferiblemente en una célula muscular que presenta un fenotipo de distrofia muscular, preferiblemente distrofia muscular de tipo 1. En una realización preferida, el antagonista es una molécula de naturaleza oligonucleotídica y/o un análogo de oligonucleótidos, preferiblemente un antimiR, un blockmiR, o una esponja de microRNA.

Preferiblemente, el antagonista comprende una región de al menos 7 unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en al menos un 100% a la secuencia complementaria de la SEQ ID NO: 1.

Preferiblemente, el antagonista comprende una región de al menos 15 unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en al menos un 90% a la secuencia complementaria a cualquier región presente en la SEQ ID NO: 1.

Preferiblemente, el antagonista comprende una región de al menos 7 unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en un 100% a la secuencia complementaria a la región semilla del microRNA humano miR-100 tal y como ha sido definida ésta en la SEQ ID NO: 2.

Preferiblemente, el antagonista comprende una primera región de al menos 7 unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en un 100% a la secuencia complementaria a la región semilla del microRNA humano miR-100 tal y como ha sido definida ésta en la SEQ ID NO: 2, y donde dicho antagonista comprende además una

segunda región de al menos 7 unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos adyacentes a la primera región, donde dicha segunda región es idéntica en al menos un 90% a la secuencia complementaria a cualquier región presente en la SEQ ID NO: 1.

5

Preferiblemente, el antagonista comprende una región de al menos 7 unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 3. Preferiblemente, el antagonista comprende una región de al menos 15 unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en un 100% a cualquier región presente en la SEQ ID NO: 3. Preferiblemente, el antagonista consiste en la SEQ ID NO: 3.

10

Preferiblemente, el antagonista:

15

i) comprende una región que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 3,

ii) comprende al menos un nucleótido que a su vez comprende una o más modificaciones químicas en el resto de la ribosa, en el enlace fosfato, o en ambos, y

iii) optativamente, presenta en el extremo 5' y/o en el extremo 3' una o más moléculas adicionales, donde preferiblemente dicha una o más moléculas adicionales no son derivados de desoxirribonucleótido o ribonucleótidos, y donde preferiblemente es colesterol.

20

Preferiblemente, el antagonista comprende una región de al menos 8 unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en al menos un 95% a cualquier región presente en la SEQ ID NO: 8 o 13. Preferiblemente, el antagonista comprende una región de al menos 15 unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en al menos un 95% a cualquier región presente en la SEQ ID NO: 8 o 13. Preferiblemente, el antagonista consiste en la SEQ ID NO: 8 o 13.

25

30

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos un antagonista del microRNA humano miR-100 tal y como se ha definido en el aspecto anterior o cualquiera de sus realizaciones preferidas. Preferiblemente, dicha composición es una composición farmacéutica que adicionalmente comprende un vehículo y/o uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

35

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un antagonista tal y como se ha definido en el aspecto anterior o cualquiera de sus realizaciones preferidas, o a una composición tal y como se ha definido en el aspecto anterior o cualquiera de sus realizaciones preferidas, para su uso como medicamento. Preferiblemente, el uso es en el tratamiento de la distrofia miotónica, preferiblemente distrofia miotónica de tipo 1

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Niveles de expresión de genes de interés en células HeLa. Representación logarítmica en base 2 ($\log_2$) del nivel de expresión relativo de los transcritos de *MBNL1* (izquierda) y *MBNL2* (derecha) en células HeLa tratadas con (A) los miméticos provenientes del screening inicial realizado con las placas miRNA SureFind Transcriptome PCR Array y (B) selección de aquellos microRNAs de interés, así como miR-23b y -218 como comparación. Para ambos genes, el valor de referencia es el detectado en células HeLa tratadas sin ningún mimético y el gen endógeno utilizado para normalizar es GAPDH. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (prueba de la t de Student).

Figura 2: Medidas de toxicidad en el modelo celular de la enfermedad. Representación gráfica del porcentaje de inhibición de la viabilidad celular a las 72 h, obtenida en células de pacientes provocada por la toxicidad asociada a ensayo de dosis respuesta con cantidades crecientes de los antagomiRs miR100, miR-20a, miR-181c, miR-222 y miR-92a, respecto al logaritmo en base 10 de la concentración nanomolar del compuesto. Las cantidades probadas en las células se indican en la parte inferior de las correspondientes curvas. La línea de puntos indica la dosis correspondiente a TC50. Z-factor del ensayo: 0,64. Símbolos representan la media $\pm$ SEM

Figura 3: Niveles de proteína de interés en el modelo celular de la enfermedad. Cuantificación relativa de niveles de proteína MBNL1, medida mediante Quantitative Dot Blot, en células musculares DM1 transfectadas con las concentraciones y antagomiRs indicados y comparados con los niveles detectados en células musculares control (CNT). Barras representan la media $\pm$ SEM. Como control endógeno para la normalización de la expresión se utilizó el GAPDH. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (one-way ANOVA test)

Figura 4. Evaluación de la actividad y toxicidad de los diferentes antagomiRs en el modelo celular de la enfermedad. Representación de la toxicidad (porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, línea negra) y la actividad (porcentaje de incremento en la expresión de MBNL1, línea y barras grises) en células DM1 tras la transfección con los diferentes

antagomiRs a las diferentes concentraciones testadas (cada una por triplicado). Cada símbolo y barra representa la media $\pm$ SEM

Figura 5: Expresión de los microRNAs de interés en diferentes tejidos. Niveles de expresión de miR-23b-3p, miR-218-5p-1, miR-218-5p-2, miR-20a-5p, miR-92a-3p, miR-100-5p, miR-181c-5p y miR-222-3p en transcritos por millón (TPMs), en los diferentes tejidos de interés: tráquea, tiroides, testículos, estómago, bazo, diferentes tipos de células musculares, músculo esquelético, hígado, riñón, corazón, vejiga, esófago, diafragma, colon, cervix, cerebro y sangre. Los datos proceden de la secuenciación de las 100 muestras.

Figura 6: Demostración de la sobreexpresión de los diferentes miRNAs en modelo celular de la enfermedad. Se muestra los niveles de expresión de los miRNAs indicados en células musculares DM1 y controles procedentes del Dr. Denis Furling (Arandel et al. 2017), Estos niveles han sido cuantificados por PCR cuantitativa y se han normalizado a la expresión de los controles endógenos U1, U6 y miR-103. Barras representan la media $\pm$ SEM. $p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ (prueba de la t de Student).

DEFINICIONES

Debe tenerse en cuenta que, tal y como se usa en este documento, las formas singulares "un", "una" y "el", incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, a menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "al menos" que precede a una serie de elementos se refiere a cada elemento de la serie. Los expertos en la técnica reconocerán o podrán determinar utilizando no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en este documento. Se pretende que dichos equivalentes queden abarcados por la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, se entiende que el término conjunto "y/o" entre múltiples elementos enumerados abarca tanto opciones individuales como combinadas. Por ejemplo, cuando dos elementos están unidos por "y/o", una primera opción se refiere a la aplicabilidad del primer elemento sin el segundo. Una segunda opción se refiere a la aplicabilidad del segundo elemento sin el primero. Una tercera opción se refiere a la aplicabilidad del primer y segundo elemento juntos. Se entiende que cualquiera de estas opciones cae dentro del significado y, por lo tanto, satisface el requisito del término "y/o" como se usa en el presente documento. También se entiende que la aplicabilidad simultánea de más de una de las opciones cae dentro del significado y, por lo tanto, satisface el requisito del término "y/o".

A lo largo de esta especificación y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprende" se entenderá que implica la inclusión de un número entero o paso o grupo de números enteros establecidos. o pasos, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o paso o grupo de números enteros o pasos. Cuando se usa en este documento, el término "que comprende" se puede sustituir por el término "que contiene" o "que incluye" o "que tiene". Los términos "que comprende", "contiene", "incluye", "tiene", siempre que se use aquí en el contexto de un aspecto o realización de la presente invención, puede sustituirse por el término "que consiste en", aunque es menos preferido. Cuando se usa aquí "que consiste en" excluye cualquier elemento, paso o ingrediente no especificado en el elemento de reivindicación.

El término "hibridación" se utiliza para referirse a la estructura formada por 2 o más cadenas independientes de ARN o ADN que forman una estructura de doble o triple cadena mediante apareamientos de bases de una cadena a la otra. Estos pares de bases se consideran G-C, A-U/T y G-U/t. (A–Adenina, C–Citosina, G–Guanina, U–Uracilo, T–Timina). Como en el caso de la complementariedad, la hibridación puede ser total o parcial.

Los términos "complementario" y "complementariedad" son intercambiables y se refieren a la capacidad de los oligonucleótidos para formar pares de bases entre sí. Los pares de bases se forman normalmente mediante enlaces de hidrógeno entre unidades de nucleótidos en cadenas o regiones de polinucleótidos antiparalelos. Las hebras o regiones de polinucleótidos complementarios pueden formar pares de bases, por ejemplo, como en la forma de Watson-Crick (por ejemplo, A a T, A a U, C a G). Un 100% (o total) complementario se refiere a la situación en la que cada unidad de nucleótido de una cadena o región de oligonucleótidos puede formar enlaces o puentes de hidrógeno con cada unidad de nucleótido de una segunda cadena o región de polinucleótido. La complementariedad parcial o no total se refiere a la situación en la que algunas, pero no todas, las unidades de nucleótidos de dos cadenas o dos regiones pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí y se pueden expresar como un porcentaje. Los términos "identidad de secuencia" o "identidad porcentual" en el contexto de dos o más nucleótidos, polipéptidos o proteínas se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales ("idénticas") o tienen un porcentaje específico de nucleobases o aminoácidos que son idénticos ("porcentaje de identidad") cuando se comparan y alinean para obtener la máxima correspondencia con una segunda molécula, según se mide usando un algoritmo de comparación de secuencia local (p. ej., mediante una alineación BLAST o cualquier otro algoritmo local conocido por los expertos), o alternativamente, por inspección visual. Cabe señalar que el porcentaje de identidad tal

como se utiliza aquí se mide en el contexto de un alineamiento local, es decir, se basa en el alineamiento de regiones de similitud local entre secuencias, a diferencia de un alineamiento global, cuyo objetivo es alinear dos secuencias en todo su recorrido. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, el porcentaje de identidad se calcula únicamente en base a un algoritmo de comparación de alineación local.

En el contexto de la presente invención, se considera que la complementariedad ocurre bajo condiciones de hibridación estrictas. Por “condiciones de hibridación estrictas” se refiere a condiciones en las que los nucleótidos que tienen homología con la secuencia diana hibridan preferentemente con la secuencia diana, y los nucleótidos que no tienen homología con la secuencia diana no hibridan sustancialmente. Las condiciones estrictas dependen de la secuencia, ya que las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. En términos generales, se eligen condiciones estrictas para que sean aproximadamente 5 °C más bajas que la temperatura de fusión térmica (T_m) de la secuencia específica. T_m es la temperatura a la que el 50% de los nucleótidos complementarios a la secuencia diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio a una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico prescritos.

Por “fragmento” o “región” de una secuencia se entiende una porción de un polipéptido o molécula de ácido nucleico que contiene, preferentemente, al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95 % o más de la longitud total de la molécula de ácido nucleico o polipéptido de referencia. Un fragmento puede contener al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleótidos respecto a la secuencia de referencia.

Por “MBNL1” se entiende la proteína *Muscleblind Like Splicing Regulator 1* codificada por el gen *MBNL1*. El término “MBNL1” tal y como se usa en la presente descripción incluye todas las variantes codificadas por este gen.

Por “MBNL2” se entiende la proteína *Muscleblind Like Splicing Regulator 2* codificada por el gen *MBNL2*. El término “MBNL2” tal y como se usa en la presente descripción incluye todas las variantes codificadas por este gen.

Por “distrofia miotónica” (DM) se refiere de un grupo de trastornos hereditarios llamados distrofias musculares. Hay dos tipos principales de distrofia miotónica: tipo 1 (DM1) y tipo 2 (DM2). La distrofia miotónica tipo 1 (DM1), tal como se define en el presente documento, es un trastorno multisistémico que afecta al músculo esquelético y liso, así como a otros tejidos, como el ojo, el corazón, el sistema endocrino y el sistema nervioso central. Las

manifestaciones clínicas de DM1 abarcan un continuo de leve a grave y se han categorizado ampliamente en tres fenotipos: leve, clásico y congénito. MD1 leve se caracteriza por cataratas y miotonía leve (contracción muscular sostenida); la esperanza de vida es normal. La DM1 clásica se caracteriza por debilidad y atrofia muscular, miotonía, cataratas y, a menudo, anomalías de la conducción cardíaca; los adultos pueden quedar discapacitados físicamente y pueden tener una vida más corta. La DM1 congénita se caracteriza por hipotonía y debilidad generalizada grave al nacer, a menudo con insuficiencia respiratoria y muerte prematura; la discapacidad intelectual es común.

10 Por "tratamiento de la distrofia miotónica" se refiere al tratamiento de la distrofia miotónica sintomática o asintomática, restaurando al menos parcialmente el fenotipo de un paciente con dicha enfermedad a un estado no patológico. La "prevención de la distrofia miotónica" implica medidas tomadas para evitar el desarrollo de la distrofia miotónica (es decir, prevenir la aparición de la distrofia miotónica asociada a la histopatología y/o sintomatología).

15 Una "dosis efectiva" o "dosis terapéuticamente efectiva" es una cantidad suficiente para lograr un resultado clínico beneficioso o deseado. En el contexto de la presente invención, se han aplicado las siguientes definiciones de TC50, EC50, Emax y TIndex:

20 TC50 hace referencia a la dosis a la que antagomiR produce efectos tóxicos (falta de viabilidad celular) en el 50 por ciento de las células sobre las que se está probando en un periodo de 72 horas.

25 EC50 hace referencia a la concentración del antagomiR requerida para alcanzar el 50 por ciento de su actividad máxima en un periodo de 72 horas.

Emax: hace referencia a la actividad máxima (en este caso, expresión de las proteínas MBNL1 o MBNL2 medida en número de veces o *fold change*) que tiene el antagomiR en un periodo de 72 horas.

30 Tindex: refiere a una medida del margen de seguridad de un medicamento y de su eficacia. Se expresa numéricamente como una relación entre la concentración del antagomiR que causa la muerte celular (TC50) teniendo en cuenta su Emax y la dosis que causa el efecto terapéutico deseado (EC50).

35 "Vector de expresión" es una molécula de ácido nucleico (generalmente un plásmido), un virus, una molécula de ARN, un minicromosoma, liposoma, exosoma, o una célula, diseñada

para expresar o vehiculizar una biomolécula específica, en el presente caso un antagonista. El vector de expresión se introduce en una célula huésped usando técnicas bien conocidas tales como infección o transfección, que incluyen transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por liposomas, electroporación y sonoporación. Los constructos de expresión y los métodos para su generación y uso para expresar una proteína deseada son conocidos por un experto en la materia.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Está ampliamente aceptado que la distrofia miotónica tipo 1 (DM1) se origina, entre otros defectos moleculares, por el secuestro y consiguiente falta de función de las proteínas MBNL1 y 2, las cuales están anormalmente secuestradas por las expansiones CUG en los transcritos *DMPK* mutantes causantes de la enfermedad. En la presente invención nos planteamos identificar los miRNAs que reprimen endógenamente la expresión de MBNL1 y 2 para, mediante inhibidores de los mismos (antagomiRs y blockmiRs), encontrar aquellas moléculas que pudieran evitar dicha inhibición y con ello aumentar los niveles de las proteínas MBNL1 y 2, cuya función está reducida en condiciones patológicas. AntagomiR y antimiR se usan como sinónimos en la presente descripción.

Para ello, se realizó un rastreo en células HeLa en las que se sobreexpresó un conjunto de 90 agomiRs (miméticos de miRNAs) y se cuantificó los niveles de transcritos *MBNL1* y *MBNL2* mediante PCR en tiempo real. Se encontraron un total de 5 miRNAs capaces de reprimir la expresión de MBNL1 y/o MBNL2 en estas condiciones: hsa-miR-20a-5p (SEQ ID NO:4), hsa-miR-181c-5p (SEQ ID NO: 5), hsa-miR-222-3p (SEQ ID NO:6), hsa-miR-100-5p (SEQ ID NO:3), hsa-miR-92a-3p (SEQ ID NO: 7). Seguidamente, se diseñaron oligonucleótidos antisentido contra cada uno de los miRNAs identificados, conocidos como antagomiRs, y se probaron en células musculares derivadas de pacientes. La cuantificación relativa de niveles de proteína MBNL1 puede observarse en la Figura 3, donde se muestra que mientras que la mayoría solo provocan aumentos menos destacables, algunos antagomiRs son activos a concentraciones más bajas que otros, por ejemplo, antagomiR-20a o -100, que a 10 nM ya recupera hasta niveles normales (ver control), y otros son capaces de duplicar la expresión en células DM1 (antagomiR-92a).

A continuación, se procedió a evaluar la toxicidad en el modelo celular de la enfermedad. La Tabla 3 recoge los valores de TC50, EC50, Emax y TIndex de los antagonistas descritos en la presente invención, donde puede observarse un altísimo TIndex en el caso del antagomiR-100, derivado de su baja toxicidad (TC50) y EC50.

En vista de estos resultados arriba mencionados, y teniendo en cuenta que se conoce en el estado de la técnica otros antagonistas que elevan los niveles de MBNL1 y que se utilizan para el tratamiento de DM1 (ES2659845B1), se puede concluir que los antagonistas de los miR-100-5p, miR-20a-5p, miR-222-3p, miR-181c-5p, y miR-92a-3p, tienen potencial terapéutico importante al incrementar los niveles de MBNL1, pudiendo usarse como medicamento, particularmente en el tratamiento en pacientes con DM1. Además, también se obtuvieron resultados sobre la capacidad de estos antagonistas de disminuir los niveles de expresión relativa de MBNL2, tal y como se muestra en la Figura 1.

- 10 Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere a un antagonista de un microRNA humano, donde dicho microRNA humano es seleccionado entre el grupo de miR-100, miR-20a, miR-222, miR-181c, y miR-92a, y donde dicho antagonista es capaz de aumentar los niveles intracelulares de la proteína MBNL1 y/o MBNL2, y/o los niveles intracelulares de transcritos (ARNm) de los genes que codifican las proteínas MBNL1 y/o MBNL2. En una
15 realización preferida, el antagonista de un microRNA humano es un antagonista del microRNA humano miR-100.

- En otra realización preferida, el antagonista del microRNA humano miR-100 es capaz de aumentar los niveles intracelulares de la proteína MBNL1 y/o MBNL2 y/o los niveles
20 intracelulares de transcritos de los genes que codifican las proteínas MBNL1 y/o MBNL2 en una célula muscular, preferiblemente en una célula muscular que presenta un fenotipo de distrofia muscular, preferiblemente de tipo 1. Como se usa en el presente documento la expresión “capaz de aumentar los niveles de la proteína MBNL1 y/o MBNL2 o de sus transcritos” se refiere a un aumento, preferiblemente estadísticamente significativo, de los
25 niveles intracelulares de dichas proteínas (o de cualquiera de sus variantes) o de los niveles intracelulares de los ARNm que las codifican causado por el tratamiento con los antagonistas de la presente invención, donde dicho aumento es en comparación a los niveles de una célula o población de células control o sin tratar. Por célula o población de células control se refiere a células no tratadas con los antagonistas de la invención y que
30 presentan función MBNL1 y/o MBNL2 anormalmente disminuida por la enfermedad distrofia muscular de tipo 1 o por la presencia de al menos uno de los miRNAs que actúan negativamente sobre su expresión. En estadística, un resultado o efecto es estadísticamente significativo cuando es improbable que haya sido debido al azar. El nivel de significación de una prueba estadística es un concepto estadístico asociado a la verificación de una
35 hipótesis. Dicha prueba se define como la probabilidad de tomar la decisión de rechazar la hipótesis nula cuando ésta es verdadera (decisión conocida como error de tipo I, o falso positivo). La decisión se toma a menudo utilizando el valor p: si el valor p es inferior al nivel

de significación, entonces la hipótesis nula es rechazada. Cuanto menor sea el valor p, más significativo será el resultado. Preferiblemente, se considera que el aumento de los niveles intracelulares de las proteínas o de sus transcritos es estadísticamente significativo en comparación con los niveles de dichas proteínas o transcritos en célula(s) control cuando los niveles de significación p son iguales o menores de 0.05, 0.01 y 0.001.

Preferiblemente, las células control son células musculares que presentan un fenotipo de distrofia muscular de tipo 1. Preferiblemente, el aumento de los niveles intracelulares de proteína y/o de transcritos de MBNL1 y/o MBNL2 es de al menos un 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces (*fold change*) respecto a los niveles de dichas proteínas/transcritos presentes de una célula o células control o sin tratar.

Así, los presentes inventores proponen la modulación de las proteínas MBNL endógenas provocando el secuestro de al menos uno de los miRNAs que actúan negativamente sobre su expresión, dando con ello lugar a una regulación al alza y, como consecuencia, a un aumento de los niveles intracelulares de las proteínas MBNL1 y/o MBNL2 endógenas, o de sus transcritos (ARNm). Por tanto, se trata de modular la proteína endógena mediante el silenciamiento o la disminución de la actividad de los microRNA humanos miR-100, miR-20a, miR-222, miR-181c, o miR-92a.

Como se usa en el presente documento, “antagonista” se refiere a cualquier molécula capaz de bloquear la acción de los microRNA humanos, preferiblemente de los miR-100, miR-20a, miR-222, miR-181c, y miR-92a, es decir, compuestos, independientemente de su naturaleza, que son capaces de producir una disminución de la actividad endógena de dichos miRNAs, y por tanto aumentar los niveles intracelulares de las proteínas MBNL1 y/o MBNL2 y/o de sus transcritos. Puesto que la presente invención se centra en disminuir la actividad de los microRNA humanos miR-100, miR-20a, miR-222, miR-181c, y miR-92a, dicha capacidad represora se verá disminuida por la presencia de sus inhibidores, silenciadores o bloqueantes: todos denominados antagonistas. Por tanto, análogamente, el efecto producido por un inhibidor, silenciador o bloqueante conllevan y significan un antagonismo de la acción del mismo. Preferiblemente, los miR-100, miR-20a, miR-222, miR-181c, y miR-92a cuya acción es bloqueada por el antagonista de la presente invención son específicamente los miR-100-5p, miR-20a-5p, miR-222-3p, miR-181c-5p, y miR-92a-3p.

En una realización, el antagonista capaz de bloquear la acción de los microRNA humanos, preferiblemente de los miR-100, miR-20a, miR-222, miR-181c, y miR-92a es una molécula, preferiblemente un compuesto orgánico, de bajo peso molecular.

En una realización preferida, el antagonista es una molécula de naturaleza oligonucleotídica y/o un análogo de oligonucleótidos. Tal como se utiliza en la presente memoria, se denomina “molécula de naturaleza oligonucleotídica” u “oligonucleótido” a las moléculas que resultan de la unión de habitualmente un máximo de 50 unidades de los monómeros que dan lugar a las moléculas conocidas de forma abreviada como DNA o RNA, que son monómeros u oligómeros que están compuestos por un grupo fosfato, las bases nitrogenadas adenina (A), citosina (C), guanina (G) o uracilo (U) o timina (T), y la pentosa conocida como ribosa (en el caso de oligorribonucleótidos en el caso de RNA) o desoxirribosa (en el caso de los oligodesoxirribonucleótidos, o DNA). Se consideran por tanto incluidos dentro de los oligonucleótidos los oligodesoxinucleótidos (DNA) y los oligorribonucleótidos (RNA). Por lo habitual de su uso, se consideran también incluidas dentro de dicha definición las moléculas entre cuyas unidades se encuentra el nucleótido inosina y las moléculas que son una mezcla entre DNA/RNA por contener regiones de ambos tipos.

En una realización preferida, el antagonista es una molécula de naturaleza oligorribonucleotídica (un oligorribonucleótido) y/o un análogo de oligorribonucleótido. Tal como se utiliza en la presente memoria, se denomina “molécula de naturaleza oligorribonucleotídica” u “oligorribonucleótido” a las moléculas que resultan de la unión de habitualmente un máximo de 50 unidades de los monómeros que dan lugar a la molécula conocida de forma abreviada como RNA, monómeros que están compuestos por un grupo fosfato, las bases nitrogenadas adenina (A), citosina (C), guanina (G) o uracilo (U), y la pentosa. Por lo habitual de su uso, se consideran también incluidas dentro de dicha definición las moléculas entre cuyas unidades se encuentra el nucleótido inosina.

Tal como se utiliza en la presente invención, los términos “análogo de oligonucleótidos” y “análogo de oligorribonucleótido” engloban las moléculas derivadas de los oligonucleótidos y oligorribonucleótido, respectivamente, que incorporen modificaciones químicas introducidas artificialmente, como las descritas en Antisense part III: chemistries Aug 28, 2018 ericminikel • Cambridge, MA. (<https://www.cureffi.org/2018/08/28/antisense-part-iii-chemistries/>). Preferiblemente, las modificaciones se encuentran entre alguna de las siguientes modificaciones: i) alguna modificación química en al menos una de las unidades que los componen, ya sea en el grupo fosfato, la pentosa o una de las bases nitrogenadas o ii) que uno o varios de los componentes básicos que constituyen el oligonucleótido sea sustituido por una estructura química distinta pero con la misma función. En el caso de ii), se incluyen, sin limitar, el uso de anillos de morfolinos en sustitución de pentosas para disponer las

bases nitrogenadas en su disposición espacial adecuada, o la sustitución de enlaces internucleosídicos fosfodiéster por fosforotioatos. Además, otras modificaciones iii) incluyen también aquellas consistentes en la adición de grupos de naturaleza no nucleotídica en los extremos 5' y/o 3', y/o iv) la adición de secuencias oligonucleotídicas o de análogos de oligonucleótidos adicionales (esto es, no complementarios al microRNA diana) en dichos extremos. Algunas de las modificaciones químicas habituales con las que se modifican las moléculas de oligonucleótidos y oligorribonucleótidos incluyen modificación de parte o todos los nucleótidos con grupos 2'-metoxi (2'-O-metil: 2'-OMe), 2'-Ometoxietil (2'-MOE), y/o enlaces fosforotioatos.

En particular, para los propósitos de la invención, son de especial interés (y se consideran incluidas dentro de las modificaciones que dan lugar a los antagonistas incluidos dentro del alcance de la invención) aquellas modificaciones, válidas para oligonucleótidos y oligorribonucleótidos que dan lugar a análogos de DNAs y RNAs con resistencia incrementada a la hidrólisis, y que generalmente son modificaciones en la pentosa, tales como las que resultan en: 2'-O-metil-sustituidos (las modificaciones 2'-metoxi); 2'-O-metoxietil-sustituidos; LNAs ("locked nucleic acids": ácido nucleico bloqueado, en el que el residuo de la pentosa está modificado con un puente extra que conecta el oxígeno de 2' y el carbono de 4' y bloquea a la pentosa en la conformación 3'-endo); BNAs ("bridged nucleic acid": ácido nucleico con puentes); PMOs (ácidos nucleicos donde la ribosa ha sido sustituida por un grupo morfolino), o PNAs ("peptide nucleic acid": ácido nucleico peptídico, donde el grupo pentosa-fosfato se sustituye por un residuo de aminoácido, de forma que el análogo de nucleótido tiene por esqueleto una estructura de unidades repetidas de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces peptídicos). Últimamente se están utilizando también nucleótidos con diferentes modificaciones, como los CRN ("Conformationally Restricted Nucleotides"), en los que el residuo de pentosa se encuentra bloqueado en una conformación regida mediante un resto químico que actúa como conector, modificación que se está usando principalmente para obtener antagomiRs con nuevas propiedades, o los cETs (cET = constrained ethyl).

Se consideran igualmente incluidas dentro de las posibles modificaciones que dan lugar a análogos de oligonucleótido u oligorribonucleótido de la invención, las modificaciones que dan lugar a enlaces fosforotioato, que son modificaciones que afectan a grupos fosfato que forman parte del "esqueleto" de la cadena de nucleótidos, dando lugar a la introducción de un átomo de azufre en sustitución de un átomo de oxígeno del grupo fosfato que no está actuando como puente entre nucleótidos; estas modificaciones hacen que las uniones entre nucleótidos sean resistentes a la degradación por nucleasas, por lo que es habitual que se

introduzcan entre los últimos 3-5 nucleótidos localizados en los extremos 5' o 3' del oligonucleótido antagonista para inhibir su degradación por exonucleasas, aumentando su estabilidad. Los enlaces fosforotioatos también parecen aumentar la unión a proteínas séricas, como las albúminas, para mejorar la distribución de las moléculas que los contienen. Se incluye también entre las modificaciones químicas que dan lugar a análogos de oligonucleótido y oligorribonucleótido de la invención la metilación en 5' de la base nitrogenada citosina (C), lo que parece incrementar la estabilidad de los complejos que se forman con la diana.

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

Preferiblemente, la molécula de naturaleza oligonucleotídica y/o análogo de oligonucleótido es un antagonista de un microRNA humano seleccionado entre el grupo de miR-100, miR-20, miR-222, miR-181 y miR-92, y donde dicho antagonista es un antimiR, un blockmiR, o

25 una esponja de miRNA.

Como se usa en el presente documento, “blockmiR” se refiere a pequeños oligonucleótidos de química especial diseñados contra la secuencia que un miRNA concreto, en este caso miR-100-5p, miR-20a-5p, miR-222-3p, miR-181c-5p, y miR-92a-3p, reconoce en su ARN mensajero (mRNA) diana, por lo que cada uno de ellos solo debería desreprimir el efecto de ese miRNA sobre ese transcrito, siendo esperable un efecto muy específico. Por tanto, se diseñan de forma que tengan una secuencia que sea complementaria a la de un fragmento de la secuencia de un mRNA que sirve como sitio de unión para un miRNA, de tal forma que se suelen unir en la región no traducida en 3' (3'-UTR) de un mRNA, es decir, en la zona en

35 la que se suelen unir los miRNAs endógenos.

En una realización preferida, el antagonista es un antimiR. Los antimiRs se utilizan en general para silenciar miRNAs endógenos. Por tanto, como se usa en el presente documento, “antimiR”, que es sinónimo de “antagomiR”, se refiere a pequeños oligonucleótidos sintéticos, preferiblemente oligorribonucleótidos sintéticos, que son complementarios a un miRNA diana, en este caso miR-100-5p, miR-20a-5p, miR-222-3p, miR-181c-5p, y miR-92a-3p y, por ello, actúan como antagonistas de dichos miRNAs. Habitualmente, los antimiRs incluyen modificaciones químicas tales como grupos 2-O-metilo, fosforotioatos y ácidos grasos conjugados, preferiblemente colesterol.

Como se usa en el presente documento, “esponja de miRNA” o “miRNA esponja” se refiere a moléculas cuyo principal constituyente son repeticiones de oligonucleótidos colocadas en tándem, con la particularidad de que cada uno de dichos oligonucleótidos son en sí mismos o contienen un sitio de unión al miR-100-5p, miR-20a-5p, miR-222-3p, miR-181c-5p, y miR-92a-3p que antagonizan.

Para diseñar las moléculas antagonistas, es importante tener en cuenta que exista suficiente complementariedad con la secuencia del miR diana, en el caso de antimiRs y esponjas de miRNAs, o de su mRNA diana, en el caso de blockmiRs, a la que deban unirse para que realmente se produzca el efecto de inhibición/antagonismo deseado. En ese sentido, pueden tenerse en cuenta ejemplos de que la complementariedad “típica” entre un antagonista y su diana puede ser del 50%. Por tanto, en una realización preferida, el antagonista de naturaleza oligonucleotídica u oligorribonucleotídica de la invención comprende un fragmento de secuencia de unidades de nucleótidos o ribonucleótidos, o de análogos de los mismos, en el que la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de ribonucleótidos o de análogos de ribonucleótidos es idéntica al menos en un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100%, a la secuencia complementaria de la molécula endógena con la que se tenga que hibridar, es decir, a las secuencias de los miR-100-5p, miR-20a-5p, miR-222-3p, miR-181c-5p, y miR-92a-3p con el que se deba unir (en el caso de antagomiRs y de la secuencia repetitiva de las esponjas de miRNAs) o la secuencia del fragmento del mRNA mensajero (en el caso de blockmiRs). En el contexto de la presente invención, se considera que las bases nitrogenadas T y U son intercambiables, y por tanto las secuencias que incluyen T también pueden considerarse secuencias con U, y viceversa.

En el caso de que el antagonista de naturaleza oligonucleotídica u oligorribonucleotídica de la invención sea un antimiR, en una realización preferida, dicho antimiR comprende un fragmento de secuencia de unidades de nucleótidos o ribonucleótidos, o de análogos de los

5 mismos, en el que la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de ribonucleótidos o de análogos de ribonucleótidos es idéntica al menos en un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100%, a la secuencia complementaria de cualquiera de las secuencias de los microRNA humanos SEQ ID NO: 1 (miR-100-5p), SEQ ID NO: 14 (miR-20a-5p), SEQ ID NO: 15 (miR-222-3p), SEQ ID NO: 16 (miR-181c-5p), o SEQ ID NO: 17 (miR-92a-3p).

Además, los miRNAs endógenos suelen unirse en la región no traducida en 3' (3'-UTR) del mRNA que regulan. Sin embargo, la unión entre el miRNA y su mRNA diana no tiene que ser perfecta y está dominada principalmente por la denominada región semilla del miRNA. La secuencia de la región semilla es una secuencia conservada que está situada principalmente en las posiciones 2-8 del extremo 5' del miRNA. Aunque el emparejamiento de bases de miRNA y su mRNA diana no coincidan perfectamente, con la "secuencia semilla" tiene que ser perfectamente, es decir, 100%, complementaria. En el caso del miR-100-5p, su secuencia corresponde con SEQ ID NO: 1, de la cual la región semilla está compuesta por la SEQ ID NO: 2. En el caso del miR-20a-5p, su secuencia corresponde con SEQ ID NO: 14, de la cual la región semilla está compuesta por la SEQ ID NO: 18. En el caso del miR-222-3p, su secuencia corresponde con SEQ ID NO: 15, de la cual la región semilla está compuesta por la SEQ ID NO: 19. En el caso del miR-181c-5p, su secuencia corresponde con SEQ ID NO: 16, de la cual la región semilla está compuesta por la SEQ ID NO: 20. En el caso del miR-92a-3p, su secuencia corresponde con SEQ ID NO: 17, de la cual la región semilla está compuesta por la SEQ ID NO: 21.

De lo anterior se puede deducir que a la hora de diseñar los antagonistas de los microRNA humanos miR-100-5p, miR-20a-5p, miR-222-3p, miR-181c-5p, y miR-92a-3p de naturaleza oligonucleotídica o oligoribonucleotídica o sus análogos, es recomendable considerar la región semilla de éstos, e incluir la región altamente complementaria a dicha región semilla en el antagonista que se está diseñando. Por tanto, en una realización preferida, el antagonista de naturaleza oligonucleotídica u oligoribonucleotídica de la invención es un antimiR que comprende un fragmento de secuencia de unidades de nucleótidos o ribonucleótidos, o de análogos de los mismos, en el que la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de ribonucleótidos o de análogos de ribonucleótidos es idéntica al menos en un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100%, a la secuencia complementaria a la región semilla de cualquiera de los microRNA humanos miR-100-5p, miR-20a-5p, miR-222-3p, miR-181c-5p, o miR-92a-3p, determinadas por las SEQ ID NO: 2, 18, 19, 20, o 21, respectivamente. Preferiblemente, la identidad a la secuencia complementaria a la región semilla es del 100%.

La longitud de la secuencia de los antagonistas de naturaleza oligonucleotídica u oligoribonucleotídica o de sus análogos es de al menos 8 nucleótidos, sin haber un máximo establecido. Preferiblemente, la longitud de la secuencia de dichos antagonistas es de al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 nucleótidos. En una realización preferida, la longitud de dichos antagonistas es de entre 10-15, 10-20, 20-30, 30-40 o 40-50. En otra realización preferida, la longitud de dichos antagonistas es de 15-25 nucleótidos. En una realización de la presente invención, el antagonista es un antimiR que comprende o consiste en una región de al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 21, 22 o 23, preferiblemente entre 20 y 23, unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100% a la secuencia complementaria de cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1 (miR-100-5p), SEQ ID NO: 14 (miR-20a-5p), SEQ ID NO: 15 (miR-222-3p), SEQ ID NO: 16 (miR-181c-5p), o SEQ ID NO: 17 (miR-92a-3p), preferiblemente SEQ ID NO: 1. En una realización preferida, el antagonista es un antimiR que comprende o consiste en una región de al menos 5, 6, 7, u 8 unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en un 100% a la secuencia complementaria a la región semilla de cualquiera de los microRNA humanos tal y como han sido definidas éstas en las SEQ ID NO: 2 (semilla del miR-100-5p), SEQ ID NO: 18 (semilla del miR-20a-5p), SEQ ID NO: 19 (semilla del miR-222-3p), SEQ ID NO: 20 (semilla del miR-181c-5p), o SEQ ID NO: 21 (semilla del miR-92a-3p), preferiblemente SEQ ID NO: 2.

En otra realización preferida, el antagonista es un antimiR que comprende una primera región de al menos 5, 6, 7, u 8 unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en un 100% a la secuencia complementaria a la región semilla de cualquiera de los microRNA humanos miR-100, miR-20, miR-222, miR-181 o miR-92, tal y como han sido definida éstas en las SEQ ID NO: 2 (semilla del miR-100-5p), SEQ ID NO: 18 (semilla del miR-20a-5p), SEQ ID NO: 19 (semilla del miR-222-3p), SEQ ID NO: 20 (semilla del miR-181c-5p), y SEQ ID NO: 21 (semilla del miR-92a-3p), y donde dicho antagonista comprende además una segunda región de al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o 23 unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos adyacentes a la primera región, donde dicha segunda región es idéntica en al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100% a la secuencia complementarias a cualquier región presente en las SEQ ID NO: 1 (miR-100-5p), SEQ ID NO: 14 (miR-20a-5p), SEQ ID NO: 15 (miR-222-3p), SEQ ID NO: 16 (miR-181c-5p), o SEQ ID NO: 17 (miR-92a-3p), respectivamente.

Tal y como se describe en los ejemplos, los autores de la presente invención encontraron que antagonistas de los microRNA humanos miR-100-5p, miR-20a-5p, miR-222-3p, miR-181c-5p y miR-92a-3p, son capaces de aumentar los niveles de la proteína MBNL1 y los niveles de expresión de la proteína MBNL2 en una célula muscular. Por tanto, se diseñaron una serie de antimiRs específicos frente a dichos miRs. Las secuencias de los microRNA humanos, en orientación 5' a 3' son (en subrayado se indica la región semilla):

hsa-miR-100-5p (SEQ ID NO: 1): AACCCCGUAGAUCCGAACUUGUG

10 hsa-miR-20a-5p (SEQ ID NO: 14): UAAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG

hsa-miR-181c-5p (SEQ ID NO: 16): AACCAUUCAACCUGUCGGUGAGU

hsa-miR-222-3p (SEQ ID NO: 15): AGCUACAUCUGGCUACUGGGU

hsa-miR-92a-3p (SEQ ID NO: 17): UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU

15 Las secuencias de los antagomiRs diseñados, son, en orientación 5' 3':

AntagomiR-100-5p (SEQ ID NO: 3): CACAAGTTCGGATCTACGGGTT

AntagomiR-20a-5p (SEQ ID NO: 4): CTACCTGCACTATAAGCACTTTA

AntagomiR-181c-5p (SEQ ID NO: 5): ACTCACCGACAGGTTGAATGTT

20 AntagomiR-222-3p (SEQ ID NO: 6): ACCCAGTAGCCAGATGTAGCT

AntagomiR-92a-3p (SEQ ID NO: 7): ACAGGCCGGGACAAGTGCAATA

En el caso de antimiRs, el antagonista de naturaleza oligonucleotídica u oligoribonucleotídica de la invención comprende o consiste en un fragmento de secuencia de unidades de nucleótidos o ribonucleótidos, o de análogos de los mismos, en el que la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de nucleótidos o de análogos de nucleótidos es idéntica al menos en un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100%, a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, o 7, preferiblemente SEQ ID NO: 3. En una realización preferida, el antagonista consiste en la secuencia SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, o 7, preferiblemente SEQ ID NO: 3.

En una realización de la presente invención, el antagonista es un antimiR que comprende o consiste en una región de al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 21, 22 o 23, preferiblemente entre 20 y 23, unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100% a cualquier

región presente en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, o 7, preferiblemente SEQ ID NO: 3.

Además, los antagoniRs desarrollados, pueden presentar determinadas modificaciones químicas habituales en este tipo de análogos de oligonucleótidos u oligorribonucleótidos, entre las que se encuentran:

- modificaciones 2'-O-metilo (2'-metoxi) en todos los restos de pentosa,
- la sustitución de algunos enlaces fosfato entre las unidades monoméricas análogas de nucleótidos por fosforotioato, y
- la incorporación de moléculas de ácidos grasos en un extremo de la molécula, preferiblemente en el extremo 3'.

De esta forma, en una realización preferida, el antagonista presenta al menos una modificación química en su estructura, donde:

- i. dicho antagonista comprende una región de al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 21, 22 o 23, preferiblemente entre 20 y 23, unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100% a cualquier región presente en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, o 7, preferiblemente SEQ ID NO: 3,
- ii. al menos una de las unidades de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que componen dicho antagonista es un análogo de nucleótidos que presenta una o más modificaciones químicas en el resto de la pentosa, preferiblemente ribosa, en el enlace fosfato, o en ambos, y
- iii. optativamente, dicho antagonista presenta en el extremo 5' y/o en el extremo 3' una o más moléculas adicionales, preferiblemente una o más moléculas que no son derivados de desoxirribonucleótido o ribonucleótidos.

En otra realización preferida, el antagonista presenta al menos una modificación química en su estructura, donde:

- i. dicho antagonista comprende una región de al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 21, 22 o 23, preferiblemente entre 20 y 23, unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100% a cualquier región presente en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, o 7, preferiblemente SEQ ID NO: 3,

- ii. al menos una de las unidades de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que componen dicho antagonista es un análogo de nucleótido que presenta una o más modificaciones químicas, seleccionadas entre el grupo de: metilaciones, enlaces fosforotioato, LNAs, BNAs, constrained ethyl (cEt) nucleosides, PMOs, PNAs, 2'-O-metil-sustituidos, 2'-O-metoxietil-sustituidos, 2'-fluoro, y
- iii. optativamente, dicho antagonista presenta en el extremo 5' y/o en el extremo 3' una o más moléculas adicionales, preferiblemente una o más moléculas que no son derivados de desoxirribonucleótido o ribonucleótidos.

En otra realización preferida, el antagonista presenta al menos una modificación química en su estructura, donde:

- i. dicho antagonista comprende una región de al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 21, 22 o 23, preferiblemente entre 20 y 23, unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100% a cualquier región presente en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, o 7, preferiblemente SEQ ID NO: 3,
- ii. al menos una de las unidades de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que componen dicho antagonista es un análogo de nucleótido que presenta una o más modificaciones químicas en el resto de la ribosa, en el enlace fosfato, o en ambos, preferiblemente seleccionadas entre el grupo de: metilaciones, enlaces fosforotioato, LNAs, BNAs, constrained ethyl (cEt) nucleosides, PMOs, PNAs, 2'-O-metil-sustituidos, 2'-O-metoxietil-sustituidos, 2'-fluoro, y
- iii. optativamente, dicho antagonista presenta en el extremo 5' y/o en el extremo 3' una o más moléculas adicionales, preferiblemente una o más moléculas que no son derivados de desoxirribonucleótido o ribonucleótidos, preferiblemente colesterol.

De esta forma, se da lugar a los siguientes análogos de oligonucleótidos u oligorribonucleótido antagonistas de los microRNA humanos miR-100, miR-20, miR-222, miR-181 y miR-92:

AntagomiR-100-5p (SEQ ID NO: 8): **C*A*CAAGTTCGGATCTACGG*G*T*T***

AntagomiR-20a-5p (SEQ ID NO: 9): **C*T*ACCTGCACTATAAGCACT*T*T*A***

AntagomiR-181c-5p (SEQ ID NO: 10): **A*C*TCACCGACAGGTTGAAT*G*T*T***

AntagomiR-222-3p (SEQ ID NO: 11): **A*C*CCAGTAGCCAGATGTA*G*C*T***

AntagomiR-92a-3p (SEQ ID NO: 12): **A*C*AGGCCGGGACAAGTGCA*A*T*A***

5

donde:

- un asterisco (*) indica la presencia de un enlace fosforotioato,
- A, C, T, G en negrita indica que ese nucleótido está modificado con 2'-Ometoxietil, y
- 10 - opcionalmente, un ácido graso es conjugado en el extremo 3' y/o 5' de la molécula.

Por tanto, todas las bases nitrogenadas de las secuencias SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, y 12 se encuentran modificadas con 2'-Ometoxietil (2' OMe).

En un aspecto preferido, las secuencias SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, y 12 tienen conjugadas en su extremo 3' un ácido graso, preferiblemente colesterol.

15

AntagomiR-100-5p (SEQ ID NO: 13): **C*A*CAAGTTCGGATCTACGG*G*T*T*-Chol**

AntagomiR-20a-5p (SEQ ID NO: 22): **C*T*ACCTGCACTATAAGCACT*T*T*A* -Chol**

AntagomiR-181c-5p (SEQ ID NO: 23): **A*C*TCACCGACAGGTTGAAT*G*T*T* -Chol**

20 AntagomiR-222-3p (SEQ ID NO: 24): **A*C*CCAGTAGCCAGATGTA*G*C*T* -Chol**

AntagomiR -92a-3p (SEQ ID NO: 25): **A*C*AGGCCGGGACAAGTGCA*A*T*A* -Chol**

donde:

- 25 - un asterisco (*) indica la presencia de un enlace fosforotioato,
- A, C, T, G en negrita indica que ese nucleótido está modificado con 2'-Ometoxietil, y
- "- Chol" indica que el oligonucleótido está conjugado a colesterol en su extremo 3'.

Por tanto, todas las bases nitrogenadas de las secuencias SEQ ID NO: 13, 22, 23, 24 y 25 se encuentran modificadas con 2'-Ometoxietil (2' OMe) y conjugadas a colesterol.

30

En una realización preferida, el antagonista de naturaleza oligonucleotídica u oligoribonucleotídica de la invención es un antimiR que comprende o consiste de un fragmento de secuencia de unidades de nucleótidos o ribonucleótidos, o de análogos de los mismos, en el que la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de nucleótidos o de análogos de nucleótidos es idéntica al menos en un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100%, a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, o 12, preferiblemente SEQ ID NO: 8.

35

En una realización preferida, el antagonista consiste en la SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, o 12, preferiblemente SEQ ID NO: 8.

En una realización de la presente invención, el antagonista es un antimiR que comprende o consiste en una región de al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 21, 22 o 23, preferiblemente entre 20 y 23, unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100% a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, o 12, preferiblemente SEQ ID NO: 8.

En una realización preferida, el antagonista de naturaleza oligonucleotídica u oligoribonucleotídica de la invención es un antimiR que comprende o consiste de un fragmento de secuencia de unidades de nucleótidos o ribonucleótidos, o de análogos de los mismos, en el que la secuencia de las bases nitrogenadas de las unidades de nucleótidos o de análogos de nucleótidos es idéntica al menos en un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100%, a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 13, 22, 23, 24 o 25, preferiblemente SEQ ID NO: 13; donde una molécula de colesterol está conjugada en el extremo 3' del antagonista. En una realización preferida, el antagonista consiste en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 13, 22, 23, 24 o 25, preferiblemente SEQ ID NO: 13, donde una molécula de colesterol está conjugada en el extremo 3' de dicho antagonista.

En una realización de la presente invención, el antagonista es un antimiR que comprende o consiste en una región de al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 21, 22 o 23, preferiblemente entre 20 y 23, unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100% a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 13, 22, 23, 24 o 25, preferiblemente SEQ ID NO: 13, donde una molécula de colesterol está conjugada en el extremo 3' de dicho antagonista.

Puede considerarse una posible realización de la invención una molécula de naturaleza oligonucleotídica y/o un análogo de oligonucleótido que es un antagonista de un microRNA humano, donde dicho microRNA humano es seleccionado entre el grupo de miR-100, miR-20, miR-222, miR-181 y miR-92, o a una mezcla de dos o más de dichas moléculas, que es capaz de aumentar los niveles intracelulares de las proteínas MBNL1 y/o MBNL2 o los niveles de sus transcritos en una célula muscular. Dicha célula muscular puede ser una o más células del tejido muscular esquelético, cardíaco, o tejido muscular liso, o sus

precusores. En una realización preferida, dicha célula muscular es un cardiomiocito, mioblasto, miocito, células musculares estriadas, o células musculares lisas. En otra realización preferida, el antagonista es capaz de aumentar los niveles de las proteínas MBNL1 y/o MBNL2 o los niveles intracelulares de sus transcritos en una célula que se encuentra en uno o más órganos seleccionados del grupo de cerebro, cerebelo, hipocampo u otro órgano del sistema nervioso central, músculo esquelético, corazón, tejido adiposo, riñón, hígado y sistema biliar, pulmón, faringe, nasofaringe, nariz, placenta, bazo, testículo, útero, tracto gastrointestinal, mama, vejiga, próstata, piel, o en una o más células de un cultivo primario de uno de dichos órganos o de una línea celular establecida derivada de uno de dichos órganos (incluidas las células madre pluripotentes inducidas, conocidas por sus siglas en inglés iPSCs: induced pluripotent stem cells) o células madre de uno de dichos órganos.

En un **segundo aspecto**, la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos un antagonista tal y como se ha definido en el primer aspecto o en cualquiera de sus realizaciones, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Además, el antagonista puede ser vehiculizado en un vector. Dicho vector puede ser un vector de expresión. El vector puede ser seleccionado de la lista que incluye vectores de DNA, RNA, virales, liposomas o exosomas. De esta manera, la presente invención también incluye cualquier medio de vehiculización o expresión que comprenda los inhibidores o antagonistas definidos en el primer aspecto o en cualquiera de sus realizaciones.

Es habitual la preparación de composiciones que comprenden más de un ingrediente activo. Por ejemplo, sería posible preparar una composición que comprenda la combinación de los antagonistas de la presente invención con otros antagonistas de otros microRNAs humanos que también intercedan o tengan un efecto en la producción de las proteínas MBNL. Así, en una realización preferida del segundo aspecto, la composición comprende una combinación de antagonistas, entre los cuales se encuentra el antagonista tal y como se ha definido en el primer aspecto o en cualquiera de sus realizaciones. En un aspecto preferido, la composición de acuerdo al segundo aspecto comprende al menos un antagonista tal y como se ha definido en el primer aspecto o en cualquiera de sus realizaciones, y al menos un antagonista de los microRNA-218-5p humano o del microRNA-23b-3p humano. Los microRNA-218-5p humano o del microRNA-23b-3p humano se definen en la patente ES 2 659 845 A1. En otra realización, la composición de acuerdo con el segundo aspecto comprende al menos un antagonista tal y como se ha definido en el primer aspecto o en cualquiera de sus realizaciones, y otras moléculas de carácter nucleotídico, preferiblemente oligonucleótidos anti sentido (ASOs).

Preferiblemente, la composición de acuerdo con el segundo aspecto comprende al menos un antagonista frente al microRNA humano miR-100, preferiblemente un antagonista que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 8 o 13, o un antagonista cuya secuencia es idéntica al menos en un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o un 100%, a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 8 o 13.

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

Los sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nano cápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, y liposomas, se pueden usar como vehículos de administración de los inhibidores/antagonistas de la presente invención, con los cuales se forma la composición farmacéutica de la invención, pero también se incluye la posibilidad de que los antagonistas se administren sin ayuda de otros agentes farmacológicos.

Otra posibilidad, como ya se ha comentado, es preparar las composiciones farmacéuticas de la invención utilizando sales y tampones apropiados para hacer que los vehículos de administración sean estables y ayudar en la captura por las células diana. Las composiciones de la presente invención pueden ser composiciones acuosas que comprenden una cantidad eficaz del vehículo de administración y que comprenden o bien las moléculas de naturaleza oligonucleotídica de la invención, de forma independiente o formando liposomas u otros complejos, o bien vectores de expresión de las mismas, disueltos o dispersos en un vehículo farmacéuticamente aceptable o medio acuoso. Las

expresiones "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas o de otro tipo, cuando se administran a un animal o un ser humano. Tal como se usa en la presente memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, tampones, soluciones, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares aceptables para su uso en productos farmacéuticos de formulación, tales como productos farmacéuticos adecuados para la administración a seres humanos. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los ingredientes activos de la presente invención, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención. También se pueden incorporar en las composiciones ingredientes activos suplementarios, siempre que no inactiven las moléculas de la presente invención o sus vectores de expresión.

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

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

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando los compuestos activos en una cantidad apropiada en un disolvente junto con cualesquiera otros ingredientes (por ejemplo, como se especifica anteriormente) como se desee, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes deseados, por ejemplo, como se especifica anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación incluyen secado al vacío y liofilización, técnicas que producen un polvo del ingrediente(s) activo(s) más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo previamente esterilizada por filtración. Las composiciones de la presente invención generalmente se pueden formular en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) derivadas de ácidos inorgánicos (por ejemplo, clorhídrico o fosfórico), o de ácidos orgánicos (por ejemplo, acético, oxálico, tartárico, mandélico), y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres de la proteína también se pueden derivar de bases inorgánicas (por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férricos) o de bases orgánicas (por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares).

En cualquier caso, se recomienda que la preparación de las composiciones de la presente invención siga prácticas que garanticen una calidad mínima para su uso en humanos, tal como las recogidas en la Guía de Buenas Prácticas de Fabricación de Ingredientes Farmacéuticos Activos del Grupo de Trabajo Q7 de la Conferencia Internacional sobre la Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Agentes Farmacéuticos para Uso Humano.

Preferiblemente, se tendrán también en cuenta otras directrices de calidad de la misma procedencia, tales como la Q8, relativa al Desarrollo Farmacéutico, o la Q10, sobre el Sistema de Calidad Farmacéutico.

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

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

Además, el aumento significativo de las proteínas MBNL1 y/o MBNL2 demostrado en la presente invención lleva a considerar el posible uso de estos antagonistas como medicamento. Por tanto, un **tercer aspecto** de la invención se refiere al antagonista según el primer aspecto o cualquiera de sus realizaciones, o a la composición según el segundo aspecto o cualquiera de sus realizaciones, para su uso como medicamento. En una realización preferida, el uso es como tratamiento para la distrofia miotónica, preferiblemente la distrofia miotónica de tipo 1.

La administración del antagonista mediante un posible vector de expresión del mismo puede permitir dirigir la expresión a un tejido o grupo de tejidos concretos en función del tropismo del propio vector de base y/o mediante la elección de elementos de control que den lugar a la expresión de la secuencia codificante ligada a los mismos solo en tejidos concretos. En cuanto a los órganos o tejidos a tratar, preferiblemente son aquellos tejidos u órganos afectados por la DM1, en particular aquellos seleccionados del grupo de músculo esquelético, corazón, musculatura lisa, diafragma, músculos respiratorios, o músculos de la faringe o células madre de uno o más de dichos órganos.

Además, algunas formas de dosificación concretas pueden favorecer un mayor acceso a unos u otros órganos. Los ensayos de concentraciones realizados en los ejemplos muestran que los antagoniRs, a diferentes dosis, son capaces de aumentar la expresión y la

concentración de las proteínas MBNL1 y/o MBNL2, lo que apoya su uso para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia miotónica 1, en particular para paliar síntomas de la enfermedad, especialmente síntomas que se corresponden con la disfunción muscular. En una posible realización, la composición farmacéutica comprende una dosis eficaz de un inhibidor o antagonista de al menos uno de los microRNA humanos miR-100, miR-20, miR-222, miR-181 y miR-92. Más preferiblemente, el inhibidor(es)/antagonista(s) estará presente a una concentración que permita la administración de una dosis terapéuticamente efectiva.

- Una "dosis efectiva" o "dosis terapéuticamente efectiva" es una cantidad suficiente para efectuar un resultado clínico beneficioso o deseado. Además, la dosis efectiva puede variar en organismos de distintas especies y/o tamaños. Así, una dosis efectiva de un inhibidor/antagonista de un microRNA en roedores, de acuerdo con los resultados previos obtenidos con moléculas dirigidas contra otros microRNAs, puede ser de aproximadamente 1 mg / kg a aproximadamente 100 mg / kg, aproximadamente 2,5 mg / kg a aproximadamente 50 mg / kg, o aproximadamente 5 mg / kg a aproximadamente 25 mg / kg. Es necesario tener en cuenta que las dosis terapéuticas probadas en ratones deben convertirse a su equivalente en humanos. Para ello, el experto en la materia puede consultar la bien conocida guía de práctica común para la conversión de dosis entre animales y humanos, véase, por ejemplo, Nair AB, Jacob S. Una guía de práctica simple para la conversión de dosis entre animales y humanos. J Basic Clin Pharma 2016;7:27-31. Brevemente, las dosis terapéuticas en modelos de ratón se pueden convertir a humanos dividiéndolas por aproximadamente 12.3, aunque habría que hacer el correspondiente ensayo clínico. El cálculo y la obtención de una dosis efectiva para humanos entra dentro de la práctica rutinaria y por tanto del conocimiento del experto en la materia. Además, la determinación precisa de lo que se considera una dosis eficaz puede basarse en factores individuales para cada paciente, incluyendo su tamaño, edad, y la naturaleza del inhibidor o antagonista (por ejemplo, si es una construcción de expresión, un análogo de oligorribonucleótido tipo antagomiR o antimiR). Por lo tanto, las dosificaciones se pueden determinar fácilmente por los expertos normales en la técnica a partir de esta descripción y el conocimiento en la técnica. Puede ser necesario o conveniente administrar dosis múltiples al sujeto durante un periodo de tratamiento particular, administrando dosis diarias, semanales, mensuales, cada dos meses, cada tres meses o cada seis meses. En ciertas realizaciones, el sujeto recibe una dosis inicial en un primer momento que es mayor que una o más dosis posteriores o de mantenimiento.

Dada la estabilidad de los antagoni-miRs, es posible plantearse su administración a seres humanos directamente, por ejemplo por vía subcutánea o sistémica, preferiblemente por vía intravenosa, por ejemplo disueltos o en suspensión en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como agua o alguna solución acuosa como, por ejemplo, suero salino o tampón fosfato.

Cada realización descrita aquí se contempla como aplicable a cada una de las otras realizaciones descritas. Por lo tanto, todas las combinaciones de los diversos elementos descritos aquí están dentro del alcance de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

Secuencia del microRNA humano miR-100-5p: SEQ ID NO: 1:

AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG

Secuencia semilla del microRNA humano miR-100-5p: SEQ ID NO: 2: CCCGUAG

Secuencia del antagonista hsa-miR-100: SEQ ID NO: 3:

CACAAGTTCGGATCTACGGGTT

Secuencia del antagonista hsa-miR-20a-5p: SEQ ID NO: 4:

CTACCTGCACTATAAGCACTTTA

Secuencia del antagonista hsa-miR-181c-5p: SEQ ID NO: 5:

ACTCACCGACAGGTTGAATGTT

Secuencia del antagonista hsa-miR-222-3p: SEQ ID NO: 6:

ACCCAGTAGCCAGATGTAGCT

Secuencia del antagonista hsa-miR-92a-3p: SEQ ID NO: 7:

ACAGGCCGGGACAAGTGCAATA

Secuencia del antagonista hsa-miR-100-5p con modificaciones: SEQ ID NO 8:

C*A*CAAGTTCGGATCTACGG*G*T*T*

Secuencia del antagonista hsa-miR-20a-5p con modificaciones: SEQ ID NO 9:

C*T*ACCTGCACTATAAGCACT*T*T*A*

Secuencia del antagonista hsa-miR-181c-5p con modificaciones: SEQ ID NO 10:

A*C*TCACCGACAGGTTGAAT*G*T*T*

Secuencia del antagonista hsa-miR-222-3p con modificaciones: SEQ ID NO 11:

A*C*CCAGTAGCCAGATGTA*G*C*T*

Secuencia del antagonista hsa-miR-92a-3p con modificaciones: SEQ ID NO 12:

A*C*AGGCCGGGACAAGTGCA*A*T*A*

donde:

- un asterisco (*) indica la presencia de un enlace fosforotioato,
- 5 - A, C, T, G en negrita indica que ese nucleótido está modificado con 2'- OMe, y
- opcionalmente, un ácido graso es conjugado en el extremo 3' y/o 5' de la molécula.

Secuencia del antagonista hsa-miR-100-5p con modificaciones: SEQ ID NO 13:

C*A*CAAGTTCGGATCTACGG*G*T*T*-Chol

10 **Secuencia del antagonista hsa-miR-20a-5p con modificaciones: SEQ ID NO: 22:**

C*T*ACCTGCACTATAAGCACT*T*T*A* -Chol

Secuencia del antagonista hsa-miR-181c-5p con modificaciones: SEQ ID NO: 23:

A*C*TCACCGACAGGTTGAAT*G*T*T* -Chol

Secuencia del antagonista hsa-miR-222-3p con modificaciones: SEQ ID NO: 24:

15 A*C*CCAGTAGCCAGATGTA*G*C*T* -Chol

Secuencia del antagonista hsa-miR-92a-3p con modificaciones: SEQ ID NO: 25:

A*C*AGGCCGGGACAAGTGCA*A*T*A* -Chol

donde:

- 20 - un asterisco (*) indica la presencia de un enlace fosforotioato,
- A, C, T, G en negrita indica que ese nucleótido está modificado con 2'- OMe, y
- - Chol indica que el oligonucleótido está conjugado a colesterol.

25 **Secuencia del microRNA humano miR-20a-5p: SEQ ID NO: 14:**

UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG

Secuencia del microRNA humano miR-222-3p: SEQ ID NO: 15:

AGCUACAUCUGGCUACUGGGU

Secuencia del microRNA humano miR-181c-5p: SEQ ID NO: 16:

30 AACAUUCAACCUGUCGGUGAGU

Secuencia del microRNA humano miR-92a-3p: SEQ ID NO: 17:

UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU

Secuencia semilla del microRNA humano miR-20a-5p SEQ ID NO: 18: AAGUGCU

Secuencia semilla del microRNA humano miR-222-3p: SEQ ID NO: 19: CUACAUC

35 **Secuencia semilla del microRNA humano miR-181c-5p: SEQ ID NO: 20:** CAUUCAA

Secuencia semilla del microRNA humano miR-92a-3p: SEQ ID NO: 21: UUGCACU

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

EJEMPLOS

5 **EJEMPLO 1: Screening basado en librerías de microRNAs miméticos (SureFIND Transcriptome PCR Array, Qiagen).**

Se trata de un método para la identificación de reguladores de la expresión génica.

10 En este estudio se utilizó el kit "Cancer miRNA SureFind Transcriptome PCR Array" para identificar posibles miRNAs reguladores de MBNL1 y 2. Estos arrays incluyen cDNA de células HeLa tratadas con miméticos de miRNAs definidos, en formato placa de 96 pocillos (90 microRNAs diferentes y 6 controles) en los cuales se espera que los mRNAs diana de los miRNAs se detecten significativamente reducidos o aumentados mediante PCR en
15 tiempo real. El ensayo de qPCR multiplex se llevó a cabo mediante uso de sondas Taqman comerciales (QuantiFast Probe PCR Kits, Qiagen) para cuantificar la expresión de MBNL1 y 2 (genes de interés, marcados con FAM) y GADPH (como expresión endógena de referencia, marcado con MAX). Los cambios en la expresión de MBNL1 y 2 como resultado del tratamiento con cada microRNA mimético específico, fueron calculados respecto al
20 control negativo mimético (un microRNA que no existe en la naturaleza) y normalizados respecto a GADPH. Los cambios observados fueron representados en forma de log₂ y sometidos a análisis estadístico $\Delta\Delta C_t$ (MAD) para la selección de los miRNAs candidatos positivos (Figura 1).

25 **Predicciones bioinformáticas unión al 3'UTR**

Partiendo de aquellos microRNAs que tenían una actividad represora sobre MBNL1 y MBNL2 a nivel de mensajero, buscamos posibles dianas de unión directa de estos microRNAs al 3'UTR de MBNL1 y MBNL2. Para ello hemos utilizado 2 bases de datos,
30 mirDIP y miRecords, las cuales recogen la información de un total de 9 programas de predicción entre los que se incluyen TargetScan y miRanda, proporcionando información de la existencia de las dianas de un microRNA concreto en los transcritos de un gen dado lo que sugiere una regulación directa.

35

Ensayo de toxicidad en cultivo celular (TC50)

Fibroblastos DM1 se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle Medium-high glucose (DMEM 4500 mg/l, Gibco) suplementado con 1% penicilina/estreptomicina y 10% de suero fetal bovino inactivado en botellas de cultivo celular. Dado su crecimiento adherente, para pasarlas se lavaron con PBS y se tripsinizaron 2 min a 37°C, a continuación se le añadió medio fresco para inhibir la acción de la tripsina.

Las células para este ensayo fueron sembradas a una densidad de 10^5 cels/ml en placas de 96 pocillos (10000 cels por pocillo). La placa fue sembrada siguiendo la siguiente plantilla, en el caso de la columna 1 (blank), no se sembraron células, pues esta columna es el blanco del análisis de colorimetría, el resto de la placa fue sembrada con fibroblastos DM1, que posteriormente se trataron como se describe a continuación. Transcurridas unas 16 horas después de la siembra de las células y con éstas al 80% de confluencia, se procedió a la transfección con los antagomiRs comerciales proporcionados por Biomers (antagomiR-miR-100-5p (SEQ ID NO: 3): CACAAGTTCGGATCTACGGGTT, antagomiR-20a-5p (SEQ ID NO: 4): CTACCTGCACTATAAGCACTTTA, antagomiR-181c-5p (SEQ ID NO: 5): ACTCACCGACAGGTTGAATGTT, antagomiR-222-3p (SEQ ID NO: 6): ACCCAGTAGCCAGATGTAGCT y antagomiR-miR-92a-3p (SEQ ID NO: 7): ACAGGCCGGGACAAGTGCAATA) usando X-tremeGENE HP reagent (Roche) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

A	blank	control	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5
B	blank	control	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5
C	blank	control	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5
D	blank	control	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5
E	blank	control	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5
F	blank	control	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5
G	blank	control	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5
H	blank	control	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Tabla 1. Representación de la placa de 96 pocillos utilizada.

Todos los antagomiRs fueron transfectados en fibroblastos de pacientes (Arandel et al 2017), utilizando cantidades crecientes de estos: 10 nM, 50 nM, 200 nM, y 1000 nM y 5000 nM (C1, C2, C3, C4 y C5, respectivamente), y como control solo se puso reactivo de transfección pero no antagomiR, se dejó el medio de transfección junto con las células durante 4 horas y transcurrido este tiempo se cambió por medio de transdiferenciación. Para transdiferenciar los fibroblastos a mioblastos se indujo la expresión de MyoD. Para ello, se reemplazó el medio completo por medio de diferenciación muscular (MDM) que consistía en

DMEM suplementado con 1% P/S, 2% suero de caballo (Gibco), 0,1 mg/ml de apotransferrina, 0,01 mg/ml de insulina y 0.02 mg/ml de doxyciclina (Sigma) durante 60 h.

Transcurridas 72 horas, se remplazó el medio de transdiferenciación por 100 µl de medio nuevo en todos los pocillos de la placa incluida la columna 1, y se añadió 20 µl de la solución MTS/PMS (Kit CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) a cada pocillo y se incubó 2 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se leyó el ensayo colorimétrico en el lector de placas Infinite 200 PRO Microplate Reader, Tecan, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos obtenidos con el lector fueron procesados y analizados con la finalidad de obtener la TC50 que nos permiten saber con qué cantidad de antagomiR debemos trabajar para que éste no resulte tóxico en el modelo celular (Figura 2).

Ensayo de Actividad de los antagomiR sobre la proteína MBNL1 (EC50)

Los fibroblastos de pacientes DM1 y controles sanos se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle Medium-high glucose (DMEM 4500 mg/l, Gibco) suplementado con 1% P/S y 10% de suero fetal bovino inactivado en botellas de cultivo celular. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos, a una densidad de 100000 células/pocillo poniendo 2,5 ml de células en cada pocillo, transcurridas unas 16 horas después de la siembra de las células y con estas al 80% de confluencia, se procedió a la transfección de estas con los antagomiRs comerciales proporcionados por Biomers (antagomiR-miR-100-5p (SEQ ID NO: 3): CACAAGTTCGGATCTACGGGTT, antagomiR-20a-5p (SEQ ID NO: 4): CTACCTGCACTATAAGCACTTTA, antagomiR-181c-5p (SEQ ID NO: 11): CTCACCGACAGGTTGAATGTT, antagomiR-222-3p (SEQ ID NO: 6): ACCCAGTAGCCAGATGTAGCT y antagomiR-miR-92a-3p (SEQ ID NO: 7): ACAGGCCGGGACAAGTGCAATA), usando X-tremeGENE HP reagent (Roche).

Los antagomiRs fueron transfectados en fibroblastos de pacientes, utilizando las cantidades crecientes 10 nM, 50 nM, 200 nM, 1000 nM y 5000 nM. Como control solo se puso reactivo de transfección pero no antagomiR tanto en las células sanas como en las DM1, posteriormente se dejó el medio de transfección junto con las células durante 4 horas y transcurrido este tiempo se cambió por medio de transdiferenciación (DMEM suplementado con 1% P/S, 2% suero de caballo (Gibco), 0,1 mg/ml de apotransferrina, 0,01 mg/ml de insulina y 0,02 mg/ml de doxyciclina (Sigma)). Los fibroblastos fueron transdiferenciados a mioblastos durante 72 horas.

Trascurridas 72 h se extrajo la proteína total utilizada para los ensayos de QDB mediante el uso de tampón RIPA (Thermo Scientific), más inhibidores de proteasa y fosfatasa (Roche Applied Science). Las muestras fueron cuantificadas mediante el BCA protein assay kit (Pierce) utilizando albúmina de suero bovino como patrón. Las muestras se prepararon a una concentración de 1 µg/pocillo junto con tampón de carga 4x (0,8 ml 3 M Tris-HCl pH 6,8, 4 ml de glicerol, 0,8 g SDS, 0,04 g Bromofenol azul, 4 ml β-mercaptoetanol, ddH₂O hasta 10 ml). Las muestras se desnaturalizaron hirviéndolas a 100 °C durante 5 minutos y se cargaron en placas de QDB (Quanticision Diagnostics Inc). Cada muestra fue cargada por cuatriplicado en dos placas diferentes (5 µl/pocillo), una para detectar MBNL1 y otra para detectar GAPDH, utilizado como control endógeno, siguiendo el protocolo descrito en Moreno-Cervera et al., 2022. Tras esto, se dejaron secar y se incubaron con tampón de transferencia (14,4 g glicina, 3 g Tris base, 700 ml ddH₂O, 200 ml metanol, ddH₂O hasta 1 l) en agitación durante 1 minuto. Posteriormente se realizaron tres lavados con TBS-T 1x (100 ml 10x TBS, 5 ml Tween 20, ddH₂O hasta 1 l) y se incubaron durante una hora con tampón de bloqueo (5 g leche desnatada en polvo, TBS-T 1x hasta 100 ml). Las placas se incubaron a 4 °C durante toda la noche con los anticuerpos primarios anti-MBNL1 (1:1000, ab77017, Abcam) y anti-GAPDH (1:500, clon G-9, Santa Cruz). Todos los anticuerpos primarios se detectaron usando el anticuerpo secundario anti-Mouse IgG conjugado a HRP (*Horseradish peroxidase*) a una concentración 1:5000 (Sigma-Aldrich). La inmunoreactividad fue detectada utilizando el reactivo Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) y los niveles de quimioluminiscencia fueron determinados con el lector de placas Infinite M200 Pro (Tecan).

Expresión de miRNAs candidatos en los tejidos relevantes

Los niveles de expresión de miR-100-5p, miR-20a-5p, miR-181c-5p, miR-222-3p y miR-92a-3p en transcritos por millón (TPM), procedentes en los diferentes tejidos de interés (tráquea, tiroides, testículos, estomago, bazo, diferentes tipos de células musculares, músculo esquelético, hígado, riñón, corazón, vejiga, esófago, diafragma, colon, cervix, cerebro y sangre) fueron obtenidos mediante el uso de la base de datos ZEMBU, la cual está creada mediante datos procedentes del proyecto FANTOM5. Fantom alberga una gran cantidad de muestras de más de 100 tipos diferentes de tejido, por lo cual se ha filtrado aquellos que pudieran ser de interés para la enfermedad.

Name	TC50	EC50	E _{max}	TIndex
AntagomiR-23b	0,806	0,0278	2,596	75,254
AntagomiR-218	0,848	0,0224	1,870	70,810
AntagomiR-20a	0,340	0,0100	1,458	49,572
AntagomiR-92a	1,201	0,4170	2,434	7,010
AntagomiR-100	1,524	0,0180	1,552	131,622
AntagomiR-181c	3,849	0,4675	1,340	11,034
AntagomiR-222	0,579	0,9777	1,979	1,172

Tabla 2. Índice terapéutico de los diferentes oligonucleótidos utilizados en células DM1. Parámetros TC50, EC50, E_{max} e índice terapéutico obtenidos para cada uno de los antagomiRs testados en células DM1.

5

Expresión de miRNAs candidatos en células modelo de la enfermedad

Los niveles de expresión relativos de los microRNAs miR-23b, miR-218, miR-92a, miR-100, miR-181c, miR-222, miR-20a, miR-17 y miR-let17a se midieron mediante RT-qPCR tanto en células control como en células DM1 modelo a 4 días de diferenciación. También se midieron los niveles de miR-1 como control positivo, ya que está descrito (Rau et al., 2011) que éste se encuentra disminuido en células DM1. Todos los niveles se obtuvieron utilizando como normalizadores U1, U6 y miR-103b.

10

miRs	Screening microRNAs		N° Programas de predicción unión 3'UTR		qPCR Validación		Expresión en tejidos músculo	Sobreexpresión en DM1 miotubos
	↓MBNL1	↓MBNL2	MBNL1	MBNL2	TarBase v7.0	↓MBNL1	↓MBNL2	
hsa-miR-20a	Sí	Sí	5	4				Sí
hsa-miR-181c			8		+	Sí		Sí
hsa-miR-222	Sí	Sí	4	4	+			Sí
hsa-miR-100	Sí	Sí	6					Sí
hsa-miR-92a	Sí	Sí	3	3	+			Sí

15

Tabla 3. Recopilación de datos obtenidos sobre los diferentes miRNAs de estudio. Se muestran los diferentes parámetros de interés analizados en el estudio: confirmación de la disminución de MBNL1 y 2 en el screening de sobreexpresión de los miRNAs en estudio; número de programas que predicen la unión de los miRNAs a MBNL1 y 2 y confirmación por TarBase v7.0; validación de la disminución de MBNL1 y 2 por qPCR cuando se sobreexpresan los miRNAs de interés; confirmación de la expresión de los miRNAs en tejidos de interés para DM1 (músculo); y confirmación de la sobreexpresión de los miRNAs en miotubos DM1 modelo de la enfermedad.

25 Como se puede observar en la Tabla 2, el antagomiR-100 mostró los mejores valores de Tindex respecto al resto de antagomiRs, lo cual demuestra que este antagomiR presenta el

mejor balance entre toxicidad, Emax y EC50. Sin embargo, también cabe destacar que el antagomiR-20b tiene buenos valores de EC50 y Emax, el antagomiR-181c tiene buen valor Emax; el antagomiR-92a tiene buen valor de TC50 y de Emax comparable a antagomiR-23b. Nótese que valores bajos de EC50 indican mayor potencia antagonista del miRNA en cuestión, mientras que mayor TC50 indica menor toxicidad sobre el modelo celular de la enfermedad.

Además, se estudiaron los niveles de expresión de proteína en el modelo celular de la enfermedad (Fig. 3) encontrando, en primer lugar, que las células musculares DM1 expresan significativamente menos proteína MBNL1 que el control. Tomando como referencia la expresión detectada en las células DM1, se encontró que en todos los casos ocurre aumento en los niveles totales de la proteína, aunque algunos antagomiRs son activos a concentraciones más bajas que otros y los niveles de activación pueden ser distintos. Por ejemplo, para los antagomiR-20a o -100, a 10 nM (la menor concentración probada) la recuperación en la expresión de MBNL1 alcanza niveles normales, mientras que otros antagomiR son capaces de duplicar la expresión en células DM1 (antagomiR-92a y 222). Esto indica que algunos antagomiR son más efectivos que otros, como el antagomiR-181c, cuya activación de la expresión de MBNL1 es discreta, y requiere mayor concentración para conseguir niveles similares a los del resto de las moléculas.

En la figura 4 se muestran la evaluación de la actividad y toxicidad de los diferentes antagomiRs en células DM1 tras la transfección con los mismos a las diferentes concentraciones indicadas. Las distintas gráficas muestran de forma visual la métrica del Tindex dado de aquéllos antagomiR en los que la curva de EC y TC estén más separadas son los que muestran mayor diferencia entre las concentraciones a las que son activos y a las que muestran efectos tóxicos (ventana terapéutica). Por ejemplo, antagomiR-100 muestra actividad a concentraciones bajas y rápidamente alcanza el máximo de actividad posible mientras que solo a concentraciones casi dos órdenes de magnitud mayores presentan una reducción a la mitad en la viabilidad de las células musculares DM1. Este comportamiento es semejante al de antagomiR-23b y 218, que se muestran en comparación. En contraste, antagomiR-222 puede aumentar la expresión de MBNL1 de forma notable, pero lo hace a concentraciones a las que la curva de toxicidad ya está por encima del 50% de células muertas. El resto de antagomiRs muestran un comportamiento intermedio, AntagomiR-20a también muestra un comportamiento interesante pues a la menor concentración ensayada ya alcanza el máximo de actividad en términos de activación de MBNL1 siendo su TC50 al menos un orden de magnitud mayor. En antagomiR-181c la diferencia entre actividad y toxicidad es baja. Tomando en conjunto ambas curvas, se

observa que el antagomiR-100 presenta un patrón similar a los antagomiRs previamente patentados, -23b y -218, ya que sus niveles de actividad son muy altos desde la segunda dosis testada, pero su nivel de toxicidad supera la TC50 solo en dosis elevadas, es decir, que presenta una ventana terapéutica más amplia y por tanto más adecuada para su desarrollo farmacológico.

A continuación, se realizaron determinaciones de la expresión de los microRNAs de interés en diferentes tejidos humanos (Figura 5). Como se puede observar, el microRNA miR-100 se expresa casi exclusivamente en músculo esquelético y células satélite del mismo, tan solo con algo de expresión en fibroblastos, lo cual es de particular interés porque la musculatura esquelética es un tejido muy afectado en DM1 de modo que el efecto antagonista de los anti-miR-100 se anticipa específico, evitando eventuales consecuencias indeseables por represión de este miRNA en tejidos no alterados en la enfermedad. Por ejemplo, puesto que los anti-miR se acumulan en hígado y riñón, el hecho de que no se exprese la diana de anti-miR-100 en estos órganos evitará que se pueda llegar a una situación de falta de función de este miRNA en estos órganos, lo cual es deseable desde el punto de vista terapéutico. Por otro lado, también es de gran interés la expresión de miR-100 en células satélite porque estas son las células madre del músculo a partir de las cuales se puede promover la regeneración muscular. De hecho, se ha demostrado (Song KY, et al. MBNL1 reverses the proliferation defect of skeletal muscle satellite cells in myotonic dystrophy type 1 by inhibiting autophagy via the mTOR pathway. *Cell Death Dis.* 2020 Jul 18;11(7):545. doi: 10.1038/s41419-020-02756-8. PMID: 32683410; PMCID: PMC7368861.) que un aumento de MBNL1 en estas células revierte los defectos proliferativos que tienen estas células en DM1 por lo que actuar a nivel de las células satélite a través de una diana específica de las mismas se anticipa potencialmente terapéutico in vivo. Por último, el hecho de detectar miR-100 en músculo esquelético maduro confirma la relevancia de las observaciones realizadas in vitro con modelos celulares de la enfermedad, que puede diferir notablemente con el patrón de expresión in vivo en humanos adultos.

Por último, se realizó un ensayo para cuantificar las posibles diferencias de expresión de los distintos miRNAs dianas en modelos celulares de la enfermedad respecto de sus controles sanos. Los resultados de la Figura 6 muestran que la mayoría de los miRNAs seleccionados se detectan sobreexpresados en un modelo in vitro de la enfermedad siendo esta característica deseable en una diana terapéutica porque reduce el riesgo de efectos deletéreos por falta de función de la diana. Es decir, el objetivo terapéutico preferible no es solo reducir la expresión de un miRNA por debajo de sus valores normales sino llevarla a niveles similares a las de los controles sanos, preservando de este modo sus funciones

endógenas naturales. Como control, nótese que miR-218, ya previamente descrito sobreexpresado en DM1 (ver Cerro-Herreros E et al. Preclinical characterization of antagomiR-218 as a potential treatment for myotonic dystrophy. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2021 Jul 29;26:174-191. doi: 10.1016/j.omtn.2021.07.017. PMID: 34513303; PMCID: PMC8413838), se detecta aumentado en este modelo celular, así como miR-23b, mientras que miR-17 y otros no cambian significativamente su expresión y sirven como control de que no se trata de un efecto general sobre todos los miRNAs analizados.

5

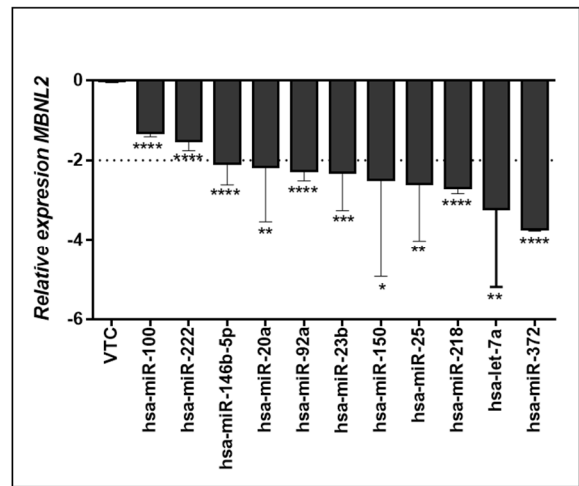
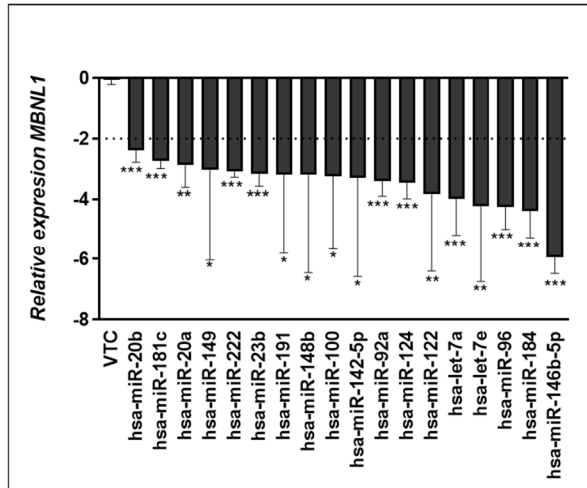
REIVINDICACIONES

1. Antagonista del microRNA humano miR-100 capaz de aumentar los niveles intracelulares de las proteínas MBNL1 y/o MBNL2.
2. Antagonista del microRNA humano miR-100 según la reivindicación 1, donde los niveles intracelulares de las proteínas MBNL1 y/o MBNL2 son aumentados en una célula muscular, preferiblemente en una célula muscular que presenta un fenotipo de distrofia muscular, preferiblemente distrofia miotónica de tipo 1.
3. Antagonista del microRNA humano miR-100 según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde dicho antagonista es una molécula de naturaleza oligonucleotídica y/o un análogo de oligonucleótidos.
4. Antagonista del microRNA humano miR-100 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho antagonista es un antimiR, un blockmiR, o una esponja de microRNA.
5. Antagonista del microRNA humano miR-100 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho antagonista comprende una región que es idéntica en al menos un 85% a la secuencia complementaria de la SEQ ID NO: 1.
6. Antagonista del microRNA humano miR-100 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho antagonista comprende una región de al menos 7 unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en un 100% a la secuencia complementaria a la región semilla del microRNA humano miR-100 tal y como ha sido definida ésta en la SEQ ID NO: 2.
7. Antagonista del microRNA humano miR-100 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho antagonista comprende una primera región de al menos 7 unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en un 100% a la secuencia complementaria a la región semilla del microRNA humano miR-100 tal y como ha sido definida ésta en la SEQ ID NO: 2, y donde dicho antagonista comprende además una segunda región de al menos 7 unidades contiguas de nucleótidos o de análogos de nucleótidos adyacentes a la primera región, donde dicha segunda región es idéntica en al menos un 90% a la secuencia complementaria a cualquier región presente en la SEQ ID NO: 1.

8. Antagonista del microRNA humano miR-100 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho antagonista comprende una región de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en al menos un 90% a la SEQ ID NO: 3.
- 5 9. Antagonista del microRNA humano miR-100 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde:
 - i) dicho antagonista comprende una región que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 3,
 - 10 ii) al menos una de las unidades de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que componen dicho antagonista es un análogo de nucleótidos que presenta una o más modificaciones químicas en el resto de la ribosa, en el enlace fosfato, o en ambos, y
 - 15 iii) optativamente, dicho antagonista presenta en el extremo 5' y/o en el extremo 3' una o más moléculas adicionales, preferiblemente colesterol.
- 20 10. Antagonista del microRNA humano miR-100 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho antagonista comprende una región de nucleótidos o de análogos de nucleótidos que es idéntica en al menos un 95% a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 8 o 13.
- 25 11. Antagonista del microRNA humano miR-100 según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, donde dicho antagonista consiste en la SEQ ID NO: 8 o en la SEQ ID NO: 13.
- 30 12. Composición que comprende al menos un antagonista del microRNA humano miR-100 tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 30 13. Composición según la reivindicación 12, donde dicha composición es una composición farmacéutica que adicionalmente comprende un vehículo y/o uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 35 14. Antagonista según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, para su uso como medicamento.
15. Antagonista según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, para su uso en el tratamiento de la distrofia miotónica, preferiblemente distrofia miotónica de tipo 1.

Figura 1

A



B

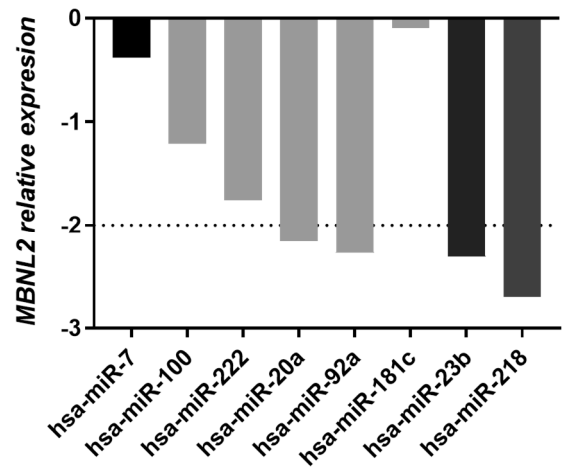
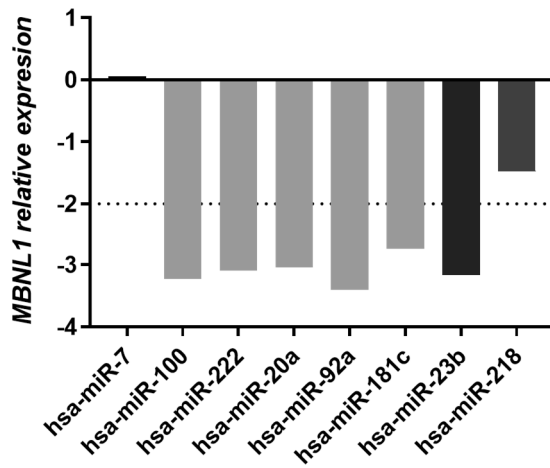


Figura 2

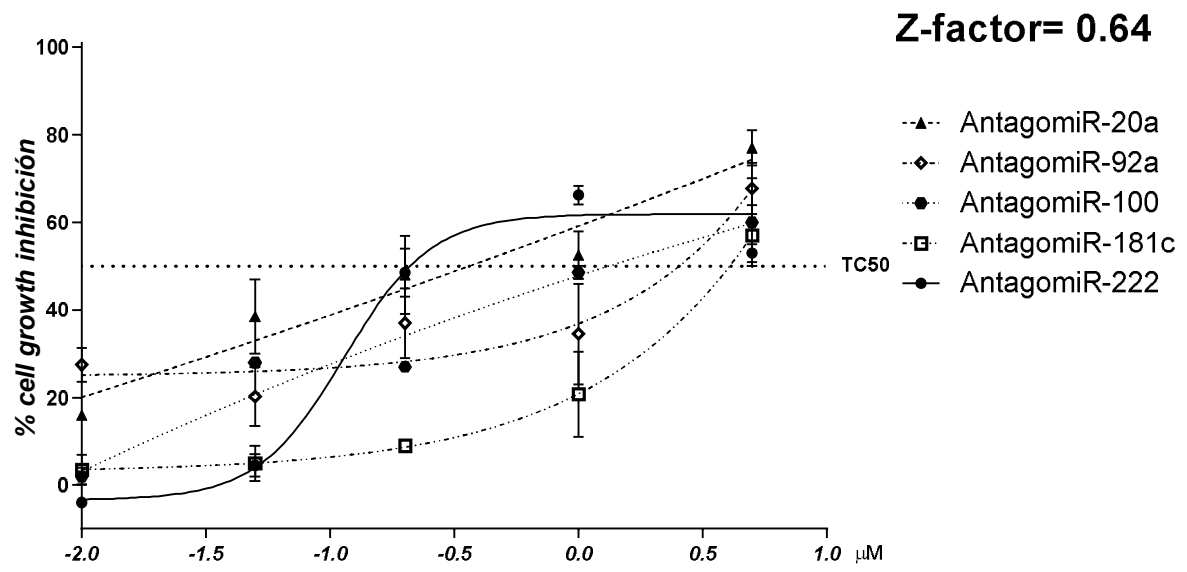


Figura 3

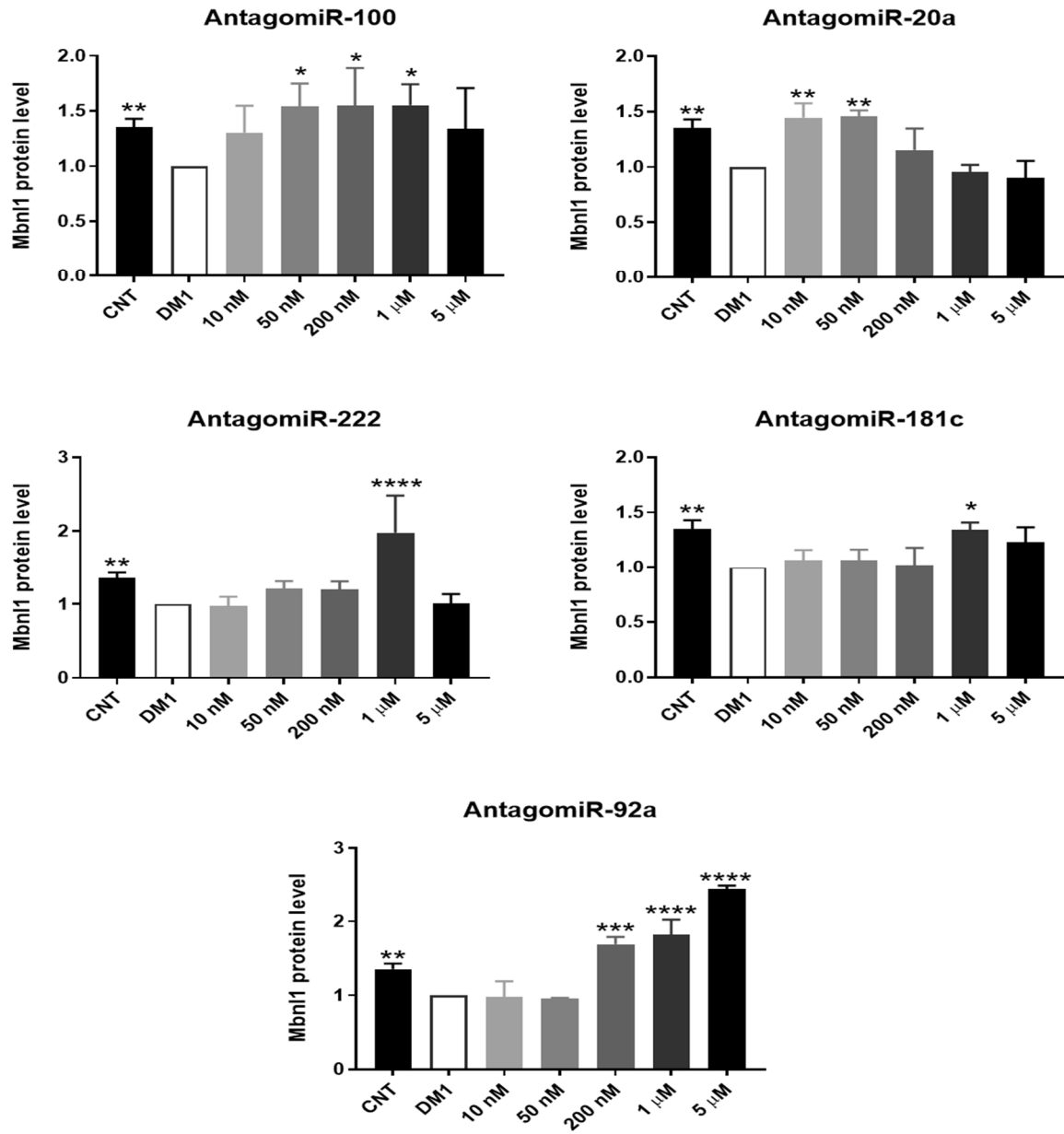


Figura 4

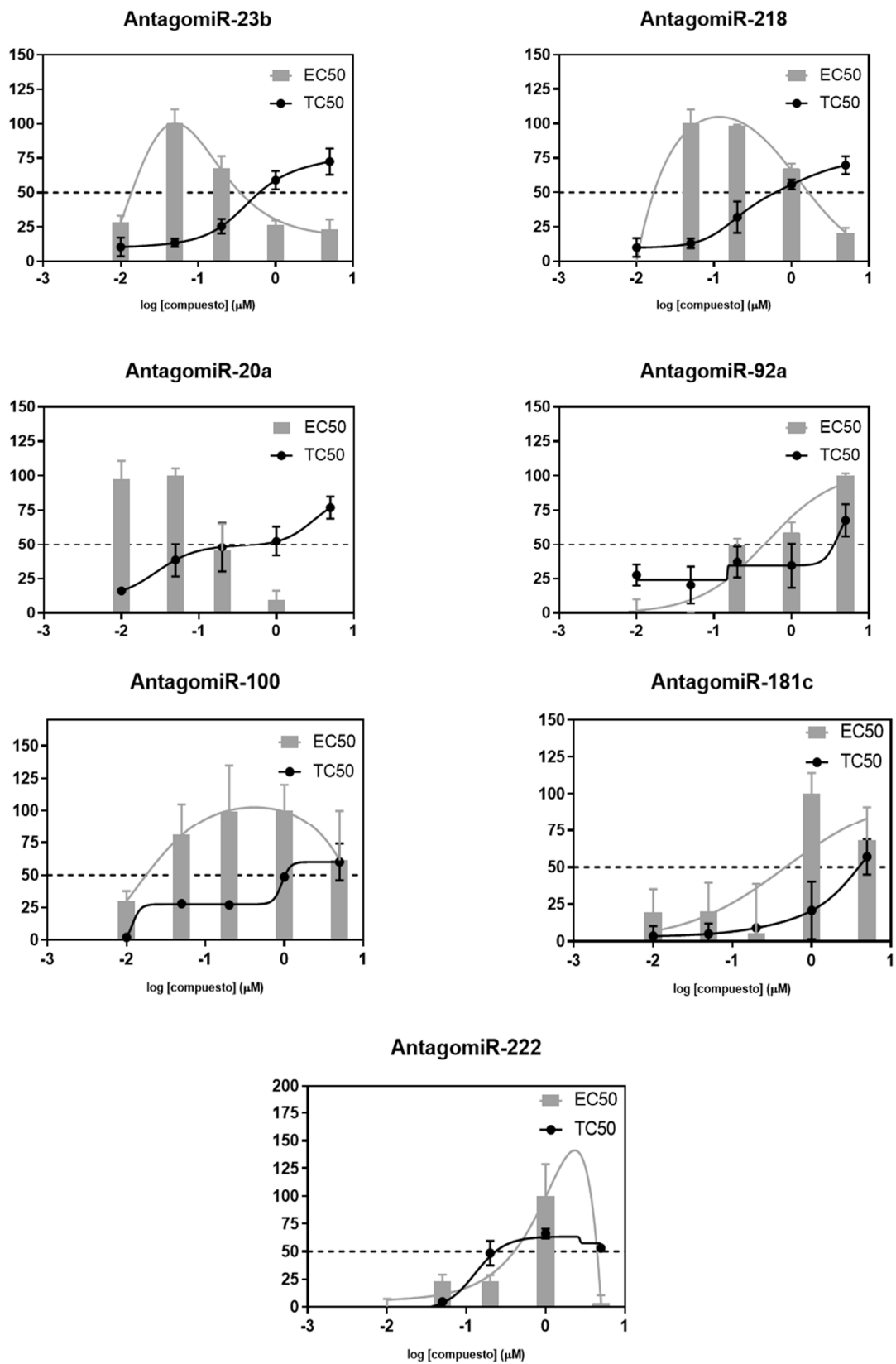


Figura 5

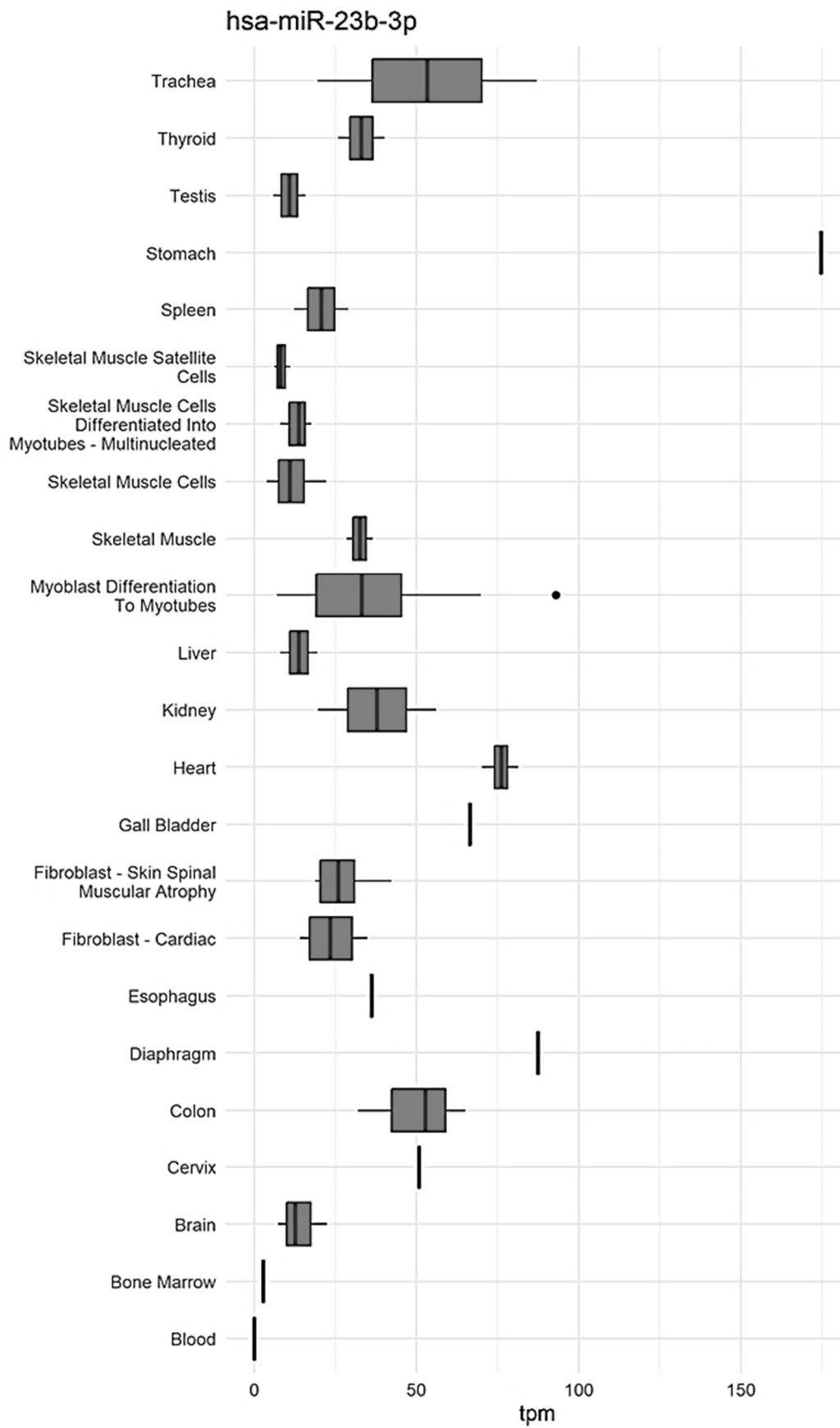


Figura 5 cont

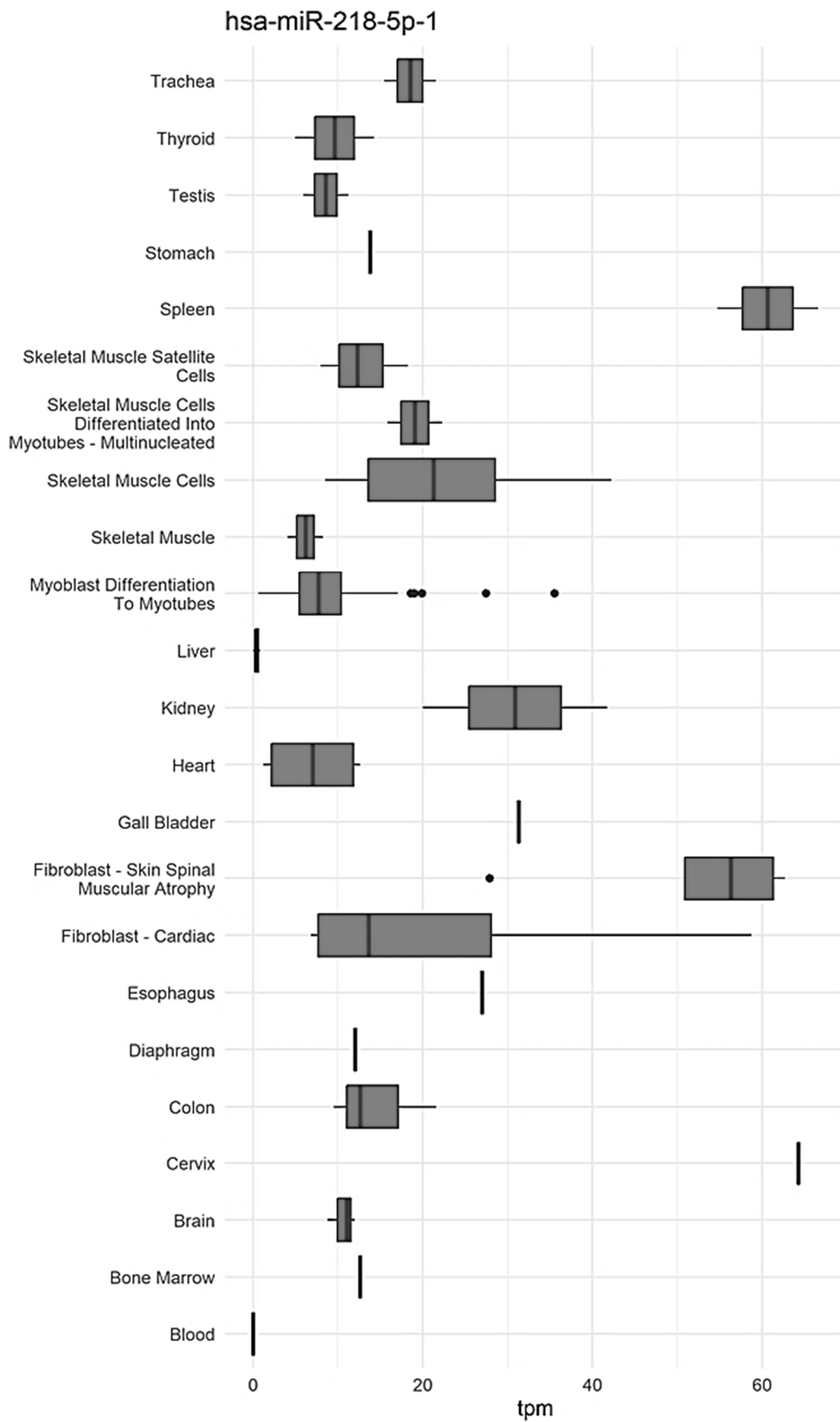


Figura 5 cont

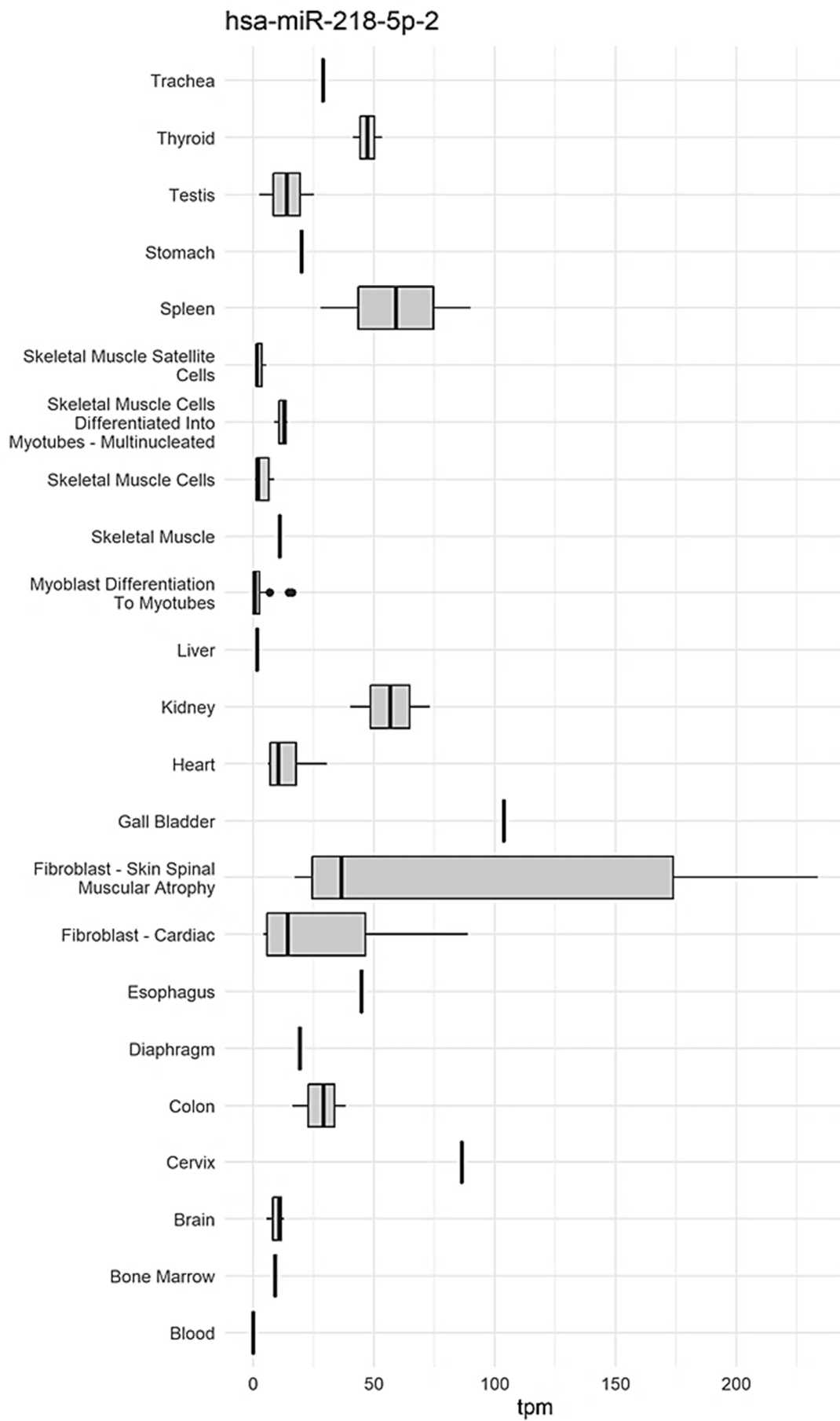


Figura 5 cont

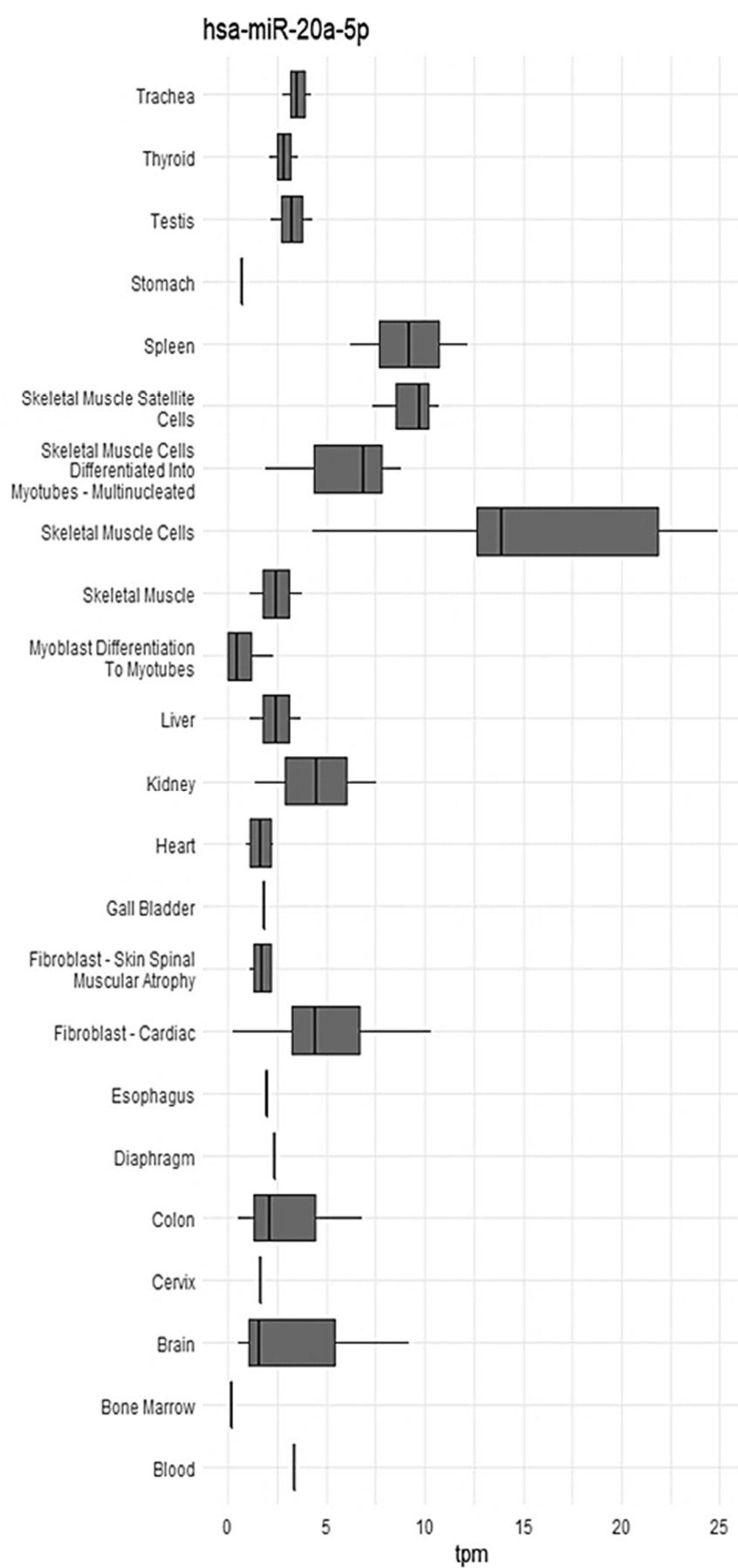


Figura 5 cont

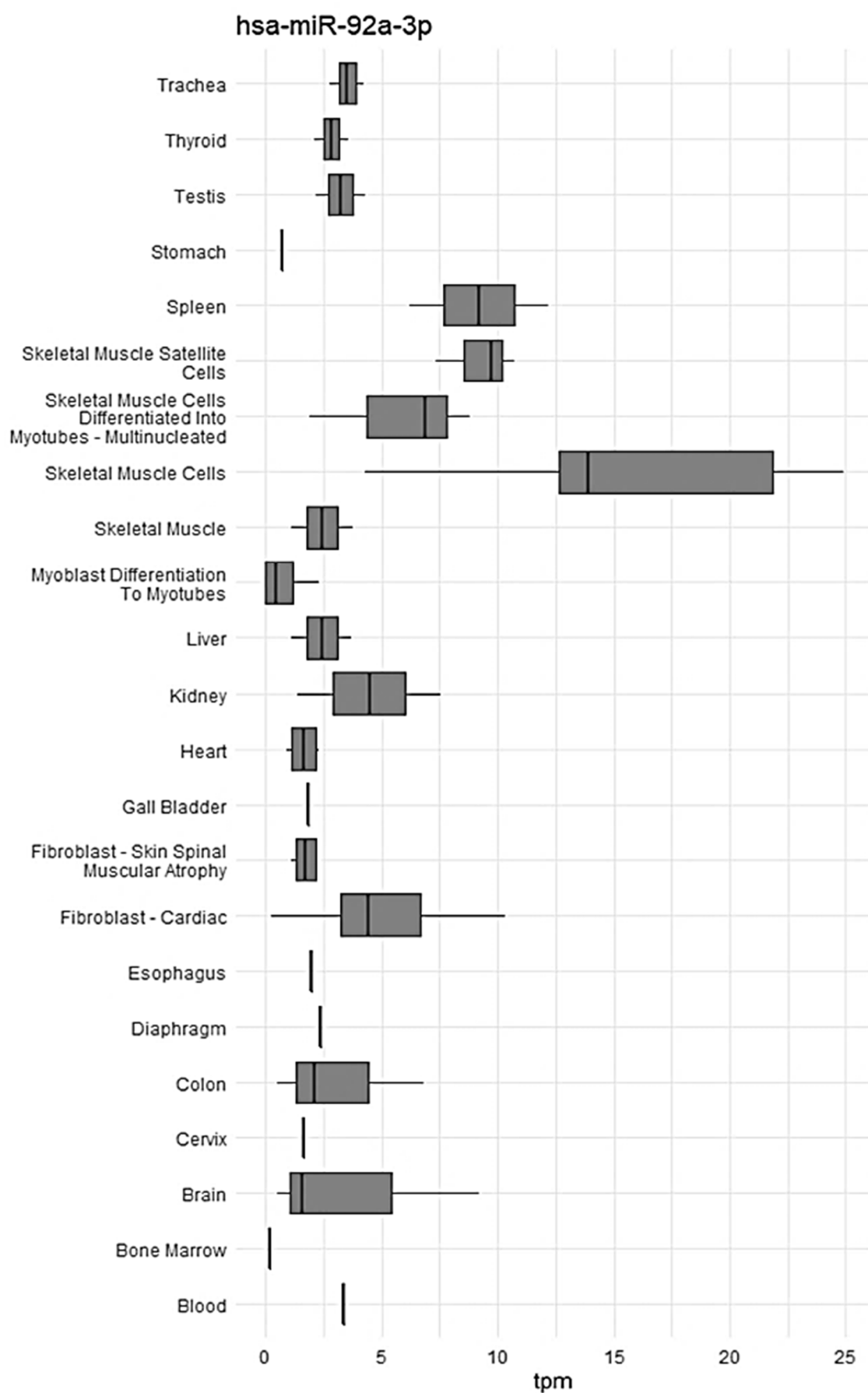


Figura 5 cont

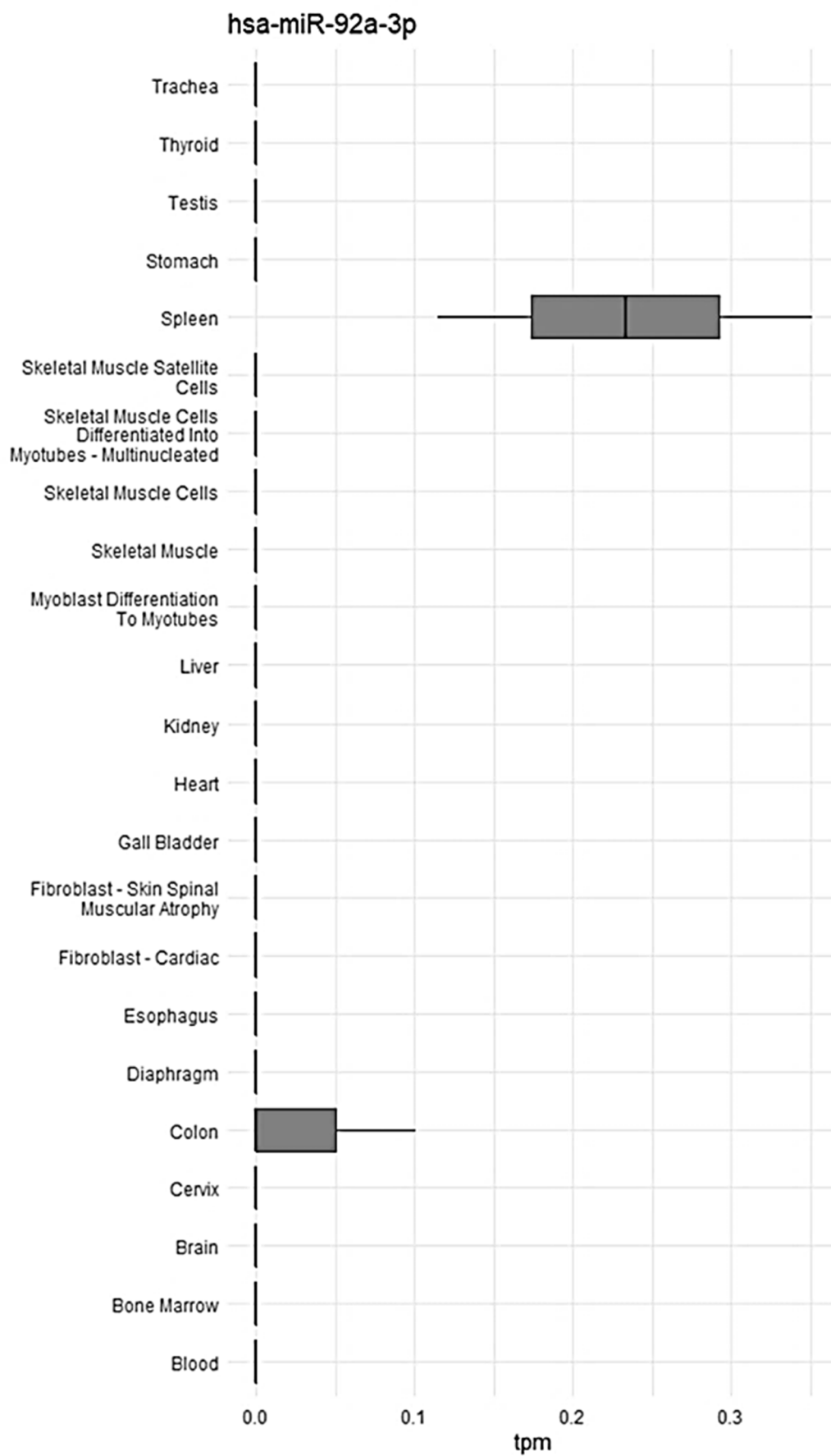


Figura 5 cont

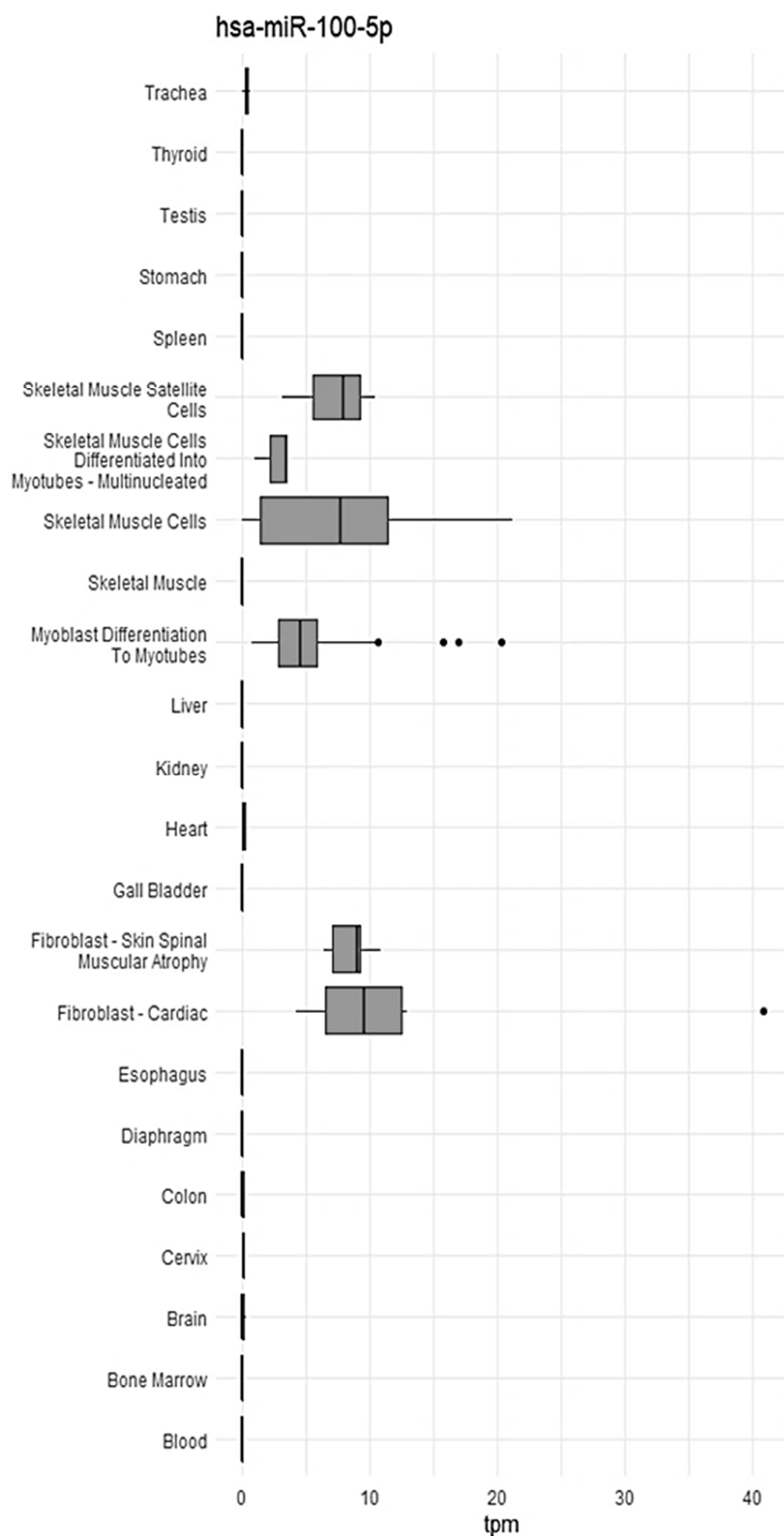


Figura 5 cont

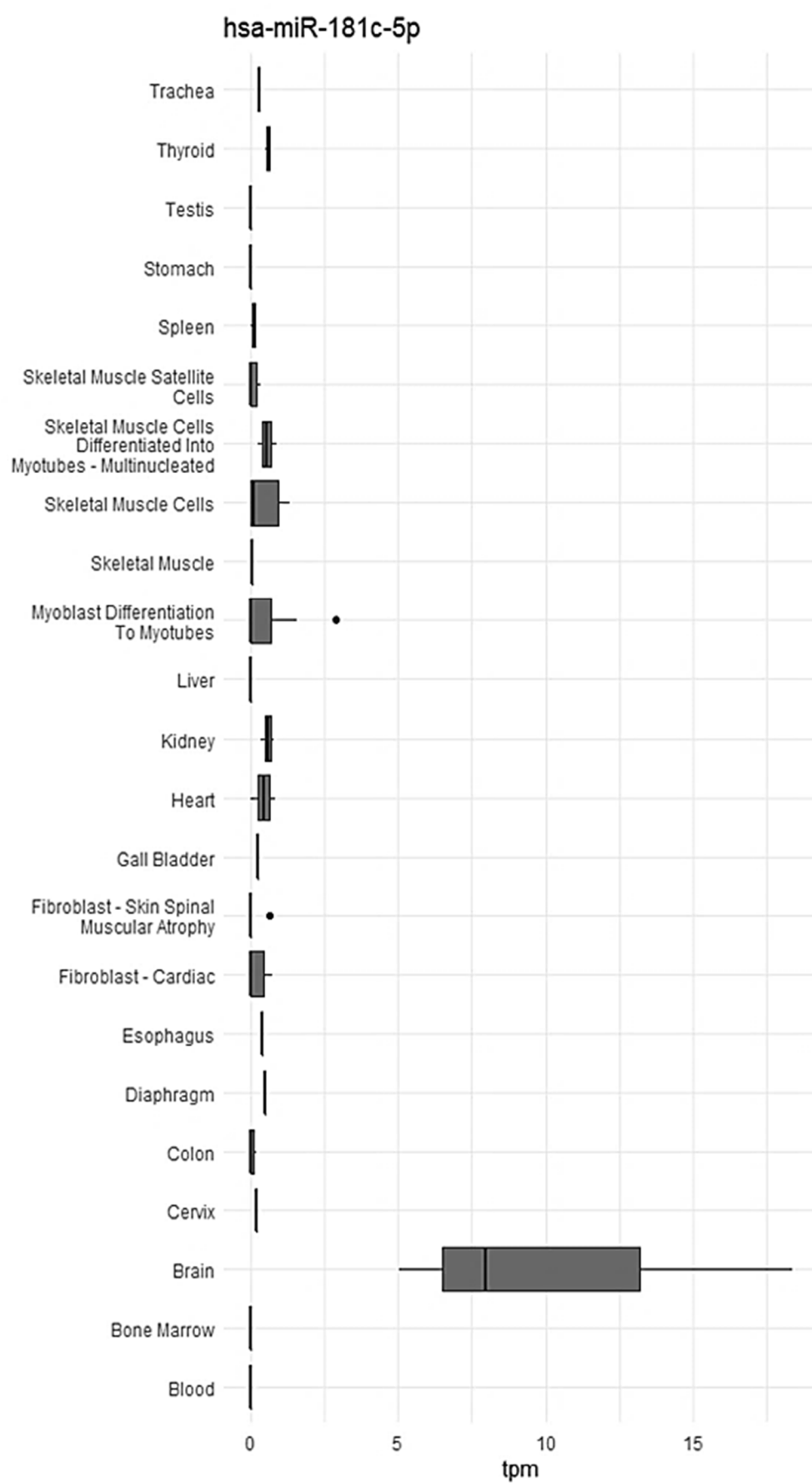
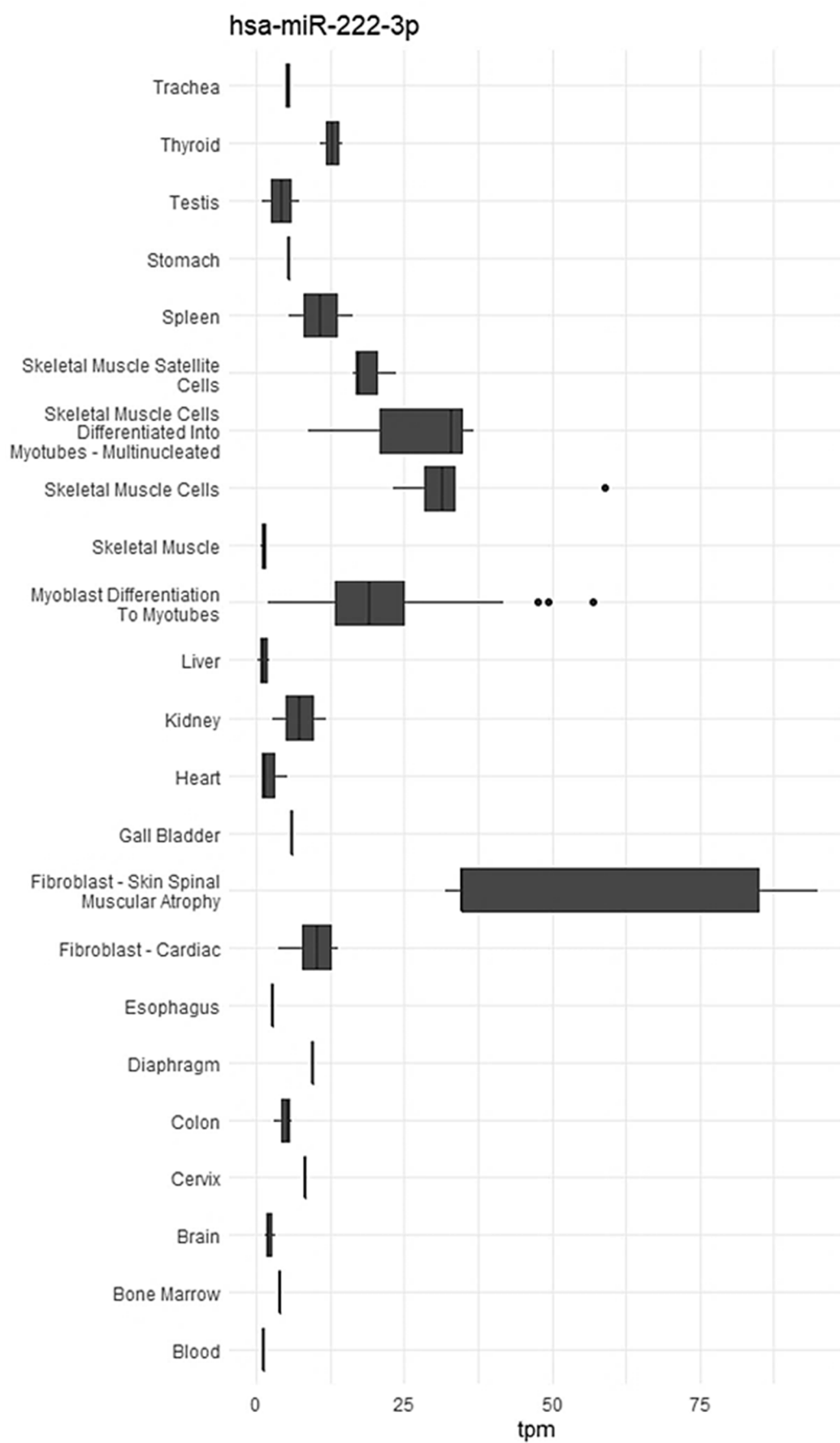


Figura 5 cont





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 202230311

②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.04.2022

②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. cl.: **C12N15/113** (2010.01)
A61K48/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2018017483 A1 (JAAN BIOTHERAPEUTICS LLC) 25/01/2018, párrafos [0026], [0046], [0047], [0189]; Tabla 6, 7, 9; SEQ NOS. 35, 46, 49, 51, 53, 55, 75, 78, 80, 82, 84; reivindicaciones 1, 63, 64.	1-15
X	US 2014377324 A1 (GRUNDMANN SEBASTIAN et al.) 25/12/2014, Párrafos [0046]- [0070]; Ejemplo 2; SEQ ID NOS: 1-9; reivindicaciones 1-8.	1-14
A	WO 2018050930 A1 (UNIV VALENCIA) 22/03/2018. Todo el documento.	1-15
A	OVERBY SARAH J et al. Proof of concept of peptide-linked blockmiR-induced MBNL functional rescue in myotonic dystrophy type 1 mouse model. Molecular Therapy-Nucleic Acids. 08/03/2022, Vol. 27, Páginas 1146-1155, ISSN 2162-2531(print) ISSN 2162-2531(electronic), <DOI: doi: 10.1016/j.omtn.2022.02.003>. Todo el documento.	1-15

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
23.02.2023

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/2

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

C12N, A61K

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEC, NPL, EMBL-EBI, INTERNET