

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 669**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2011 E 11803673 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2594275**

54 Título: **Agente profiláctico o terapéutico para la diabetes**

30 Prioridad:

08.07.2010 JP 2010156261

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

09.06.2016

73 Titular/es:

**TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED
(100.0%)
1-1 Doshomachi 4-chome Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 541-0045, JP**

72 Inventor/es:

**KUNISADA, RIE;
MATSUMOTO, HIROKAZU y
UCHIYAMA, HIDEFUMI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 573 669 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agente profiláctico o terapéutico para la diabetes

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un nuevo agente para la profilaxis o el tratamiento de la diabetes. Más en particular, la presente invención se refiere a un agente terapéutico para la diabetes, que contiene un polinucleótido tal como microARN (en lo sucesivo denominado a veces "miARN") y similares, y similares.

Además, la presente invención se refiere a un método de cribado de un fármaco terapéutico para la diabetes y similares, un método para determinar la susceptibilidad de pacientes con diabetes a un fármaco terapéutico para la diabetes y similares, y similares.

10 Antecedentes de la invención

La diabetes es una de las cinco enfermedades principales en los países avanzados, y su influencia está creciendo anualmente también en otros países. Se sabe que las células β pancreáticas encargadas del control de glucosa en la sangre gestionan el aumento en la cantidad de insulina necesaria en el cuerpo debido a la obesidad, embarazo, diabetes y similares, aumentando la masa celular por hipertrofia, neogénesis, crecimiento y supresión de apoptosis. 15 Puesto que el fármaco terapéutico actual para la diabetes es principalmente una terapia sintomática para controlar el nivel de glucosa en la sangre, es difícil curar la diabetes completamente una vez que se ha desarrollado. Con dichos antecedentes, se espera el desarrollo de un fármaco terapéutico para la diabetes, que tenga un efecto de aceleración de la proliferación de células β pancreáticas como acción principal y se dirija a la cura completa de la diabetes.

20 En años recientes, se ha sugerido que varios miARN se expresan en células animales y tienen funciones biológicamente importantes. Por ejemplo, se ha descrito que miR-375 suprime la cantidad de insulina secretada de las células β pancreáticas de una forma dependiente de glucosa (documento de no patente 1).

Como otro ejemplo, el documento de no patente 2 describe que miRNA-34a y miRNA-146 son regulados por aumento en células beta pancreáticas como resultado de cantidades mayores de ácidos grasos libres en la dieta. Se describe además que ambos genes diana de los miARN implicados en la muerte de células beta pancreáticas (apoptosis) y que un aumento de su presencia que resulta de un exceso de ácidos grasos libres conduce a una mayor cantidad de apoptosis de células beta. 25

Como para el miR-199b*, hay informes que han documentado que el nivel de expresión de miR-199b-prec disminuye en un tejido de cáncer de pulmón (documento de no patente 3), miR-199b-5p funciona como un factor regulador de la señal Notch por la regulación de la expresión de HES1 en una línea celular de mieloma (documento de no patente 4), el nivel de expresión de miR-199b disminuye durante la diferenciación de células HL-60 de leucemia humana por el 4-hidroxinonenal (documento de no patente 5), mmu-miR-199b es expresado en células de piel de cabra (documento de no patente 6), el nivel de expresión de miR-199b es significativamente bajo en células ciliadas de 30 cáncer humano comparado con células normales (documento de no patente 7) y similares. Además, se ha descrito un método de diagnóstico de cáncer de mama usando miR-199b (documento de patente 1), un método de diagnóstico de cáncer de pulmón usando miR-199b-prec (documento de patente 2), un método terapéutico de cáncer usando hsa-mir-199a (documento de patente 3) y similares. 35

Lista de documentos

Documentos de patente

40 documento de patente 1: WO2007/081740

documento de patente 2: WO2007/081720

documento de patente 3: WO2009/099465

Documentos de no patente

documento de no patente 1: *Nature*, 2004, 432, pág. 226-230

45 documento de no patente 2: *Diabetes*, 2008, 57, pág. 2728-36

documento de no patente 3: *Cancer Cell*, 2006, 9, pág.189-198

documento de no patente 4: *PLoS ONE*, 2009, 4, e4998

documento de no patente 5: *Free Radical Biology & Medicine*, 2009, 46, pág. 282-288

documento de no patente 6: *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 2007, 11, pág. 385-396

documento de no patente 7: *Cancer Letters*, 2010, 291, pág. 99-107

Compendio de la invención

Problemas a resolver por la invención

5 Un objeto de la presente invención es proporcionar un medio nuevo para la profilaxis o tratamiento de la diabetes, que tiene efecto de aceleración de la proliferación de células β pancreáticas como una acción principal. Además, otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de diagnóstico muy conveniente y preciso para la susceptibilidad a un agente profiláctico o terapéutico para la diabetes.

Medios de resolver los problemas

10 Los autores de la presente invención han realizado un análisis de expresión completo en un tejido de páncreas de un modelo de pancreatometomía parcial de notable aceleración de la proliferación de todas las células pancreáticas, incluyendo las células β pancreáticas, del cuerpo, y además han examinado el efecto de aceleración de la proliferación de miARN para las células β pancreáticas en el sistema de evaluación de proliferación de células β pancreáticas in vivo, usando células de islotes de cultivo primario, y encontraron que miR-199b* inesperadamente
15 tiene una actividad de aceleración de la proliferación de células β pancreáticas. Basándose en estos descubrimientos, los autores de la presente invención han llevado a cabo estudios adicionales y han completado la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a lo siguiente.

[1] Un agente para la profilaxis o tratamiento de la diabetes, que comprende un polinucleótido que comprende una
20 secuencia de bases igual o que tiene una homología no menor de 90% con la secuencia de bases mostrada en las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, o un polinucleótido que comprende una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases, o una sal de los mismos.

[1A] Un método como se describe en la reivindicación 5.

25 Se describe además [2], un agente para la proliferación de células β pancreáticas, que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases igual o que tiene una homología no inferior al 90% con la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, o un polinucleótido que comprende una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases, o una sal de los mismos.

[3] Un método para la profilaxis o tratamiento de la diabetes en un mamífero, que comprende administrar una
30 cantidad eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de bases igual o que tiene una homología no menor de 90% con la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, o un polinucleótido que comprende una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases, o una sal de los mismos, a dicho mamífero.

[4] Un método para la proliferación de células β pancreáticas en un mamífero, que comprende administrar una
35 cantidad eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de bases igual o que tiene una homología no menor de 90% con la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, o un polinucleótido que comprende una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases, o una sal de los mismos, a dicho mamífero.

[5] Uso de un polinucleótido que comprende una secuencia de bases igual o que tiene una homología no menor de
40 90% con la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, o un polinucleótido que comprende una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases, o una sal de los mismos, para la producción de un agente para la profilaxis o tratamiento de la diabetes.

[6] Uso de un polinucleótido que comprende una secuencia de bases igual o que tiene una homología no menor de
90% con la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, o un polinucleótido que comprende una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases, o una sal de los mismos, para la producción de un agente para la proliferación de células β pancreáticas.

45 [7] Un método de cribado de un fármaco para la profilaxis o tratamiento de la diabetes, que comprende medir un nivel de expresión de un polinucleótido que comprende una secuencia de bases igual o que tiene una homología no menor de 90% con la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4.

[8] Un método de cribado de una sustancia que hace proliferar las células β pancreáticas, que comprende medir un
50 nivel de expresión de un polinucleótido que comprende una secuencia de bases igual o que tiene una homología no menor de 90% con la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4.

[9] Un método para determinar la susceptibilidad de un paciente con diabetes a un fármaco para la profilaxis o tratamiento de la diabetes, que comprende medir un nivel de expresión de un polinucleótido que comprende una

secuencia de bases igual o que tiene una homología no menor de 90% con la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4.

5 [10] Un método para determinar la susceptibilidad de un paciente con diabetes a un fármaco para la proliferación de células β pancreáticas, que comprende medir un nivel de expresión de un polinucleótido que comprende una secuencia de bases igual o que tiene una homología no menor de 90% con la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4.

Efecto de la invención

10 Puesto que el polinucleótido de la presente invención acelera la proliferación de células β pancreáticas, tiene un efecto profiláctico o terapéutico para enfermedades tales como la diabetes, y similares. Además, usando la expresión del polinucleótido de la presente invención como un índice, se puede llevar a cabo el cribado de un agente profiláctico o terapéutico para la diabetes, y la determinación de la susceptibilidad a un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes.

Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 muestra los niveles de expresión relativos de miR-199b* maduro en células de islotes de cultivo primario de ratas transfectadas con el precursor de miARN Pre-miR que expresa mmu-miR-199b*. Para el tratamiento estadístico, se usó la prueba de Williams paramétrica (# indica significativo).

20 La figura 2 muestra el aumento de número de células positivas para insulina y positivas para BrdU, y el número de células positivas para insulina en células de islotes de cultivos primarios de rata transfectadas con precursor de miARN Pre-miR que expresa mmu-miR-199b*. Para el tratamiento estadístico relacionado con la dependencia a la concentración, se usó la prueba de Williams paramétrica (# indica significativo), y para el tratamiento estadístico de otros ítems, se usó la prueba t (* muestra $0,01 < P < 0,05$, ** muestra $P < 0,01$).

25 La figura 3 muestra el aumento del número de células positivas para insulina y positivas para BrdU en células de islotes de cultivo primario de rata transfectadas con precursor de miARN Pre-miR que expresa hsa-miR-199a-3p, precursor de miARN Pre-miR que expresa hsa-miR-199a-3p o precursor de miARN Pre-miR que expresa hsa-miR-199b-5p. Para el tratamiento estadístico relacionado con la dependencia a la concentración, se usó la prueba de Williams paramétrica (# indica significativo), y para el tratamiento estadístico de otros ítems, se usó la prueba t (* muestra $0,01 < P < 0,05$, ** muestra $P < 0,01$).

30 La figura 4 muestra el aumento de expresión de los genes de ciclina D1 y ciclina E2 en células de islotes de cultivo primario transfectadas con precursor de miARN Pre-miR que expresa mmu-miR-199b*. Para el tratamiento estadístico, se usó la prueba de Williams paramétrica (# indica significativo).

Descripción detallada de la invención

35 En la presente memoria descriptiva, miARN se refiere a un transcrito de ARN no procesado (p. ej., precursor) o procesado (p. ej., maduro) producido a partir del gen de miARN. El transcrito de ARN no procesado mencionado antes también se indica como "miARN zenku-tai" o "precursor de miARN", y en general está constituido por aproximadamente 70-100 bases. El precursor de miARN es procesado en una molécula de ARN activa que tiene 19-25 bases por digestión con ribonucleasa (p. ej., Dicer), Argonaut, o ribonucleasa III (p. ej., ribonucleasa III de Escherichia coli). En la presente memoria descriptiva, la molécula de ARN activa que tiene 19-25 bases se denomina "miARN maduro". La actividad del miARN maduro se refiere a una actividad para unirse a un ARNm diana que tiene una secuencia complementaria del miARN maduro, y produce escisión del ARNm diana.

40 El polinucleótido para usar en la presente invención (en la presente memoria descriptiva, a veces se denomina "el polinucleótido de la presente invención"), o una de sus sales, contiene al menos una secuencia de bases seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente (A)-(C):

(A) la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4;

45 (B) una secuencia de bases que tiene una homología no menor de 90% con la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4; y

(C) una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases del apartado (A) o (B) mencionados antes.

50 En la presente memoria descriptiva, salvo que se especifique en particular, la secuencia de bases del polinucleótido se describe como una secuencia de cualquiera de ADN y ARN, pero se puede considerar la sustitución entre sí de la timina (T) y uracilo (U) en posiciones opcionales. Además, cuando el polinucleótido es ADN, no es necesario decir que cualquier uracilo (U) se sustituye por timina (T), y cuando el polinucleótido es ARN, todas las timinas (T) se sustituyen por uracilo (U).

En el apartado (A) mencionado antes, la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 1 es una secuencia de bases de mmu-miR-199b* (también denominada mmu-miR-199b-5p). La secuencia de bases mostrada en la SEQ ID

NO: 2 es mmu-miR-199b (también denominada mmu-miR-199b-3p), que es la misma secuencia de bases de hsa-miR-199b-3p, mmu-miR-199a-3p, hsa-miR-199a-3p y rno-miR-199a-3p. La secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 3 es una secuencia de bases de mmu-miR-199a-5p, hsa-miR-199a-5p y rno-miR-199a-5p. La secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 4 es una secuencia de bases de hsa-miR-199b-5p.

- 5 La secuencia de bases del apartado (B) mencionado antes tiene una homología no menor de 90%, preferiblemente no menor que 95% (es decir, identidad) con la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4.

Como se usa en la presente memoria, "homología" significa la proporción (%) de las mismas bases respecto a todas las bases que se solapan en el alineamiento óptimo, donde se alinean dos secuencias de bases usando un algoritmo matemático conocido en el campo técnico relevante (el algoritmo es tal que se puede introducir un hueco en una o ambas secuencias para el alineamiento óptimo). La homología de la secuencia de bases en la presente memoria descriptiva se puede calcular, por ejemplo, usando un algoritmo de cálculo de homología NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) en las siguientes condiciones (valor esperado=10; permitir hueco; filtración=ON; puntuación de correspondencia=1; puntuación de correspondencia errónea=-3). Otros algoritmos para determinar la homología de una secuencia de bases incluyen, por ejemplo, el algoritmo descrito en Karlin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5873-5877 (1993) [dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) (Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402 (1997))], el algoritmo descrito en Needleman et al., *J. Mol. Bio.*, 48: 444-453 (1970) [dicho algoritmo está incorporado en el programa GAP en el paquete de programas GCG], el algoritmo descrito en Myers y Miller, *CABIOS*, 4: 11-17 (1988) [dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de programas de alineamiento de secuencias CGC], el algoritmo descrito en Pearson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444-2448 (1988) [dicho algoritmo está incorporado en el programa FASTA en el paquete de programas de GCG] y similares, y también se pueden usar preferiblemente de la misma forma.

La secuencia de bases del apartado (B) mencionado antes abarca la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, excepto que se eliminan, sustituyen, añaden o insertan 1 o 2 bases. Los ejemplos de dichas secuencias de bases incluyen (i) la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, excepto que se eliminan 1 o 2 bases, (ii) la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, excepto que se añaden 1 o 2 bases, (iii) la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, excepto que se insertan 1 o 2 bases, (iv) la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, excepto que se sustituyen 1 o 2 bases por otra base, y (v) las secuencias de bases en donde dichas mutaciones están combinadas (con la condición de que el número total de bases eliminadas, sustituidas, añadidas o insertadas sea 2).

Cuando las secuencias de bases contienen mutaciones (eliminación, sustitución, adición o inserción), como se ha mencionado antes, no hay restricciones en relación con las posiciones de las mutaciones.

La secuencia de bases del apartado (C) mencionado antes, es completamente complementaria de la secuencia de bases de los apartados (A) o (B) mencionados antes.

- 35 El polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, tiene una actividad para acelerar la proliferación de células β pancreáticas. Los ejemplos de las células β pancreáticas mencionadas antes incluyen células β pancreáticas de mamíferos (p. ej., ser humano, mono, ratón, rata, conejo, cerdo).

La actividad del polinucleótido para acelerar la proliferación de células β pancreáticas se puede medir de acuerdo con el método descrito en los ejemplos mencionados más adelante. Por ejemplo, las células de islotes de cultivo primario de rata, se transfectan con un polinucleótido diana de evaluación en una concentración final de 2,5-50 nM usando DharmaFECT1 (Thermo Scientific) y similares, y se compara el número de células β pancreáticas el día 5 desde la transfección entre el grupo transfectado con el polinucleótido diana de evaluación y el grupo de control negativo (grupo transfectado con miARN desordenado o grupo sin transfección con el polinucleótido diana de evaluación).

- 45 Por ejemplo, una actividad para aumentar el número de células β pancreáticas en 10% o más comparado con el control negativo, se puede definir como "una actividad para acelerar la proliferación de células β pancreáticas".

Aunque la longitud del polinucleótido de la presente invención no está particularmente limitada siempre que tenga una actividad para acelerar la proliferación de células β pancreáticas de mamífero, desde los aspectos de facilidad de síntesis, en general tiene no más de 200 pb, preferiblemente no más de 100 pb, más preferiblemente no más de 80 bp.

Los ejemplos preferibles del polinucleótido de la presente invención incluyen polinucleótidos que contienen la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4.

Los ejemplos más preferibles del polinucleótido de la presente invención incluyen polinucleótidos que consisten en la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4.

- 55 El polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, puede ser un polinucleótido que contiene 2-desoxi-D-ribosa, un polinucleótido que contiene D-ribosa, un polinucleótido que contiene N-glucósido de base púrica o base

pirimidínica, un polinucleótido que contiene cadena principal no nucleotídica (p. ej., polímero de ácido nucleico de proteína disponible en el comercio y ácido nucleico específico de secuencia sintético) u otro polímero que contiene un enlace especial (con la condición de que el polímero contiene un nucleótido que tiene una configuración que permite el emparejamiento de bases y la unión de bases, como se muestra en el ADN y ARN), y similares. Estos pueden ser ADN bicatenarios, ADN monocatenarios, ARN bicatenarios, ARN monocatenarios, o híbridos de ADN:ARN, y también pueden ser polinucleótidos no modificados (u oligonucleótidos no modificados); los polinucleótidos con modificaciones conocidas, por ejemplo, aquellos con marcadores conocidos en la técnica, aquellos con remates, aquellos metilados, aquellos con sustitución de uno o más nucleótidos naturales por su análogo, aquellos con modificaciones intramoleculares de nucleótidos tales como aquellos con enlaces sin carga (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos y similares) y aquellos con enlaces cargados o enlaces que contienen azufre (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos y similares); aquellos que tienen grupos en cadenas laterales tales como proteínas (nucleasas, inhibidores de nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina y similares) o sacáridos (por ejemplo, monosacáridos y similares); aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno y similares); aquellos con queladores (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes y similares); aquellos con agentes alquilantes; o aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos α anómeros y similares). Como se usa en el presente documento, "nucleótido" y "ácido nucleico" puede comprender no solo las bases púricas y pirimidínicas, sino también otras bases heterocíclicas modificadas. Los ejemplos de otras bases heterocíclicas modificadas incluyen base púrica y base pirimidínica metilada, y base púrica y base pirimidínica acilada. El nucleótido de la presente invención o un nucleósido que constituyen el nucleótido de la presente invención puede tener un resto de azúcar modificado. Los ejemplos de la modificación del resto de azúcar incluyen sustitución por un átomo de halógeno, un grupo alifático y similares, de un grupo hidroxilo en el resto azúcar, y conversión en un grupo funcional, tal como éter, amina y similares, de un grupo hidroxilo en el resto azúcar.

Para mejorar la estabilidad el polinucleótido de la presente invención se puede modificar químicamente. Los ejemplos de dicha modificación química incluyen, (a) modificación química internucleósida en la cadena principal ((a-1) modificación química de polinucleótido que tiene un átomo de fósforo internucleósido en la cadena principal y (a-2) modificación química de polinucleótido que no tiene un átomo de fósforo internucleósido en la cadena principal), (b) modificación química del resto azúcar, (c) modificación del resto nucleobase, (d) modificación por conjugación con fragmentos dirigidos, (e) modificación química por un polinucleótido que constituye una región químicamente independiente, y (f) modificación descrita en "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, EE.UU.

Los ejemplos preferidos de la modificación química (a-1) mencionada antes del polinucleótido que tiene un átomo de fósforo internucleósido en la cadena principal incluyen fosforotioato, fosforotioato asimétrico, fosforoditioato, fosfotriéster, aminoalquilfosfotriéster, 3'-alquilenfosfonato, alquil(p. ej., metil)fosfonato que contiene fosfonato asimétrico, fosfinato, 3'-aminofosforamidato, fosforamidato, fosforamidato que contiene aminoalquil-fosforamidato, tionofosforamidato, tionoalquilfosfonato, tionoalquilfosfotriéster, boranofosfato, sus análogos de enlace 2'-5', y modificación en donde las parejas adyacentes de unidades de nucleósidos son de 3'-5' a 5'-3', o de 2'-5' a 5'-2'.

El polinucleótido (a-1) mencionado antes que tiene un átomo de fósforo internucleósido en la cadena principal, se puede producir por los métodos descritos, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.195; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.316; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.625.050 y similares, o un método análogo a estos.

Los ejemplos preferidos de los polinucleótidos (a-2) mencionados antes que no tienen un átomo de fósforo internucleósido en la cadena principal, incluyen un polinucleótido que tiene una cadena principal formada por un enlace internucleósido de cadena de alquilo corta o cicloalquilo, enlace internucleósido en donde el heteroátomo y el alquilo o cicloalquilo se mezclan, o uno o más heteroátomos en cadena corta o enlace internucleósido heterocíclico. Estos incluyen aquellos que tienen un enlace morfolino (parcialmente formado a partir del resto azúcar del nucleósido); cadena principal de siloxano; cadena principal de sulfuro, sulfóxido o sulfona; cadenas principales de formaceto y tioformaceto; cadenas principales de metilenformaceto y tioformaceto; cadena principal que contiene alqueno; cadena principal de sulfamato; cadenas principales de metilenimino y metilendiazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadena principal de amida; y cadena principal que contiene una parte mixta de componentes N, O, S y CH₂.

El polinucleótido (a-2) mencionado antes que no tiene un átomo de fósforo internucleósido en la cadena principal, se puede producir, por ejemplo, por el método descrito en las patentes de EE.UU. n° 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.64.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; 5.677.439 y similares, o un método análogo al mismo.

Los ejemplos de la modificación química (b) mencionada antes del resto azúcar, incluyen la modificación química de sustitución en la posición 2' con un sustituyente seleccionado del siguiente grupo A.

Grupo A: OH; F; O- S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-[(alquilen)_nO]_n-alquilo, en donde el alquilo, alqueno, alqueno y alquino pueden estar sustituidos o no sustituidos con alquilo C₁ a C₁₀, alqueno C₁ a C₁₀, o alqueno y alquino C₂ a C₁₀. Se prefieren en particular O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, y O(CH₂)_nO(CH₂)_mNH₂, donde n y m son de 1 a 10 (preferiblemente de 1 a 3) y NH₂ puede estar mono o disustituido con alquilo C₁ a C₆ (p. ej., metilo). La modificación química particularmente preferida incluye metoxietoxi (-O-CH₂CH₂OCH₃ también conocido como -MOE) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504), dimetilaminoetoxi (grupo -O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como -DMAOE), y dimetilaminoetoxietoxi (-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-N(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAEOE).

Otros ejemplos de la modificación química (b) mencionada antes del resto azúcar, incluyen la modificación química de sustitución en la posición 2' con un sustituyente seleccionado del siguiente grupo B.

Grupo B: (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alquilarilo, aralquilo, O-alquilarilo o O-aralquilo) C₁ a C₁₀, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalquilarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas del polinucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas del polinucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares.

Otros ejemplos de la modificación química (b) mencionada antes del resto azúcar, incluyen la modificación química de sustitución en la posición 2' con metoxi, aminopropoxi o fluoro. Otros ejemplos de la modificación química del resto azúcar incluyen la modificación química de sustitución en la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal o azúcar en la unión 2'-5' del polinucleótido y posición 5' del nucleótido 5' terminal con metoxi, aminopropoxi o fluoro, y modificación de sustitución del azúcar pentofuranosilo por un mimético del azúcar tal como resto ciclobutilo.

Los ejemplos de modificación química de otro resto azúcar incluyen la modificación para bloquear un resto azúcar como se describe en la patente de EE.UU. n° 6.770.748.

Los ejemplos de modificación química de otro resto azúcar incluyen la modificación de reticulación de un resto azúcar como se describe en los documentos US7217805, WO2003/068795, WO2005/021570, US7569686, WO2009/100320, WO2007/146511, WO2007/142315, WO2007/134181 y WO2007/090071.

Un polinucleótido que tiene la modificación química mencionada antes del resto azúcar se puede producir, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en las patentes de EE.UU. n° 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; 5.700.920 y similares, o un método análogo al mismo.

Los ejemplos de la modificación (c) mencionada antes del resto nucleobase incluyen 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de alquilo (p. ej., derivados de 6-metilo) de adenina y guanina, derivados de alquilo (p. ej., derivados de 2-propilo) de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halogenouracilo y citosina, 5-propinil-uracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, adeninas y guaninas sustituidas en 8 (p. ej., 8-halogeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo), uracilos y citosinas sustituidos en 5 (p. ej., 5-halogeno, 5-bromo, 5-trifluorometilo), 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina, nucleobases descritas en la patente de EE.UU. n° 3.687.808, nucleobases descritas en *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, páginas 858-859, Kroschwitz, J. L., ed. John Wiley & Sons, 1990, nucleobases descrito por Englisch et al., *Angewandte Chemie*, International Edition, 1991, 30, 613, y nucleobases descritas por Sanghvi, Y S., Capítulo 15, *Antisense Research and Applications*, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993.

Algunos de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión del nucleótido de la invención o sal del mismo y un ARNm diana.

El polinucleótido (c) mencionado antes que tiene modificación del resto nucleobase, se puede producir, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en las patentes de EE.UU. n° 3.687.808, 4.845.205; 5.130.30; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121, 5.596.091; 5.614.617; 5.750.692 y similares, o un método análogo al mismo.

Los ejemplos de los fragmentos directores usados para la modificación (d) anterior por conjugación con fragmentos directores incluyen restos de lípidos tales como un resto de colesterol (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 199, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manobaram et al., *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1994 4 1053-1060), un tioéter, p. ej., beril-S-tritilol (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, p. ej., restos dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J*, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, p. ej., di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14, 969-973), o ácido adamantano-acético

(Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654), un resto palmitilo (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229-237), o un resto octadecilamina o hexilaminocarboniloxicoesterol (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277, 923-937).

5 Por aplicación de la modificación (d) mencionada antes por conjugación con fragmentos directores del polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, se puede promocionar la actividad del polinucleótido, y la distribución intracelular o incorporación intracelular.

10 El polinucleótido que tiene la modificación (d) mencionada antes por conjugación con fragmentos directores se puede producir, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en las patentes de EE.UU. nº 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928; 5.688.941 y similares, o un método análogo al mismo.

15 Cuando el polinucleótido de la presente invención o una sal del mismo se modifica químicamente, no es necesario que todos los nucleósidos que constituyen el nucleótido de la presente invención o una de sus sales, estén uniformemente modificados, y de hecho las modificaciones mencionadas antes se pueden incorporar en uno o más nucleótidos o nucleósidos dentro del nucleótido de la invención o nucleósidos que constituyen dicho nucleótido

20 El polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, se puede someter simultáneamente a 2 o más clases de modificaciones químicas.

25 Por ejemplo, el polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, puede contener, como los compuestos PNA (Nielsen et al., *Science*, 1991, 254, 1497-1500), modificación química tanto en el resto azúcar como internucleósida en la cadena principal, y el polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, que tiene dicha modificación muestra propiedad superior de unión al ARNm diana. Un polinucleótido que contiene la modificación química tanto en el resto azúcar como internucleósida en la cadena principal, se puede producir, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en las patentes de EE.UU. nº 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262, o un método análogo al mismo.

El polinucleótido de la presente invención preferiblemente es un ARN monocatenario o bicatenario (ARN modificado o no modificado).

30 El polinucleótido de la presente invención puede formar una sal con una base inorgánica, una base orgánica, un ácido inorgánico, un ácido orgánico, y similares. Los ejemplos de las sales mencionadas antes con base inorgánica incluyen metales alcalinos tales como sal de sodio, sal de potasio; sales de metales alcalinotérreos tales como sal de calcio, sal de magnesio y similares; sal de aluminio, sal de amonio y similares. Los ejemplos de sales mencionadas antes con base orgánica incluyen sales con trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, dicitohexilamina, N,N'-dibenciletilendiamina. Los ejemplos de las sales mencionadas antes con ácido inorgánico incluyen sales de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico. Los ejemplos de las sales mencionadas antes con ácido orgánico incluyen sales con ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido benzenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico. De estas sales, se prefiere una sal farmacológicamente aceptable.

35 Preferiblemente, cuando el polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, se introduce en células de mamífero, produce directamente, o después de ser escindido por RNasa específica de ARNbc tal como Drosha, Dicer y similar, contenida en las células, un ARN monocatenario activo que consiste en la secuencia de bases mencionadas antes en (A) o (B). La producción de dichos ARN monocatenarios se puede confirmar, por ejemplo, preparando ADNc a partir de células usando el kit TaqMan MicroRNA Cells-to-Ct™ (Ambion) y similares, y sometiendo el ADNc a un método de RT-PCR cuantitativo usando ensayos de miARN de TaqMan (ABI) y similares.

50 El ARN monocatenario activo mencionado antes se puede obtener a partir de un precursor de miARN por una ruta de procesamiento natural (p. ej., usando lisado celular), o por una ruta de procesamiento de síntesis (p. ej., usando enzima de procesamiento aislada tal como Dicer, Argonaut, ribonucleasa III aisladas, y similares). Además, el ARN monocatenario activo mencionado antes también se puede producir de forma biológica o química.

El polinucleótido de la presente invención es más preferiblemente un ARN monocatenario que contiene la secuencia de bases mencionada antes en (A) o (B), o un ARN bicatenario que contiene el ARN monocatenario como una cadena.

Realizaciones específicas del polinucleótido de la presente invención son como siguen:

55 (1) un ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mencionada antes en el apartado (A) o (B), o un ARN bicatenario que contiene el ARN monocatenario como una cadena;

(2) un ARN bicatenario que contiene

un ARN monocatenario que contiene una primera secuencia de bases (una de las secuencias de bases mostradas por las SEQ ID NO: 1, 3 y 4, o una secuencia de bases que tiene una homología no menor de 90% con la secuencia de bases), y

5 un ARN monocatenario que contiene una segunda secuencia de bases (una de las secuencias de bases mostradas por las SEQ ID NO: 2 y una secuencia de bases que tiene una homología no menor de 90% con la secuencia de bases), en donde dichos dos ARN monocatenarios son hibridados;

10 (3) un ARN monocatenario que contiene la primera secuencia de bases mencionada antes y la segunda secuencia de bases mencionada antes, en donde la primera secuencia de bases y la segunda secuencia de bases están unidas por una región de bucle en horquilla, y en la estructura de bucle en horquilla, la primera secuencia de bases forma de manera intramolecular una estructura de doble cadena con la segunda secuencia de bases.

15 Los ejemplos del ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases (A) o (B) en el apartado (1) mencionado antes, incluyen miR-199b maduro monocatenario y miR-199a maduro monocatenario de mamíferos. Los ejemplos preferibles del ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases (A) o (B) en el apartado (1) mencionado antes, incluyen

el ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 1 (mmu-miR-199b* (también denominada mmu-miR-199b-5p)), ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 2 (mmu-miR-199b (también denominada mmu-miR-199b-3p, hsa-miR-199b-3p, mmu-miR-199a-3p, hsa-miR-199a-3p o rno-miR-199a-3p)),

20 el ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 3 (mmu-miR-199a-5p (también denominada hsa-miR-199a-5p o rno-miR-199a-5p)), y

el ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 4 (hsa-miR-199b-5p).

25 El ARN bicatenario del apartado (2) mencionado antes contiene un ARN monocatenario que tiene una homología no menor de 90%, preferiblemente no menor de 95%, con la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 3 o 4. El ARN bicatenario del apartado (2) mencionado antes contiene un ARN monocatenario que tiene una homología no menor de 90%, preferiblemente no menor de 95%, con la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 2.

30 El ARN del apartado (2) mencionado antes es ARN que contiene de forma representativa miR-199b o miR-199a de un mamífero. Específicamente, se pueden mencionar el ARN que contiene un ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 1 (mmu-miR-199b*) y un ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 2 (mmu-miR-199b),

el ARN que contiene un ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 4 (hsa-miR-199b-5p) y un ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 2 (mmu-miR-199b),

35 el ARN que contiene un ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 3 (mmu-miR-199a-5p) y un ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 2 (mmu-miR-199b), y similares.

40 En el apartado (3) mencionado antes, la longitud de la región de bucle en horquilla no está particularmente limitada, siempre que el ARN tenga una actividad para acelerar la proliferación de células β pancreáticas. En general tiene aproximadamente 5 - 25 bases. La secuencia de bases de la región de bucle en horquilla no está particularmente limitada, siempre que pueda formar un bucle y el ARN tenga una actividad para acelerar la proliferación de células β pancreáticas.

45 Como ARN del apartado (3) mencionado antes, se pueden mencionar de forma representativa el precursor del miARN y el transcrito primario de mamífero miR-199b o miR-199a, un ARN monocatenario que contiene una secuencia de bases de estos ARN y similares. Específicamente, se pueden mencionar el ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 5 (precursor mmu-miR-199b),

el ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 6 (precursor hsa-miR-199b),

el ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 (precursor mmu-miR-199a),

50 el ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 (precursor hsa-miR-199a),

el ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 11 (transcrito primario de mmu-miR-199b),

el ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 12 (transcrito primario de hsa-miR-199b),

5 el ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14 (transcrito primario de mmu-miR-199a),

el ARN monocatenario que consiste en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16 (transcrito primario de hsa-miR-199a),

el ARN monocatenario que contiene cualquiera de las secuencias de bases mostradas por las SEQ ID NO: 5 - 16

10 y similares.

Los números de acceso en NCBI de los miARN mostrados por las SEQ ID NO: 1 a 10 son como se describen a continuación.

mmu-miR-199b*: SEQ ID NO: 1 (MIMAT0000672)

mmu-miR-199b: SEQ ID NO: 2 (MIMAT0004667)

15 mmu-miR-199a-5p: SEQ ID NO: 3 (MIMAT0000229)

hsa-miR-199b-5p: SEQ ID NO: 4 (MIMAT0000263)

precursor de mmu-miR-199b: SEQ ID NO: 5 (MI0000714)

precursor de hsa-miR-199b: SEQ ID NO: 6 (MI0000282)

precursor de mmu-miR-199a: SEQ ID NO: 7 (MI0000241)

20 precursor de mmu-miR-199a: SEQ ID NO: 8 (MI0000713)

precursor de hsa-miR-199a: SEQ ID NO: 9 (MI0000242)

precursor hsa-miR-199a: SEQ ID NO: 10 (MI0000281)

25 La secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 2 mencionada antes, también se denomina mmu-miR-199b-3p y es la misma que mmu-miR-199a-3p (nº de acceso en NCBI MIMAT0000230), hsa-miR-199a-3p (nº de acceso en NCBI MIMAT0000232) y hsa-miR-199b-3p (nº de acceso en NCBI MIMAT0004563).

La secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 3 mencionada antes es la misma que hsa-miR-199a-5p (nº de acceso en NCBI MIMAT0000231) y rno-miR-199a-5p.

30 El polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, se puede sintetizar basándose en la información de secuencia descrita en la presente memoria descriptiva o base de datos conocida, y usando un sintetizador de ADN/ARN automático disponible en el comercio (Applied Biosystems, Beckman, y similares). Además, los polinucleótidos bicatenarios se pueden preparar sintetizando por separado ambas cadenas usando un sintetizador de ADN/ARN automático, y desnaturalizando las cadenas en una solución de tampón de reasociación adecuado, de aproximadamente 90°C a aproximadamente 95°C, y después reasociando de aproximadamente 30°C a aproximadamente 70°C, durante aproximadamente 1 a aproximadamente 8 horas. También se puede preparar un polinucleótido bicatenario más largo sintetizando las cadenas de oligonucleótido complementarias de forma que se solapen entre sí, reasociando estas cadenas, y después llevando a cabo el ligado con una ligasa.

35 Además, un vector de expresión para expresar el polinucleótido mencionado antes de la presente invención (en lo sucesivo, a veces denominado "el vector de expresión de la presente invención") también es una realización preferida del polinucleótido de la presente invención. El vector de expresión de la presente invención está constituido de modo que el polinucleótido de la presente invención mencionado antes puede ser expresado en células de mamífero. El vector de expresión de la presente invención se puede producir por ligamiento del polinucleótido de la presente invención mencionado antes, o un ADN que codifica el mismo, en la dirección 3' del promotor en un vector de expresión adecuado.

45 Los ejemplos de vectores de expresión incluyen, pero no se limitan a plásmido derivado de *Escherichia coli* (p. ej., pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), plásmido derivado de *Bacillus subtilis* (p. ej., pUB110, pTP5, pC194), plásmido derivado de levadura (p. ej., pSH19, pSH15), bacteriófago tal como fago λ y similares, virus animales tales como retrovirus, virus vaccinia, baculovirus etc., y similares, así como pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV y pcDNA1/Neo.

El promotor puede ser cualquiera siempre que pueda funcionar en células de mamífero. Los ejemplos de los promotores incluyen promotores pol II y promotores pol III. Los ejemplos de los promotores Pol III incluyen el promotor de U6, promotor de H1, promotor de rARN 5S, promotor de tARN, promotor de 7SL, promotor de 7SK, promotor de retrovirus LTR y promotor de adenovirus Val. De estos, se prefiere el promotor de U6, promotor de H1 o promotor de tARN. Los ejemplos de los promotores pol II incluyen promotor de insulina, promotor de citomegalovirus, promotor de T7, promotor de T3, promotor de SP6, promotor de RSV, promotor de EF-1 α , promotor de β -actina, promotor de γ -globulina, y promotor de SR α . De estos se prefiere el promotor de insulina.

Como vectores de expresión, además de los anteriores, también están los que albergan opcionalmente un potenciador, una señal de empalme, una señal de adición de poliA, un marcador de selección un origen de replicación de SV40 (en lo sucesivo abreviado también como SV40ori) y similares. Como ejemplos de los marcadores de selección, se pueden usar el gen de la dihidrofolato reductasa (en lo sucesivo abreviado también como dhfr) [resistencia a metotrexato (MTX)], el gen de resistencia a la ampicilina (en lo sucesivo abreviado también como Amp^r), el gen de resistencia a la neomicina (en lo sucesivo abreviado también como Neo^r, resistencia a G418) y similares.

El polinucleótido mencionado antes de la presente invención, o una de sus sales tiene, por ejemplo, los siguientes usos.

<1> uso como un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes,

<2> uso como un agente para la proliferación de células β pancreáticas,

<3> uso para el cribado de un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes, y similares,

<4> uso para determinar la susceptibilidad a un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes y similar.

<1> Uso como un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes

Como se muestra en los ejemplos mencionados más adelante, el polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, tiene una actividad para acelerar la proliferación de células β pancreáticas. Dicho hecho, muestra que la administración del polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, a pacientes con diabetes y similares, puede acelerar la proliferación de células β pancreáticas en dichos pacientes, y puede prevenir o tratar enfermedades tales como la diabetes y similares, y el polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, es útil como un medicamento.

Por lo tanto, el polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, se puede usar como un medicamento, tal como un agente para la profilaxis o tratamiento de la diabetes (p. ej., diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, diabetes gestacional, diabetes por obesidad); un agente para la profilaxis o tratamiento de la tolerancia alterada a la glucosa (TAG); un agente para prevenir el avance de la tolerancia alterada a la glucosa a la diabetes, y similares.

El polinucleótido de la presente invención o una de sus sales, se dirige a genes tales como MLK3, FGF7, Ptp^r, RB1 y Serpine2 (en particular, MLK3 y FGF7), y se considera que posiblemente acelera la proliferación de células β pancreáticas suprimiendo la expresión de estos genes, y previene o trata enfermedades tales como la diabetes y similares. Por lo tanto, un inhibidor de MLK3, FGF7, Ptp^r, RB1 y Serpine2 (en particular, MLK3 y FGF7) (p. ej., compuesto de bajo peso molecular, anticuerpo neutralizante, ARNip, ácido nucleico de sentido contrario) también se puede usar como un medicamento tal como un agente para la profilaxis o tratamiento de la diabetes (p. ej., diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, diabetes gestacional, diabetes por obesidad); un agente para la profilaxis o tratamiento de la tolerancia alterada a la glucosa (TAG); un agente para suprimir el avance de la tolerancia alterada a la glucosa a la diabetes, y similares.

Como criterios de diagnóstico de la diabetes, de acuerdo con una publicación de la Sociedad Japonesa de Diabetes, la diabetes mellitus es una afección en donde el nivel de glucosa en la sangre en ayunas (concentración de glucosa en plasma venoso) no es menor que 126 mg/dl, el valor a las 2 horas (concentración de glucosa en plasma venoso) de la prueba de tolerancia a la glucosa oral de 75 g (PTGO 75 g) no es menor que 200 mg/dl o el nivel de glucosa en la sangre ocasional (concentración de glucosa en plasma venoso) no es menor que 200 mg/dl. Además, una afección que no está dentro del alcance de la definición anterior de diabetes mellitus, y que no es una "afección en donde el nivel de glucosa en la sangre en ayunas (concentración de glucosa en plasma venoso) es menor que 110 mg/dl o el valor a las 2 horas (concentración de glucosa en plasma venoso) de la prueba de tolerancia a la glucosa oral de 75 g (PTGO 75 g) es menor que 140 mg/dl" (tipo normal), se llama "tipo límite".

De acuerdo con publicaciones de ADA y la OMS, la diabetes mellitus es una afección donde el nivel de glucosa en la sangre en ayunas (concentración de glucosa en plasma venoso) no es menor que 126 mg/dl, y el valor a las 2 horas (concentración de glucosa en plasma venoso) de la prueba de tolerancia a la glucosa oral de 75 g no es menor que 200 mg/dl.

Además, de acuerdo con las publicaciones anteriores de ADA y la OMS, la tolerancia alterada a la glucosa es una afección donde el valor a las 2 horas (concentración de glucosa en plasma venoso) de la prueba de tolerancia a la

5 glucosa oral de 75 g no es menor que 140 mg/dl, y es menor que 200 mg/dl. Además, de acuerdo con la publicación de ADA, una afección donde el nivel de glucosa en la sangre en ayunas (concentración de glucosa en plasma venoso) no es menor que 100 mg/dl y es menor que 126 mg/dl, se llama GAA (Glucosa alterada en ayunas). Por otra parte, de acuerdo con la publicación de la OMS, una afección de GAA (glucosa alterada en ayunas) como tal, donde el nivel de glucosa en la sangre en ayunas (concentración de glucosa en plasma venoso) no es menor que 110 mg/dl y es menor que 126 mg/dl, se llama GAA (Glucemia alterada en ayunas).

10 El polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, también se usa como un agente para la profilaxis o tratamiento de la diabetes determinada por los criterios de diagnóstico mencionados antes, tipo límite, tolerancia alterada a la glucosa, GAA (glucosa alterada en ayunas) y GAA (glucemia alterada en ayunas). Además, el compuesto de la presente invención puede prevenir el avance del tipo límite, tolerancia alterada a la glucosa, GAA (glucosa alterada en ayunas) y GAA (glucemia alterada en ayunas).

15 El polinucleótido de la presente invención o una de sus sales, también se puede usar, por ejemplo, como un agente para la profilaxis o el tratamiento de complicaciones de la diabetes [p. ej., neuropatía, nefropatía, retinopatía, cataratas, macroangiopatía, osteopenia, coma diabético hiperosmolar, infecciones (p. ej., infección respiratoria, infección del tracto urinario, infección gastrointestinal, infecciones de tejidos dérmicos blandos, infecciones en miembro inferior), gangrena diabética, xerostomía, hipoacusia, trastornos cerebrovasculares, trastornos de la circulación periférica de la sangre], caquexia diabética, síndrome de resistencia a la insulina y similares.

20 El polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, se puede administrar como un medicamento (a veces abreviado como "el medicamento de la presente invención"), por vía oral o parenteral, como está o en una mezcla con un vehículo farmacológicamente aceptable.

En otra realización, además, el polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, se puede formular en una preparación biológica, una preparación de liposomas, una preparación de emulsión o microemulsión.

25 El medicamento de la presente invención se puede producir usando un método de producción conocido por sí mismo, que se usa en general en el campo técnico de preparaciones (p. ej., el método descrito en la Farmacopea Japonesa). En este caso, se pueden añadir adecuadamente aditivos tales como excipiente, aglutinante, disgregante, lubricante, agente edulcorante, tensioactivo, agente de suspensión, emulsionante, agente dispersante, espesante, diluyente, potenciador de la penetración, una composición para formar complejos del polinucleótido de la presente invención o una de sus sales, y similares; agente de suministro tópico y similares, que se usan en general en el campo técnico de las preparaciones, en cantidades adecuadas, cuando sea necesario.

30 Los ejemplos de las formas farmacéuticas del medicamento de la presente invención para la administración oral del polinucleótido de la presente invención o una de sus sales, incluyen preparaciones orales como comprimido (incluyendo comprimido recubierto de azúcar, comprimido recubierto de película, comprimido sublingual, comprimido bucal, comprimido de integración rápida en la cavidad bucal), píldora, gránulo, polvo, cápsula (incluyendo cápsula blanda, microcápsula), jarabe, emulsión, suspensión y películas (p. ej., película de adherencia a membrana mucosa de la cavidad bucal), polvo, microgránulo, nanogránulo, cápsula de gel, pulverizador y similares.

35 En una realización, el medicamento de la presente invención es una preparación oral que se administra en combinación con uno o más potenciadores de la penetración.

Los ejemplos preferidos de potenciadores de la penetración incluyen ácido graso o un éster o una de sus sales; y ácidos biliares o una de sus sales.

40 Los ácidos biliares preferidos o una de sus sales incluyen ácido quenodesoxicólico (CDCA), ácido ursodesoxiquenodesoxicólico (UDCA), ácido cólico, ácido deshídrocólico, ácido desoxicólico, ácido glucólico, ácido glicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico, tauro-24,25-dihidro-fusidato sódico, ácido glicodihidrofusídico o una de sus sales farmacéuticamente aceptable (p. ej., sal de sodio). Los ácidos grasos preferidos o uno de sus ésteres o sus sales, incluyen ácido araquidónico, ácido undecanoico, ácido oleico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleina, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarinitina, una acilcolina, un monoglicérido, un diglicérido, éter laurílico polioxietilenado 9, éter cetílico polioxietilenado 20 o una de sus sales farmacéuticamente aceptable (p. ej., sal de sodio).

50 En algunas realizaciones, se pueden usar combinaciones de potenciadores de la penetración (p. ej., un ácido graso o una de sus sales en combinación con un ácido biliar o una de sus sales). Una combinación preferida son las sales de sodio del ácido láurico, ácido cáprico y UDCA.

55 Cuando el polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, se prepara en un comprimido, por ejemplo, se puede preparar usando un excipiente, un aglutinante, un disgregante, un lubricante y similares, y cuando se va a preparar una píldora o un gránulo, se puede preparar usando un excipiente, un aglutinante o un disgregante. Cuando se va a preparar un polvo o una cápsula, se puede preparar usando un excipiente y similares, cuando se va a preparar un jarabe, se puede preparar usando un edulcorante y similares, y cuando se va a preparar una emulsión

o una suspensión, se puede preparar usando un agente de suspensión, un tensioactivo, un emulsionante y similares.

Los ejemplos de excipientes incluyen lactosa, sacarosa, glucosa, almidón, sacarosa, celulosa microcristalina, gliciriza en polvo, manitol, hidrogenocarbonato sódico, fosfato cálcico y sulfato cálcico.

- 5 Los ejemplos de los aglutinantes incluyen pasta líquida de almidón al 5-10% en peso, solución de goma arábica o solución de gelatina al 10-20% en peso, solución de tragacanto al 1-5% en peso, solución de carboximetilcelulosa, solución de alginato sódico y glicerina.

Los ejemplos de los disgregantes incluyen almidón y carbonato de calcio.

Los ejemplos de los lubricantes incluyen estearato magnésico, ácido esteárico, estearato de calcio y talco purificado.

- 10 Los ejemplos de edulcorantes incluyen glucosa, fructosa, azúcar invertido, sorbitol, xilitol, glicerina y jarabe simple.

Los ejemplos de los tensioactivos incluyen lauril-sulfato sódico, polisorbato 80, monoéster de ácido graso de sorbitán y estearato de polioxilo 40.

Los ejemplos de agentes de suspensión incluyen goma arábica, alginato sódico, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa y bentonita.

- 15 Los ejemplos de los emulsionantes incluyen goma arábica, tragacanto, gelatina, polisorbato 80 y similares.

Cuando el polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, se produce en forma de gránulos o pulverizador, se puede usar una composición para la formación de complejo del polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, y similares. Los ejemplos de las composiciones incluyen poliaminoácidos; poliiminas; poliacrilatos; polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albúminas, almidones, acrilatos, polietilenglicoles (PEG) y almidones; polialquilcianoacrilatos; poliiminas derivatizadas con DEAE, pululanos, celulosas y almidones. Los ejemplos preferidos de las composiciones incluyen quitosán, N-trimetilchitosán, poli-L-lisina, polihistidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpiridina, politiodietilaminometileno P (TDAE), poliamino(p. ej., p-amino)-estireno, poli(cianoacrilato de metilo), poli(cianoacrilato de etilo), poli(cianoacrilato de butilo), poli(cianoacrilato de isobutilo), poli(cianoacrilato de isohexilo), DEAE-metacrilato, DEAE-acrilato de hexilo, DEAE-acrilamida, DEAE-albúmina y DEAE-dextrano, poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de hexilo), poli(D,L-ácido láctico), poli(DL-ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), alginato, y polietilenglicol (PEG).

- 20
25
30 Una preparación oral que contiene el polinucleótido de la presente invención se puede producir de acuerdo con los métodos descritos en la patente de EE.UU. n° 6.887.906, US-A-2003/0027780, patente de EE.UU. n° 6.747.014 y similares, o un método análogo a los mismos.

Los ejemplos de las formas farmacéuticas para administración parenteral del polinucleótido de la presente invención o una de sus sales, incluyen inyección, instilación, supositorio, parche transdérmico, pomada, loción, crema, gotas, pulverizador y polvo. Además, se puede hacer una preparación de liberación sostenida combinando el polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, con una base adecuada (p. ej., polímero de ácido butírico, polímero de ácido glicólico, copolímero de ácido butírico-ácido glicólico, una mezcla de un polímero de ácido butírico y un polímero de ácido glicólico, éster de ácido graso y poliglicerol).

- 35 Los ejemplos de los métodos de inyección incluyen inyección intravenosa así como inyección subcutánea, inyección intracutánea, inyección intramuscular, instilación y similares. Los ejemplos de las preparaciones de liberación sostenida incluyen un agente transdérmico de iontoforesis y similares.

- 40 Dichas inyecciones se preparan por métodos conocidos por sí mismo, o por disolución, suspensión o emulsión del nucleótido de la presente invención, o una de sus sales, en un líquido acuoso o aceitoso esterilizado. Los ejemplos de líquidos acuosos para inyección incluyen solución salina fisiológica, soluciones isotónicas que contienen glucosa u otros fármacos auxiliares (p. ej., D-sorbitol, D-manitol, cloruro sódico y similares), y similares, y se pueden usar en combinación con agentes solubilizantes adecuados tales como alcoholes (p. ej., etanol), polialcoholes (p. ej., propilenglicol, polietilenglicol) y tensioactivos no iónicos (p. ej., polisorbato 80, HCO-50). Los ejemplos de los líquidos aceitosos incluyen aceite de sésamo, aceite de soja y similares, y se pueden usar en combinación con agentes solubilizantes tales como benzoato de bencilo y alcohol bencilico. Además, se pueden mezclar tampones (p. ej., tampón de fosfato, tampón de acetato sódico), agentes calmantes (p. ej., cloruro de benzalconio, hidrocioruro de procaína), estabilizantes (p. ej., albúmina de suero humana, polietilenglicol), conservantes (p. ej., alcohol bencilico, fenol) y similares. Una inyección preparada en general se introduce en una ampolla.

En una realización, el medicamento de la presente invención se puede formular como una inyección.

La inyección puede contener una solución acuosa esterilizada o una solución acuosa que contiene un agente de tamponamiento, diluyente y otros aditivos adecuados (p. ej., potenciador de la penetración, compuesto vehículo y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, etc.) en solución acuosa esterilizada.

La inyección también se puede usar para administración tópica (administración intrapáncreas).

Cuando el medicamento de la presente invención se formula en una forma farmacéutica para administración tópica (supositorio, parche transdérmico, pomada, loción, crema, gotas, pulverizador, polvo, etc.), se puede usar un agente de suministro tópico.

5 Los ejemplos de agentes de suministro tópico incluyen liposomas constituidos por lípidos (p. ej., dioleoilfosfatidiletanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diestearoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG, dioleoiltetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoilfosfatidiletanolamina DOTMA, fosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilglicerol o dioleoilfosfatidiletanolamina), ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos (p. ej., ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linoléico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un éster de alquilo C₁₋₁₀ (p. ej., miristato de isopropilo IPM), monoglicérido, diglicérido o sus sales farmacéuticamente aceptables) y similares, liposomas disponibles en el comercio (Lipofectin™ (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, Calif.) y Effectene™ (Qiagen, Valencia, Calif.)), liposomas descritos en *Nature Biotechnology*, 15: 647-652 (1997), liposomas descritos en *J. Am Soc. Nephrol.* 7: 1728 (1996), liposomas descritos en la patente de EE.UU. n° 6.271.359, liposomas descritos en la publicación PCT WO 96/40964 y liposomas descritos en *Nat Biotechnol.* 23:1002-1007 (2005). El término "liposoma" usado en la presente invención significa una vesícula compuesta de lípidos anfífilos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas, e incluye monocapas, micelas, bicapas y vesículas.

20 El polinucleótido de la presente invención o su sal, se puede encapsular dentro de liposomas o puede formar complejos con los mismos, en particular liposomas catiónicos. Alternativamente, el polinucleótido de la presente invención o su sal, puede formar complejos con lípidos, en particular con lípidos catiónicos.

Una preparación para la administración tópica se puede producir de acuerdo, por ejemplo, con el método descrito en la patente de EE.UU. n° 6.747.014 y similares, o un método análogo al mismo.

25 Los ejemplos de los liposomas para usar para la formulación del medicamento de la presente invención como una preparación liposomal incluyen (aa) liposomas catiónicos, (bb) liposomas aniónicos, (cc) liposomas no iónicos, (dd) liposomas "estéricamente estabilizados", (ee) liposomas que comprenden glicolípidos, (ff) liposomas que comprenden lípidos derivatizados con polímeros hidrófilos, (gg) transfersomas, y (hh) SNALP.

30 Los ejemplos de los liposomas catiónicos (aa) mencionados antes incluyen liposomas usados en *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985.

Los ejemplos de los liposomas no iónicos (cc) mencionados antes incluyen Novasome™ I (dilaurato de glicerilo/colesterol/éter de estearilo polioxietileno-10) y Novasome™ II (distearato de glicerilo/colesterol/éter de estearilo polioxietileno-10) (Hu et al. *S.T.P. Pharma. Sci.*, 1994, 4, 6, 466).

35 Los ejemplos de los liposomas "estéricamente estabilizados" (dd) mencionados antes, son aquellos en los que parte de la porción de lípido que forma vesícula del liposoma (dd-1) comprende uno o más glucolípidos, tales como monosialogangliósido G_{M1}, o (dd-2) se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto polietilenglicol (PEG).

El liposoma es ventajoso en cuanto que extiende el periodo en que el medicamento de la presente invención está presente en la sangre que circula.

40 Los ejemplos de los liposomas que comprenden glucolípidos (ee) mencionados antes, incluyen liposomas (ee-1) que comprenden monosialogangliósido G_{M1}, sulfato galactocerebrósido y fosfatidilinositol, y (ee-2) liposomas que comprenden esfingomielina, gangliósido G_{M1} o un éster de sulfato galactocerebrósido (patente de EE.UU. n° 4.837.028 y WO 88/04924).

45 Con el uso de estos liposomas, las semividas de los liposomas en la sangre se puede prolongar (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1987, 507, 64; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85, 6949).

50 Los ejemplos de los liposomas que comprenden lípidos derivatizados con polímeros hidrófilos (ff) mencionados antes incluyen liposomas (ff-1) que comprenden un detergente no iónico que contiene un resto PEG (*Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1980, 53, 2778), (ff-2) liposomas derivatizados con glicoles de partículas de poliestireno polimérico hidrófilos (*FEBS Lett.*, 1984, 167, 79), (ff-3) liposomas que comprenden fosfolípidos sintéticos modificados por la unión de grupos carboxílicos de polialquilenglicoles (p. ej., PEG) (patente de EE.UU. n° 4.426.330 y 4.534.899), (ff-4) liposomas que comprenden fosfatidiletanolamina (PE) derivatizada con PEG o estearato de PEG (*FEBS Lett.*, 1990, 268, 235), (ff-5) liposomas que comprenden otros fosfolípidos derivatizados con PEG formados a partir de la combinación de diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y PEG (*Biochimica et Biophysica Acta*, 1990, 1029, 91), (ff-6) liposomas que tienen restos PEG covalentemente unidos en su superficie externa (patente europea n° EP 0445131 B1 y WO 90/04384), (ff-7) liposomas que contienen 1-20 por ciento en moles de PE derivatizado con PEG (patentes de EE.UU. n° 5.013.556 y 5.356.633, patente de EE.UU. n° 5.213.804 y patente europea n° EP 0496813 B1, (ff-8)

liposomas que comprenden una serie de otros conjugados de lípido-polímero (WO 91/05545, patente de EE.UU. nº 5.225.212 y WO 94/20073), (ff-9) liposomas que comprenden lípidos de ceramida modificados con PEG (WO 96/10391), y (ff-10) liposomas que contienen PEG que se pueden derivatizar además con restos funcionales en sus superficies (patente de EE.UU. nº 5.540.935 y patente de EE.UU. nº 5.555.948).

5 Los liposomas que comprenden PEG se pueden preparar de acuerdo con métodos descritos en las patentes de EE.UU. nº 6.049.094; 6.224.903; 6.270.806; 6.471.326; 6.958.241 y similares, o un método análogo a los mismos.

Los ejemplos de las SNALP (hh) mencionadas antes incluyen SPLP (incluyendo pSPLP (documento WO 00/03683) y SNALP). Las SNALP y SPLP pueden contener además un lípido catiónico, un lípido no catiónico, y opcionalmente, un lípido que previene la agregación de partículas (p. ej., conjugado de PEG-lípido).

10 El medicamento de la presente invención formulado en una preparación que contiene SNALP es útil para la administración sistémica, puesto que extiende de forma ventajosa el tiempo de vida en la circulación después de inyección intravenosa (i.v.) y se acumula en un sitio distal (p. ej., sitio físicamente lejos del sitio de administración).

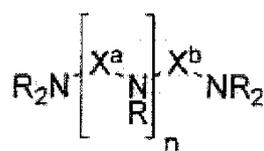
15 Las preparaciones que contienen SNALP se pueden producir de acuerdo con los métodos descritos, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.976.567; 5.981.501; 6.534.484; 6.586.410; 6.815.432; y WO96/40964 y similares, o un método análogo a los mismos.

Las preparaciones de liposomas mencionadas antes incluyen monocapas, micelas, bicapas y vesículas. El "liposoma" usado en la presente invención está compuesto de lípidos anfifílicos dispuestos en bicapa o bicapas esféricas.

20 Los ejemplos de los lípidos anfifílicos mencionados antes incluyen lípidos catiónicos que tienen un pKa de 4 a 15, que comprenden al menos un grupo protonable (p. ej., cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), N,N-dimetil-2,3-dioleiloxi)propilamina (DODMA), 1,2-dilinoileloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-dilinoileloxi-3-

25 (dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-dilinoileloxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1,2-dilinoileoil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-dilinoileiltio-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-linoileoil-2-linoileiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMAP), sal de cloruro de 1,2-dilinoileiloxi-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA-Cl), sal de cloruro de 1,2-dilinoileoil-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1,2-dilinoileiloxi-3-(N-metilpiperazino)propano (DLin-MPZ), o 3-(N,N-dilinoileilamino)-1,2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-dioleilamino)-1,2-propanodiol (DOAP), 1,2-dilinoileiloxi-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-DMA), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano, o análogos de los mismos o una mezcla de los mismos), un lípido representado por la fórmula:

30

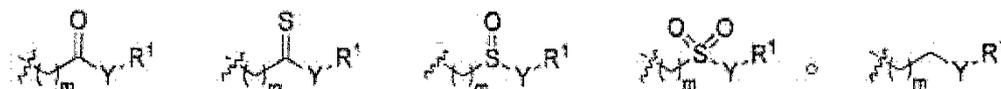


en donde

35 X^a e X^b son cada uno independientemente alquileo C_{1-6} ;

n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

cada R es independientemente H,



m es 0, 1, 2, 3 o 4;

40 Y está ausente, O, NR^2 , o S;

R^1 es alquilo, alquenoilo o alquinoilo; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes; y

R^2 es H, alquilo, alquenoilo o alquinoilo; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes.

- Otros ejemplos de lípidos anfífilicos incluyen lípidos no catiónicos (lípidos aniónicos o lípidos neutros) (p. ej., diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoileoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoileoil-fosfatidiletanolamina (POPE), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidil-etanolamina (DSPE), 16-O-monometil-PE, 16-O-dimetil-PE, 18-1-trans-PE, 1-estearoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), 1-2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, colesterol, o una mezcla de los mismos).
- Ejemplos adicionales de lípidos anfífilicos incluyen un polietilenglicol (PEG)-lípidos que incluye un PEG-diacilglicerol (DAG), un PEG-dialquilohipropilo (DAA) (p. ej., un PEG-dilaurilohipropilo (C12), un PEG-dimiristilohipropilo (C14), un PEG-dipalmitilohipropilo (C16), un PEG-distearilohipropilo (C18)), un PEG-fosfolípido, un PEG-ceramida (Cer), y una mezcla de los mismos.
- Las preparaciones de liposomas pueden contener un lípido que previene la agregación de partículas (p. ej., esteroide tal como colesterol).
- Las ventajas de formar el medicamento de la presente invención como una preparación de liposomas son como sigue: los liposomas obtenidos de fosfolípidos naturales son biocompatibles y biodegradables; los liposomas pueden incorporar una amplia variedad de fármacos solubles en agua y lípidos; los liposomas pueden proteger fármacos encapsulados en sus compartimentos internos del metabolismo y la degradación (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, pág. 245); mayor acumulación del polinucleótido de la presente invención o una de sus sales en el sitio diana; la capacidad de administrar una amplia variedad de fármacos, tanto hidrófilos como hidrófobos, en la piel.
- El medicamento de la presente invención se puede formular como una emulsión.
- Los emulsionantes mencionados antes pueden contener tensioactivos, emulsionantes naturales, bases de absorción, sólidos finamente dispersos, conservantes, antioxidantes y similares (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, pág. 199).
- Como los tensioactivos mencionados antes, se pueden usar tensioactivos públicamente conocidos (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Ringer and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, pág. 285; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volumen 1, pág. 199).
- Los ejemplos de los emulsionantes naturales mencionados antes incluyen lanolina, cera de abeja, fosfátidos, lecitina y goma arábiga.
- Los ejemplos de los conservantes mencionados antes incluyen metilparabeno, propilparabeno, sales de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico y ácido bórico.
- Los ejemplos de los antioxidantes mencionados antes incluyen depuradores de radicales tales como tocoferoles, galatos de alquilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado; agentes de reducción tales como ácido ascórbico y metabisulfito sódico; ácido cítrico, ácido tartárico; y lecitina.
- La aplicación de formulaciones en emulsión por vía dermatológica, oral y parenteral y los métodos para su fabricación se han descrito en la bibliografía (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, pág. 199).
- Las formulaciones en emulsión para el suministro oral se han usado muy ampliamente debido a su facilidad de formulación, así como a la eficacia desde un punto de vista de la absorción y biodisponibilidad (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, pág. 245; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, pág. 199).
- El medicamento de la presente invención se puede formular como microemulsiones.
- Las microemulsiones mencionadas antes pueden contener aceites, agua, tensioactivos, cotensioactivos y/o electrolitos.
- Los ejemplos de los tensioactivos mencionados antes incluyen, pero no se limitan a tensioactivos iónicos, tensioactivos no iónicos, Brij 96, éteres de oleilo polioxi-etileno, ésteres de ácido graso y poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (M0310), monooleato de hexaglicerol (P0310), pentaoleato de hexaglicerol (P0500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (M0750), sesquioleato de decaglicerol (S0750), decaoleato de decaglicerol (DA0750), solo o en combinación con cotensioactivos. Los ejemplos de los cotensioactivos mencionados antes incluyen un alcohol de cadena corta tal como etanol, 1-propanol y 1-butanol. Los cotensioactivos penetran en la película de tensioactivo y por consiguiente crean una película

- desordenada debido al espacio vacío entre las moléculas de tensioactivo. La película sirve para aumentar la fluidez interfacial. Sin embargo, las microemulsiones se pueden preparar sin usar cotensioactivos y sistemas de microemulsión autoemulsionantes exentos de alcohol conocidos en la técnica. La fase acuosa puede ser típicamente, pero no se limita a agua, una solución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceroles, propilenglicoles, y derivados de etilenglicol. Los aceites mencionados antes incluyen Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácido graso, mono, di y triglicéridos de cadena media (C₈-C₁₂), ésteres de ácido graso y glicerilo polioxietilado, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos poliglicolizados saturados C₈-C₁₀, aceites vegetales y aceite de silicona.
- Las microemulsiones se preparan dispersando primero un aceite en una solución acuosa de tensioactivo y después añadiendo un alcohol de longitud de cadena intermedia y similares, para formar un sistema transparente.
- Las microemulsiones son eficaces desde el punto de vista de la solubilización del polinucleótido de la presente invención o una de sus sales, y la absorción potenciada del polinucleótido de la presente invención o una de sus sales (Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). Además, las microemulsiones son eficaces desde el punto de vista de la administración oral más fácil que formas farmacéuticas sólidas, potencia clínica superior y menor toxicidad (Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143).
- En una realización del medicamento de la presente invención, la relación (relación en masa/masa) del lípido al polinucleótido está en el intervalo de aproximadamente 1:1 - aproximadamente 50:1, aproximadamente 1:1 - aproximadamente 25:1, aproximadamente 3:1 - aproximadamente 15:1, aproximadamente 4:1 - aproximadamente 10:1, aproximadamente 5:1 - aproximadamente 9:1, o aproximadamente 6:1 - aproximadamente 9:1.
- Aunque el contenido del polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, en el medicamento de la presente invención varía dependiendo de la forma de preparación, en general no es menor de aproximadamente 0,01% en peso y es menor de 100% en peso, preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 85% en peso, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 70% en peso, con respecto a la preparación entera.
- Aunque el contenido del aditivo en el medicamento de la presente invención varía dependiendo de la forma de preparación, en general es de aproximadamente 1 a aproximadamente 99,9% en peso, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 90% en peso, con respecto a la preparación entera.
- El polinucleótido de la presente invención también se puede suministrar a las células diana o tejidos diana por un método biológico.
- Aunque las células diana mencionadas antes no están particularmente limitadas siempre que sean células de mamífero (p. ej., ser humano, ratón, rata, conejo, oveja, cerdo, bovino, gato, perro, mono) que expresen de forma natural el polinucleótido de la presente invención, por ejemplo, se pueden usar células de ser humano. Los ejemplos de tejidos diana mencionados antes incluyen islotes pancreáticos que contienen células β pancreáticas, páncreas, pulmón, vejiga, placenta, glándula mamaria y colon.
- Aunque los métodos biológicos mencionados antes incluyen el uso de un vector vírico, se pueden usar diferentes métodos, que no están limitados por estos.
- El polinucleótido de la presente invención se suministra usando, por ejemplo, un vector vírico (p. ej., adenovirus y vector del virus del herpes) a células del hígado y células del páncreas.
- El vector vírico que expresa el polinucleótido de la presente invención se puede producir por una técnica de biología molecular convencional.
- El polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, es estable y de toxicidad baja, y se puede administrar de forma segura a mamíferos (p. ej., ser humano, ratón, rata, conejo, oveja, cerdo, bovino, gato, perro, mono). Aunque la dosis diaria varía dependiendo de la afección y el peso corporal de los pacientes, el tipo de polinucleótido, la vía de administración y similares, cuando se administra por vía oral a pacientes para el tratamiento de la diabetes, por ejemplo, la dosis para un ser humano adulto (peso corporal de aproximadamente 60 kg) por día es de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mg, preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 300 mg, más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 mg, como un principio activo (el polinucleótido de la presente invención), y la dosis se puede administrar en una vez, o en 2 o 3 porciones.
- Cuando el polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, se administra por vía parenteral, en general se administra en una forma líquida (p. ej., inyección). Aunque la dosis individual varía dependiendo del sujeto de administración, el órgano diana, síntomas, método de administración y similares, se administra de forma conveniente en forma, por ejemplo, de una inyección, en general de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg, por kg de peso corporal por inyección intravenosa.

El polinucleótido de la presente invención o una de sus sales, se puede usar en combinación con otros fármacos, específicamente otro agente para la profilaxis o tratamiento de la diabetes, o un fármaco para la proliferación de células β pancreáticas.

Los ejemplos de los agentes profilácticos o terapéuticos para la diabetes incluyen preparaciones de insulina (p. ej., preparaciones de insulina animal extraídas del páncreas bovino o de cerdo; preparaciones de insulina humana genéticamente sintetizadas usando *Escherichia coli* o levadura; insulina-zinc; insulina-zinc protamina; fragmento o derivado de insulina (p. ej., INS-1), preparación oral de insulina, sensibilizadores de insulina (p. ej., pioglitazona o una de sus sales (preferiblemente hidrocloreuro), rosiglitazona o una de sus sales (preferiblemente maleato), Metaglidase, AMG-131, Balaglitazone, MBX-2044, Rivoglitazona, Aleglitazar, Chiglitazar, Lobeglitazona, PLX-204, PN-2034, GFT-505, THR-0921, compuesto descrito en los documentos WO 2007/013694, WO 2007/018314, WO 2008/093639 o WO 2008/099794), inhibidores de α -glucosidasa (p. ej., voglibosa, acarbosa, miglitol, emiglitato), biguanidas (p. ej., metformina, buformina o una de sus sales (p. ej., hidrocloreuro, fumarato, succinato)), secretagogos de insulina (p. ej., sulfonilureas (p. ej., tolbutamida, glibenclamida, gliclazida, clorpropamida, tolazamida, acetohexamida, glicopiramida, glimepirida, glipizida, glibuzol), repaglinida, nateglinida, mitiglinida o uno de sus hidratos de sal de calcio), inhibidores de dipeptidil peptidasa IV (p. ej., Alogliptina o una de sus sales (preferiblemente benzoato), Vildagliptina, Sitagliptina, Saxagliptina, BI1356, GRC8200, MP-513, PF-00734200, PHX1149, SK-0403, ALS2-0426, TA-6666, TS-021, KRP-104, 2-1[6-[(3R)-3-amino-1-piperidinil]-3,4-dihidro-3-metil-2,4-dioxo-1(2H)-pirimidinil]metil]-4-fluorobenzonitrilo o una de sus sales), agonistas β_3 (p. ej., N-5984), agonistas GPR40 (p. ej., compuestos descritos en los documentos WO 2004/041266, WO 2004/106276, WO 2005/063729, WO 2005/063725, WO 2005/087710, WO 2005/095338, WO 2007/013689 o WO 2008/001931), agonistas del receptor de GLP-1 (p. ej., GLP-1, GLP-1MR, Liraglutida, Exenatida, AVE-0010, BIM-51077, Aib(8,35)hGLP-1(7,37)NH₂, CJC-1131, Albiglutida), agonistas de amilina (p. ej., pramlintida), inhibidores de fosfotirosina fosfatasa (p. ej., vanadato sódico), inhibidores de gluconeogénesis (p. ej., inhibidores de glucógeno fosforilasa, inhibidores de glucosa-6-fosfatasa, inhibidores de FBPa), inhibidores de SGLT2 (cotransportados de sodio-glucosa 2) (p. ej., Depagliflozina, AVE2268, TS-033, YM543, TA-7284, Remogliflozina, ASP1941), inhibidores de SGLT1, inhibidores de 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (p. ej., BVT-3498, INCB-13739), adiponectina o un agonista de la misma, inhibidores de IKK (p. ej., AS-2868), fármacos que mejoran la resistencia a la leptina, agonistas del receptor de somatostatina, activadores de glucoquinasa (p. ej., Piragliatina, AZD1656, AZD6370, TTP-355, compuestos descritos en los documentos WO 2006/112549, WO 2007/028135, WO 2008/047821, WO 2008/050821, WO 2008/136428 o WO 2008/156757), GIP (péptido insulínico dependiente de glucosa), agonista de GPR119 (p. ej., PSN821), FGF21, análogos de FGF y similares.

Los ejemplos de los fármacos para la proliferación de células β pancreáticas incluyen inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (p. ej., Alogliptina o una de sus sales (preferiblemente benzoato), Vildagliptina, Sitagliptina, Saxagliptina, BI1356, GRC8200, MP-513, PF-00734200, PHX1149, SK-0403, ALS2-0426, TA-6666, TS-021, KRP-104, 2-1[6-[(3R)-3-amino-1-piperidinil]-3,4-dihidro-3-metil-2,4-dioxo-1(2H)-pirimidinil]metil]-4-fluorobenzonitrilo o una de sus sales), agonistas del receptor de GLP-1 (p. ej., GLP-1, GLP-1MR, Liraglutida, Exenatida, AVE-0010, BIM-51077, Aib(8,35)hGLP-1(7,37)NH₂, CJC-1131, Albiglutida) hormonas del crecimiento y similares.

<2> Uso como un agente para la proliferación de células β pancreáticas,

El polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, tiene una actividad para acelerar la proliferación de células β pancreáticas. Los ejemplos de las células β pancreáticas mencionadas antes incluyen células β pancreáticas de mamíferos (p. ej., ratón, rata, hámster, conejo, gato, perro, bovino, oveja, mono, ser humano).

Por lo tanto, el polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, es útil como un agente para la proliferación de células β pancreáticas de mamífero; un agente para la proliferación de células β pancreáticas antes del trasplante de islotes; un agente para ayudar a la proliferación de células β pancreáticas después de trasplante de islote; y un agente terapéutico para la pancreatitis.

La actividad del polinucleótido para la proliferación de células β pancreáticas se puede medir por el método descrito en detalle antes y de acuerdo con el método descrito en los ejemplos descritos más adelante.

El agente para la proliferación de células β pancreáticas, que contiene el polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, se puede producir de la misma forma que el medicamento mencionado antes de la presente invención, y se puede administrar a mamíferos de forma segura.

<3> Uso para el cribado de un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes, y similares

Puesto que el polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, tiene una actividad de acelerar la proliferación de células β pancreáticas, una sustancia que acelera la expresión intracelular del polinucleótido de la presente invención también acelera la proliferación de células β pancreáticas, y es eficaz para la profilaxis o tratamiento de enfermedades tales como la diabetes y similares. Por lo tanto, los polinucleótidos de la presente invención se pueden usar en un método para el cribado de una sustancia que produce proliferación de células β pancreáticas, un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes (o un sustancia candidato del mismo), que

comprende comparar la expresión del polinucleótido de la presente invención en células que tienen la capacidad de expresar dicho polinucleótido en presencia o ausencia de una sustancia de ensayo.

5 El nivel de expresión del polinucleótido de la presente invención se puede medir detectando el polinucleótido de la presente invención usando una sonda de ácido nucleico o cebador de ácido nucleico que detecta específicamente el polinucleótido de la presente invención (p. ej., polinucleótido capaz de hibridar con el polinucleótido de la presente invención en condiciones de restricción alta (es decir, ácido nucleico que contiene una secuencia de bases que codifica el polinucleótido de la presente invención o una parte del mismo, o una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases que codifica el polinucleótido de la presente invención o una parte del mismo)).

10 Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para el cribado de una sustancia que hace proliferar las células β pancreáticas o un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes (o una sustancia candidato del mismo), que comprende cultivar células que tienen la capacidad de expresar el polinucleótido de la presente invención en presencia o ausencia de una sustancia de ensayo, medir y comparar el nivel de expresión del polinucleótido de la presente invención en ambas condiciones usando una sonda de ácido nucleico, cebador de ácido nucleico o similar, que detecta específicamente el polinucleótido de la presente invención, en donde se
15 selecciona una sustancia que promueve la expresión del polinucleótido como un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes.

(En lo sucesivo a veces denominado "el método de cribado de la presente invención").

20 Aunque las células mencionadas antes que tienen capacidad de expresar el polinucleótido de la presente invención no están particularmente limitadas siempre que sean células de mamífero (p. ej., de ser humano, ratón, rata, conejo, oveja, cerdo, bovino, gato, perro, mono) que expresen de forma endógena el polinucleótido de la presente invención, por ejemplo, se usan células β pancreáticas humanas. Además, también se puede usar un tejido que contiene células que tienen la capacidad de expresar el polinucleótido de la presente invención. Los ejemplos de los tejidos incluyen islotes pancreáticos que contienen células β pancreáticas, páncreas, pulmón, vejiga, placenta, glándula mamaria y colon. Como tejidos, se usan preferiblemente islotes pancreáticos que contienen células β pancreáticas,
25 páncreas y similares. Cuando se usan células o tejidos derivadas de un animal no humano, se pueden aislar del organismo vivo y cultivar, o se puede administrar una sustancia de ensayo al organismo vivo y las células o tejidos en el mismo se pueden aislar después de un determinado tiempo.

30 Los ejemplos de las sustancias de ensayo incluyen proteína, péptido, compuesto no peptídico, compuesto de síntesis, producto de fermentación, extracto celular, extracto de planta, extracto de tejido animal y similares. Estas sustancias pueden ser nuevas o conocidas. Además, la biblioteca de compuestos producida usando una técnica de química combinatoria, biblioteca de péptidos aleatorios producida por síntesis en fase sólida o presentación en fago, y similares, también son ejemplos preferidos de las sustancias de ensayo.

Por ejemplo, el nivel de expresión del polinucleótido de la presente invención se puede medir concretamente como sigue.

35 (i) Se administra una sustancia de ensayo a un mamífero no humano (p. ej., ratón, rata, conejo, oveja, cerdo, bovino, gato, perro, mono, ave). Un determinado tiempo después de la administración, se recupera una muestra biológica que contiene células que expresan de forma natural el polinucleótido de la presente invención, tal como islote, páncreas y similares. El polinucleótido de la presente invención que es expresado en las células contenidas en la muestra biológica obtenida se puede cuantificar, por ejemplo, preparando un extracto de ARN que contiene micro
40 ARN de las células por un método convencional, y sometiendo el extracto de ARN obtenido a RT-PCR, matriz de ácido nucleico, análisis por transferencia Northern y similares.

45 (ii) Las células de mamífero que expresan el polinucleótido de la presente invención (p. ej., células β pancreáticas) son cultivadas in vitro de acuerdo con un método convencional, durante el cual se añade una sustancia de ensayo al medio. Después de cultivo durante un determinado tiempo, se puede cuantificar el nivel de expresión del polinucleótido de la presente invención, que está contenido en las células, y analizar usando un método tal como RT-PCR, matriz de ácido nucleico, análisis por transferencia Northern y similares.

50 Como resultado de la medición, los cambios en el nivel de expresión del polinucleótido de la presente invención, que son causados por la sustancia de ensayo, se correlacionan con una actividad para la proliferación de células β pancreáticas, o una actividad para prevenir o tratar la diabetes. Por lo tanto, una sustancia que promueve la expresión del polinucleótido de la presente invención se puede seleccionar como una sustancia que hace proliferar las células β pancreáticas o un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes (o una sustancia candidato del mismo).

55 Opcionalmente, se puede confirmar si la sustancia seleccionada en la etapa mencionada antes, tiene una actividad para hacer proliferar células β pancreáticas (incluyendo una actividad para acelerar la proliferación), o puede prevenir o tratar la diabetes.

La presencia o ausencia de una actividad de proliferación de células β pancreáticas se puede determinar, por ejemplo, cultivando in vitro células β pancreáticas de un mamífero, en presencia o ausencia de una sustancia de

ensayo, y un determinado tiempo después del inicio del cultivo, medir el nivel de proliferación de células β pancreáticas en ambas condiciones, por un método conocido por sí mismo, tal como en ensayo de MTT y similares, compararlos.

5 Además, la presencia o ausencia de una actividad para prevenir o tratar la diabetes se puede determinar, por ejemplo, administrando una sustancia de ensayo a un mamífero no humano modelo de diabetes, y un tiempo determinado después de la administración, evaluar los síntomas de la diabetes tales como la glucosa en sangre en el mamífero no humano, y comparar los síntomas con aquellos sin administración de la sustancia de ensayo.

10 Los ejemplos de los mamíferos no humanos modelo de diabetes incluyen modelos de diabetes de tipo 2 en ratones tales como ratón KK (p. ej., ratón KK/Ta, ratón KK/Snk), ratón KK-A^Y (p. ej., KK-A/Ta mouse), ratón db/db C57BL/KsJ, ratón db/db C57BL/6J, ratón ob/ob y ratón con dieta con carga alta de grasa, y modelo de diabetes de tipo 2 en rata tal como rata GK, rata ZDF y rata con dieta con carga alta de grasa. Los ejemplos de modelo de diabetes de mamíferos no humanos incluyen modelos animales de diabetes de tipo 1 tales como modelo animal de diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) y modelo de STZ de múltiples dosis bajas.

15 Después, una sustancia de ensayo que se ha confirmado que tiene una actividad de proliferación de células β pancreáticas y/o actividad para prevenir o tratar la diabetes, se puede seleccionar como una sustancia que hace proliferar las células β pancreáticas o un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes (o una sustancia candidato del mismo).

20 Una sustancia seleccionada por el método de cribado de la presente invención es útil como un agente para la proliferación de células β pancreáticas; un agente para la profilaxis o tratamiento de la diabetes (p. ej., diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, diabetes gestacional, diabetes por obesidad); un agente para la profilaxis o tratamiento de la tolerancia alterada a la glucosa (TAG); un agente para suprimir el avance de la tolerancia alterada a la glucosa a la diabetes (o una sustancia candidato del mismo).

25 Además, una sustancia seleccionada por el método de cribado de la presente invención también es útil como un agente para la profilaxis o tratamiento de complicaciones diabéticas [p. ej., neuropatía, nefropatía, retinopatía, cataratas, macroangiopatía, osteopenia, coma diabético hiperosmolar, infecciones (p. ej., infección respiratoria, infección del tracto urinario, infecciones gastrointestinales, infecciones de tejidos dérmicos blandos, infecciones de miembro inferior), gangrena diabética, xerostomía, hipoacusia, trastornos cerebrovasculares, trastornos de la circulación periférica de la sangre], caquexia diabética, síndrome de resistencia a la insulina y similares (o una sustancia candidato del mismo).

30 La sustancia seleccionada por el método de cribado de la presente invención se puede formular de la misma forma que en el medicamento mencionado antes de la presente invención. Puesto que la preparación así obtenida es segura y tiene toxicidad baja, se puede administrar, por ejemplo, a mamíferos (p. ej., ser humano, rata, ratón, hámster, conejo, oveja, cabra, cerdo, bovino, caballo, gato, perro, mono, chimpancé).

<4> Uso para evaluar la susceptibilidad a fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes, etc.

35 Puesto que el polinucleótido de la presente invención, o una de sus sales, tiene una actividad para acelerar la proliferación de células β pancreáticas, se puede determinar la susceptibilidad de un paciente a un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o un fármaco para la proliferación de células β pancreáticas, en la decisión de un diseño de administración de un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o un fármaco para la proliferación de células β pancreáticas y similares, poniendo en contacto un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o un fármaco para la proliferación de células β pancreáticas que se va a administrar a las células de un paciente, midiendo el nivel de expresión del polinucleótido de la presente invención en las células, y correlacionando los cambios en el nivel de expresión y la susceptibilidad al fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o el fármaco para la proliferación de células β pancreáticas. Por lo tanto, se describe un método para determinar la susceptibilidad a un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o un fármaco para la proliferación de células β pancreáticas, que comprende comparar la expresión del polinucleótido de la presente invención en células que tienen una capacidad de expresar el polinucleótido entre la presencia y ausencia de un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o un fármaco para la proliferación de células β pancreáticas (en lo sucesivo denominado a veces "método de determinación de la presente invención").

50 Más específicamente, se describe un método para determinar la susceptibilidad a un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o un fármaco para la proliferación de células β pancreáticas, que comprende cultivar células que tienen una capacidad para expresar el polinucleótido de la presente invención, en presencia o ausencia de un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o un fármaco para la proliferación de células β pancreáticas, midiendo los niveles de expresión del polinucleótido de la presente invención en ambas condiciones, usando una sonda de ácido nucleico o cebador de ácido nucleico que detecta específicamente el polinucleótido de la presente invención, y comparándolos.

55 En el método de determinación, como células que tienen una capacidad de expresar el polinucleótido de la presente invención, se usan células de un sujeto de ensayo (ser humano u otro mamífero (p. ej., ratón, rata, conejo, oveja, cerdo, bovino, gato, perro, mono)) programado para la administración de un fármaco profiláctico o terapéutico para

la diabetes o un fármaco para la proliferación de células β pancreáticas. Las células no están particularmente limitadas siempre que expresen de forma natural el polinucleótido de la presente invención (p. ej., células β pancreáticas) o una muestra biológica que las contenga (p. ej., islote, páncreas, pulmón, vejiga, placenta, glándula mamaria, colon), dándose preferencia a las células β pancreáticas. La célula, tejidos y similares, derivados de un mamífero se pueden aislar del cuerpo y cultivar, o se puede administrar un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o un fármaco para la proliferación de células β pancreáticas a un organismo vivo y, después de un determinado tiempo, se pueden aislar las células o una muestra biológica que las contiene.

Los ejemplos de los fármacos profilácticos o terapéuticos para la diabetes incluyen los ilustrados como el fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes mencionado antes.

Los ejemplos de los fármacos para la proliferación de células β pancreáticas incluyen los ilustrados como el fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes mencionado antes.

En el método de determinación, el nivel de expresión del polinucleótido de la presente invención se puede medir específicamente como sigue.

(i) Se administra un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o un fármaco para la proliferación de células β pancreáticas a un ser humano o un mamífero no humano (p. ej., ratón, rata, conejo, oveja, cerdo, bovino, gato, perro, mono, ave). Un determinado tiempo después de la administración, se recupera por biopsia o similares, una muestra biológica que contiene células que expresan de forma endógena el polinucleótido de la presente invención, tales como islotes, páncreas o similares. El polinucleótido de la presente invención que es expresado en las células contenidas en la muestra biológica recogida se puede cuantificar, por ejemplo, extrayendo el ARN que contiene miARN de las células etc., por un método convencional, y usando un método tal como RT-PCR, matriz de ácido nucleico y similares, o también se puede cuantificar por análisis de transferencia Northern, conocidos por sí mismos.

(ii) Las células de mamífero (p. ej., células β pancreáticas) que expresan el polinucleótido de la presente invención se cultivan in vitro de acuerdo con un método convencional en un medio al que se ha añadido un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o un fármaco para la proliferación de células β pancreáticas. Después de cultivo durante un determinado tiempo, se puede cuantificar el nivel de expresión del polinucleótido de la presente invención contenido en las células, y analizar por un método tal como RT-PCR, matriz de ácido nucleico, análisis por transferencia Northern y similares.

Mediante el análisis mencionado antes, se correlacionan los cambios en el nivel de expresión del polinucleótido de la presente invención causados por un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o un fármaco para la proliferación de células β pancreáticas, y la susceptibilidad a dicho fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o fármaco para la proliferación de células β pancreáticas. Después, basándose en la correlación positiva entre los cambios en el nivel de expresión del polinucleótido de la presente invención y la susceptibilidad a dicho fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o fármaco para la proliferación de células β pancreáticas, se determina la susceptibilidad a dicho fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o fármaco para la proliferación de células β pancreáticas.

Cuando un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o un fármaco para la proliferación de células β pancreáticas promueve el nivel de expresión del polinucleótido de la presente invención, se puede determinar que el sujeto de ensayo tiene mucha posibilidad de ser susceptible a dicho fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o fármaco para la proliferación de células β pancreáticas (es decir, es alta la posibilidad de que dicho fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o fármaco para la proliferación de células β pancreáticas sea eficaz para el sujeto de ensayo). Por otra parte, cuando el nivel de expresión del polinucleótido de la presente invención no es promovido, se puede determinar que el sujeto de ensayo puede no ser susceptible a dicho fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o fármaco para la proliferación de células β pancreáticas (es decir, existe la posibilidad de que dicho fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o fármaco para la proliferación de células β pancreáticas no sea eficaz para el sujeto de ensayo).

Cuando el grado de promoción del nivel de expresión del polinucleótido de la presente invención es mayor, se puede determinar que el sujeto de ensayo tiene una mayor posibilidad de tener susceptibilidad a dicho fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o fármaco para la proliferación de células β pancreáticas.

Usando el método de determinación, se puede acordar un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes y un fármaco para la proliferación de células β pancreáticas, que se espera que sea eficaz para pacientes, en la determinación del plan de administración de un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o un fármaco para la proliferación de células β pancreáticas, selección de fármaco y similares.

Un polipéptido que contiene la siguiente secuencia de bases también se puede usar como un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o un fármaco para la proliferación de células β pancreáticas, de la misma forma que el polinucleótido de la presente invención, y se puede usar además para un método para el cribado de un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes y similares, y un método para determinar la susceptibilidad a un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes y similares.

<A> Una secuencia de bases que tiene una homología no menor de 70% con la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4;

 Una secuencia parcial continua que tiene una longitud no menor de 5 nucleótidos, que está contenida en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4;

5 <C> Una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de los apartados <A> o mencionados antes.

La secuencia de bases del apartado <A> mencionado antes tiene una homología (es decir, identidad) no menor de 70% y menor de 90%, preferiblemente no menor de 75% y menor de 90%, no menor de 80% y menor de 90%, no menor de 85% y menor de 90%, con la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4.

10 Además, la secuencia de bases del apartado <A> mencionado antes, abarca la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, excepto que se eliminan, sustituyen, añaden o insertan 3, 4, 5 o 6 bases. Los ejemplos de las secuencias de bases incluyen (i) la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, excepto que se eliminan 3, 4, 5 o 6 bases, (ii) la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, excepto que se añaden 3, 4, 5 o 6 bases, (iii) la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, excepto que se insertan 3, 4, 5 o 6 bases, (iv) la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, excepto que se sustituyen 3, 4, 5 o 6 bases por otras bases, y (v) las secuencias de bases que contienen esas mutaciones en combinación (el número total de bases eliminadas, sustituidas, añadidas o insertadas es 3, 4, 5 o 6).

15 Cuando la secuencia de bases contiene mutaciones (eliminación, sustitución, adición o inserción), como se ha mencionado antes, no hay restricciones en relación con las posiciones de las mutaciones.

20 La longitud de la secuencia parcial del apartado mencionado antes, es al menos 5 nucleótidos, preferiblemente, no menor de 7 nucleótidos, no menor de 10 nucleótidos, no menor de 12 nucleótidos, no menor de 15 nucleótidos o no menor de 17 nucleótidos.

25 La posición de la secuencia parcial del apartado mencionado antes en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, no está limitada siempre que el polinucleótido tenga una actividad para acelerar la proliferación de células β pancreáticas de un mamífero. Como un ejemplo de la posición de la secuencia parcial del apartado mencionado antes, en la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, se pueden mencionar la 3'-terminal y la 5'-terminal de la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4.

30 Como una realización preferida del polinucleótido de la presente invención que contiene una secuencia parcial del apartado mencionado antes, se puede mencionar un polinucleótido que consiste en una secuencia parcial continua que tiene una longitud de nucleótidos no menor de 5, que está contenida en la secuencia de bases mostrada por la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4.

La secuencia de bases del apartado <C> mencionado antes, es completamente complementaria a la secuencia de bases del apartado <A> o mencionado antes.

35 La presente invención se explica con más detalle a continuación en relación con los ejemplos, que no deben considerarse limitantes.

Ejemplos

Las abreviaturas en los siguientes ejemplos son las usadas actualmente en la técnica indican, por ejemplo, los siguiente,

ARN: ácido ribonucleico

40 miARN: microARN

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

BrdU; 5-bromo-2'-desoxiuridina

SEQ ID NO en la lista de secuencias en la presente descripción muestra las siguientes secuencias.

(SEQ ID NO: 1) secuencia de bases de mmu-miR-199b*

45 (SEQ ID NO: 2) secuencia de bases de mmu-miR-199b

(SEQ ID NO 3) secuencia de bases de mmu-miR-199a-5p

(SEQ ID NO: 4) secuencia de bases de hsa-miR-199b-5p

(SEQ ID NO: 5) secuencia de bases del precursor de mmu-miR-199b

- (SEQ ID NO: 6) secuencia de bases del precursor de hsa-miR-199b
- (SEQ ID NO: 7) secuencia de bases del precursor de mmu-miR-199a-1
- (SEQ ID NO: 8) secuencia de bases del precursor de mmu-miR-199a-2
- (SEQ ID NO: 9) secuencia de bases del precursor de hsa-miR-199a-1
- 5 (SEQ ID NO 10) secuencia de bases del precursor de hsa-miR-199a-2
- (SEQ ID NO: 11) secuencia de bases del transcrito primario de miR-199b de ratón
- (SEQ ID NO: 12) secuencia de bases del transcrito primario de miR-199b humano
- (SEQ ID NO: 13) secuencia de bases del transcrito primario de miR-199a de ratón
- (SEQ ID NO: 14) secuencia de bases del transcrito primario de miR-199a de ratón
- 10 (SEQ ID NO: 15) secuencia de bases del transcrito primario de miR-199a humano
- (SEQ ID NO: 16) secuencia de bases del transcrito primario de miR-199a humano
- (SEQ ID NO: 17) secuencia de bases de la sonda usada en el ejemplo 3
- (SEQ ID NO: 18) secuencia de bases del cebador directo usado en el ejemplo 3
- (SEQ ID NO: 19) secuencia de bases del cebador inverso usado en el ejemplo 3
- 15 (SEQ ID NO: 20) secuencia de bases de la sonda usada en el ejemplo 3
- (SEQ ID NO: 21) secuencia de bases del cebador directo usado en el ejemplo 3
- (SEQ ID NO: 22) secuencia de bases del cebador inverso usado en el ejemplo 3
- (SEQ ID NO: 23) secuencia de bases de la sonda usada en el ejemplo 3
- (SEQ ID NO: 24) secuencia de bases del cebador directo usado en el ejemplo 3
- 20 (SEQ ID NO: 25) secuencia de bases del cebador inverso usado en el ejemplo 3
- (SEQ ID NO: 26) secuencia de bases de rno-mir-146b
- (SEQ ID NO: 27) secuencia de bases de hsa-mir-375

Ejemplo 1

25 Se inyectó una solución de colagenasa P 0,7 mg/ml (Roche Diagnostics, Cat.11914428) en el páncreas de ratas Wistar macho (de 9 a 12 semanas de edad) por el conducto colédoco, y se retiró el páncreas. El bazo retirado se dejó reposar a 37°C durante 20 min, y el tejido del páncreas se rompió mediante pipeta y se lavó con HBSS (Invitrogen). Se preparó una suspensión de células de los islotes por centrifugación por gradiente de densidad usando Ficoll PM400 (Amersham Biotech). Las células de los islotes de cultivo primario de rata se obtuvieron de la suspensión de células de los islotes mencionada antes, usando una solución enzimática para dispersar las células nerviosas (Nerve-Cell Culture System). Las células de los islotes de cultivo primario de rata se suspendieron en 30 DMEM (Invitrogen) que contenía glucosa 11 mM, suero de caballo al 1% (Invitrogen), HEPES 25 mM (Dojindo), y P.S. (Invitrogen). Las células de los islotes mencionadas antes suspendidas en DMEM se sembraron en una placa de 96 pocillos revestida con membrana basal Matrigel (Becton, Dickinson and Company) con $2,0 \times 10^4$ células/100 μ l/pocillo. El día 2 después de siembra, las células se transfectaron con el precursor de miARN Pre-miR (concentración final 2,5 - 50 nM, adquirido en ABI, ID: PM10526) que expresa mmu-miR-199b* o Pre-miR control negativo nº 1 (10 nM, adquirido en ABI, ID: AM17110) usando DharmaFECT1 0,2 μ l/pocillo (Thermo Scientific) en presencia de BrdU (concentración final 10 μ M) y, 24 h desde la transfección, el medio se cambió al DMEM mencionado antes añadido con BrdU 10 μ M. Las ID y las secuencias de bases de los miARN maduros de los 35 precursores de miARN Pre-miR usados en el ejemplo 1 y el ejemplo 2 mencionado más adelante, se muestran en la tabla 1. El nivel de expresión del ARNm de mmu-miR-199b* después de la transfección mencionada antes se analizó como sigue. Es decir, 2 días después de la transfección, se preparó ADNc de acuerdo con el protocolo adjunto con el kit TaqMan MicroRNA Cells-to-Ct™ (Ambion) de las células de los islotes después de transfección, y se aplicaron al método de RT-PCR cuantitativo (ABI prism 7900 Sequence Detection System, ABI) usando ensayos de miARN TaqMan (ABI). La ID del ensayo de miARN TaqMan ABI mencionado antes se muestra en la tabla 1.

40

Tabla 1

Nombre del miARN maduro	n° de acceso	Secuencia de bases del miARN maduro	ID de Pre-miR	ID TaqMan
Pre-miR control Neg n° 1			AM17110	
mmu-miR-199b*	MIMAT0000672	CCCAGUGUUUAGACUACCUUGUUC (SEQ ID NO: 1)	PM10526	001131
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA (SEQ ID NO: 2)	PM11779	002304
hsa-miR-199a-5p	MIMAT0000231	CCCAGUGUUCAGACUACCUUGUUC (SEQ ID NO: 3)	PM10893	000498
hsa-miR-199b-5p	MIMAT0000263	CCCAGUGUUUAGACUACCUUGUUC (SEQ ID NO: 4)	PM10553	000500

Como se muestra en la figura 1, el nivel de expresión de mmu-miR-199b* aumentó notablemente de una forma dependiente de la concentración del precursor de miARN Pre-miR que expresa mmu-miR-199b*.

Ejemplo 2

5 Las células de los islotes de cultivo primario de rata preparadas de la misma forma que en el ejemplo 1 se transfectoron con concentración final del precursor de miARN Pre-miR 2,5 - 50 nM que expresa mmu-miR-199b* (adquirido en ABI, ID: PM10526), precursor de miARN Pre-miR que expresa hsa-miR-199a-3p (adquirido en ABI, ID: PM11779), precursor de miARN Pre-miR que expresa hsa-miR-199a-5p (adquirido en ABI, ID: PM10893) o precursor de miARN Pre-miR que expresa hsa-miR-199b-5p (adquirido en AMBI, ID: PM10553), o Pre-miR control negativo nº 1 10 nM (adquirido en ABI, ID: AM17110), y se evaluó la actividad para acelerar la proliferación de células β pancreáticas el día 5 desde la transfección. La actividad para acelerar la proliferación de células β pancreáticas se evaluó específicamente como sigue. Es decir, 5 días desde la transfección mencionada antes, las células de los islotes de cultivo primario de rata se sumergieron en para-formaldehído al 4% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a temperatura ambiente durante 30 min, y se sumergieron en solución de HCl 1,5 N durante 1 h. Después, las células se sumergieron en PBS (Invitrogen) que contenía suero de cabra normal al 10% (GIBCO, en lo sucesivo denominado NGS) y Triton X-100 al 0,2% (Sigma) a temperatura ambiente durante 20 min. Además, se hizo reaccionar una solución de anticuerpo policlonal de cobayo anti-insulina (ABCAM) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-BrdU (Dako) diluida 200 veces con NGS al 1% que contenía PBS, a 4°C durante la noche, y las células se lavaron tres veces con PBS (200 µl/pocillo). Se hicieron reaccionar anticuerpo de cerdo anti-IgG de cobaya Alexa fluor 568 (Invitrogen) y anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón Alexa fluor 488 (Invitrogen) diluido 200 veces, y Hoechst33342 5 µM (Invitrogen) en PBS que contenía NGS al 1% a temperatura ambiente durante 1 h. Las células se lavaron tres veces con PBS (200 µl/pocillo), y se sometieron a análisis por el Analizador IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), y se obtuvieron 20 campos de imágenes por 1 pocillo usando lentes de objetivo x10. Usando el programa Developer, se analizaron por pocillo aproximadamente 3000-4000 células de las células positivas para insulina y aproximadamente 500 de las células positivas para insulina y positivas para BrdU.

25 Los resultados obtenidos por el análisis mencionado antes se muestran en la figura 2. Como se muestra en la figura 2, debido a la expresión de mmu-miR-199b*, el número de células positivas para insulina y positivas para BrdU aumentó significativamente de una forma dependiente de la concentración, y el número de células positivas para insulina aumentó significativamente por el tratamiento 50 nM. Por lo tanto, se mostró que las células β pancreáticas proliferan al aumentar la expresión génica de mmu-miR-199b*. Además, como se muestra en la figura 3, se encontró que la expresión forzada de hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199a-5p o hsa-miR-199b-5p aumentaba significativamente el número de células positivas para insulina y positivas para BrdU de una forma dependiente de la concentración de cada precursor de miARN Pre-miR sometido a la transfección, y hacía proliferar las células β pancreáticas de la misma forma que con mmu-miR-199b*.

Ejemplo 3

35 De la misma forma que en el ejemplo 1, células de los islotes de cultivos primarios de rata se transfectoron con precursor de miARN Pre-miR que expresa mmu-miR-199b* (concentración final 2,5 - 50 nM, adquirido en ABI, ID: PM10526) o Pre-miR control negativo nº 1 10 nM (adquirido en ABI, ID: AM17110). El día 2 desde la transfección, se extrajo el ARN total usando RNeasy96 (Qiagen) de las células de los islotes después de dicha transfección. Se sintetizó ADNc a partir del ARN total usando un kit de reactivos PrimeScript RT (Takara). Usando el ADNc, se llevó a cabo un método de RT-PCR cuantitativo (ABI prism 7900 Sequence Detection System, ABI), y se calculó el nivel de expresión del ARNm de los genes de ciclina D1 y ciclina E2 por genes de proteína de unión a TATA (TBP). Las secuencias de las sondas y cebadores usadas para el presente análisis se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

Gen	Sonda	directa	inversa
rTBP	5'-Fam-CCACAGGGTGCCATGACTC (SEQ ID NO: 17)	5'-CTTCCACCTTATGCTCAG (SEQ ID NO: 18)	5'-GACTGAAGATGGGAATTC (SEQ ID NO: 19)
rCiclina D1	5'-Fam-AGAACAAGCAGATCATCCGCAA (SEQ ID NO: 20)	5'-CACTTCTCTCCAAAATG (SEQ ID NO: 21)	5'-GGGTTGGAAAATGAACTTC (SEQ ID NO: 22)
rCiclina E2	5'-Fam-CAGAGGAGATCACCAGAAGCATC (SEQ ID NO: 23)	5'-CCAAGAAGAGAAAAACAGC (SEQ ID NO: 24)	5'-GCCAACAAATTCCTAAATCTC (SEQ ID NO: 25)

Los resultados del cálculo antes mencionado se muestran en la figura 4. Como se muestra en la figura 4, se encontró que mmu-miR-199b* promovía la expresión de los genes de ciclina D1 y ciclina E2 de una forma dependiente de la concentración del precursor de miARN introducido, y producía la proliferación de células β pancreáticas.

5 Ejemplo de referencia

Usando un método equivalente al de los ejemplos 1 a 3 antes mencionados, se mostró que rno-mir-146b y hsa-mir-375, cuyas ID y secuencias de bases se muestran en la siguiente tabla 3, también tenían una actividad para acelerar la proliferación de células β pancreáticas.

Tabla 3

Nombre del miARN	n° de acceso	Secuencia madura
Pre-miR control Neg n° 1		
rno-mir-146b	MIMAT0005595	UGAGAACUGAAUCCAUAGGCUGU (SEQ ID NO: 26)
hsa-mir-375	MIMAT0000728	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA (SEQ ID NO: 27)

10 A partir de estos resultados, se sugirió que el miR-146b maduro, miR-375 maduro y sus precursores, también se pueden usar como un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes o un agente para la proliferación de células β pancreáticas, como el polinucleótido de la presente invención. Además, también se sugirió que el miR-146b maduro, miR-375 maduro y sus precursores, se pueden usar para el cribado de un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes y similares, y la determinación de la susceptibilidad a un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes y similares.

15 Aplicabilidad industrial

20 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un nuevo fármaco profiláctico o terapéutico para enfermedades tales como la diabetes y similares. Además, se proporcionan un método para el cribado de un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes y similares, y un método para determinar la susceptibilidad a un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes y similares, que se basan en una nueva teoría científica.

Esta solicitud se basa en la solicitud de patente n° 2010-156261 (fecha de presentación: 8 de julio, 2010) presentada en Japón.

Lista de secuencias

5 <110> Takeda Pharmaceutical Company Limited
 <120> Agente profiláctico o terapéutico para la diabetes
 <130> 091735

10 <150> JP2010-156261
 <151> 08-07-2010
 <160> 27

15 <170> PatentIn versión 3.4
 <210> 1
 <211> 23
 <212> ARN
 20 <213> Mus musculus
 <400> 1
 cccaguguuu agacuaccug uuc 23

25 <210> 2
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Mus musculus
 30 <400> 2
 acaguagucu gcacauuggu ua 22

35 <210> 3
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Mus musculus
 40 <400> 3
 cccaguguuc agacuaccug uuc 23

45 <210> 4
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 50 cccaguguuu agacuaucug uuc 23
 <210> 5
 <211> 110
 55 <212> ARN
 <213> Mus musculus
 <400> 5
 ccagaggaua ccuccacucc gucuaccag uguuuagacu accuguucag gacuccaaa 60

60 uuguacagua gucugcaca ugguuaggcu gggcuggguu agaccucgg 110
 <210> 6
 <211> 110
 <212> ARN

ES 2 573 669 T3

<213> Homo sapiens
 <400> 6
 ccagaggaca ccuccacucc gucuaccag uguuuagacu aucuguucag gacuccaaa 60
 5 uuguacagua gucugcacau ugguuaggcu gggcuggguu agaccucgg 110
 <210> 7
 <211> 70
 <212> ARN
 10 <213> Mus musculus
 <400> 7
 gccauccag uguucagacu accuguucag gaggcuggga cauguacagu agucugcaca 60
 15 uugguuaggc 70
 <210> 8
 <211> 110
 <212> ARN
 20 <213> Mus musculus
 <400> 8
 uggaagcuuc aggagauccu gcuccgucgc cccaguguuc agacuaccug uucaggaaa 60
 ugccguugua caguagucug cacauugguu agacugggca agggccagca 110
 25 <210> 9
 <211> 71
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 9
 --- -
 gccaaaccag uguucagacu accuguucag gaggcucuca auguguacag uagucugcac 60
 auugguuagg c 71
 <210> 10
 35 <211> 110
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 40 --- --
 aggaagcuuc uggagauccu gcuccgucgc cccaguguuc agacuaccug uucaggaaa 60
 ugccguugua caguagucug cacauugguu agacugggca agggagagca 110
 <210> 11
 <211> 137
 45 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 11
 tgctgcctgg atggaccaga ggatacctcc actccgtcta cccagtgttt agactacctg 60
 50 ttcaggactc ccaaattgta cagtagtctg cacattggtt aggctgggct gggtagacc 120
 ctcggcaccg tcgctgg 137

ES 2 573 669 T3

	<210> 12		
	<211> 137		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
5			
	<400> 12		
	cagtggcggc ggtgccgagg gtctaaccga gccagccta accaatgtgc agactactgt	60	
	acaatttggg agtcctgaac agatagtcta aacctgggt agacggagtg gaggtgtcct	120	
	ctggtccatc caggcag	137	
10			
	<210> 13		
	<211> 87		
	<212> ADN		
	<213> Mus musculus		
15			
	<400> 13		
	cccaagccca gcctaaccga tgtgcagact actgtacatg tcccagcctc ctgaacaggt	60	
	agtctgaaca ctgggatggc ggggatg	87	
20			
	<210> 14		
	<211> 137		
	<212> ADN		
	<213> Mus musculus		
25			
	<400> 14		
	ttttccacac accgatggaa gcttcaggag atcctgctcc gtcgccccag tgttcagact	60	
	acctgttcag gacaatgccg ttgtacagta gtctgcacat tggttagact gggcaagggc	120	
	cagcaacgcc atggacg	137	
30			
	<210> 15		
	<211> 88		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
35			
	<400> 15		
	ccaagcccag cctaaccaat gtgcagacta ctgtacacat tgagagcctc ctgaacaggt	60	
	agtctgaaca ctgggttggc ggggccgg	88	
40			
	<210> 16		
	<211> 137		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
45			
	<400> 16		
	gcggtccatg gcgttgctct cccttgccca gtctaaccga tgtgcagact actgtacaac	60	
	ggcattgtcc tgaacaggta gtctgaacac tggggcgacg gagcaggatc tccagaagct	120	
	tccttctatg tacttaa	137	
50			
	<210> 17		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		

<220>
 <223> sonda rTBP Taqman

 <400> 17
 5 ccacaggggtg ccatgactc 19

 <210> 18
 <211> 18
 10 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> sonda directa rTBP Taqman
 15 <400> 18

 ctccacctt atgctcag 18
 20 <210> 19
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> sonda inversa rTBP Taqman

 <400> 19
 30 gactgaagat ggaattc 18

 <210> 20
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> sonda rCicinaD1 Taqman

 40 <400> 20

 agaacaagca gatcatccgc aa 22

 <210> 21
 45 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 50 <223> sonda directa rCicilinaD1 Taqman

 <400> 21

 cactcctct ccaaaatg 18
 55 <210> 22
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> sonda inversa rCicilinaD1 Taqman

 <400> 22
 65 gggttgaaa tgaactc 18

<210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> sonda rCiclinaE2 Taqman

 10 <400> 23

 cagaggagat caccaagaag catc 24

 <210> 24
 15 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> sonda directa rCiclinaE2 Taqman

 <400> 24

 ccaagaagag aaaaacagc 19
 25
 <210> 25
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> sonda inversa rCiclinaE2 Taqman

 <400> 25
 35 gccaacaatt ctaatctc 19

 <210> 26
 <211> 24
 40 <212> ARN
 <213> Rattus norvegicus

 <400> 26

 45 ugagaacuga auuccauagg cugu 24

 <210> 27
 <211> 22
 <212> ARN
 50 <213> Homo sapiens

 <400> 27

 55 uuuguucguu cggcucgcu ga 22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente para usar en la profilaxis o tratamiento de la diabetes, que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases igual o que tiene una homología no menor de 90% con la secuencia de bases mostrada en las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, o un polinucleótido que comprende una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases, o una de sus sales.
2. El agente según la reivindicación 1, para usar en la profilaxis o tratamiento de la diabetes, que es un agente de proliferación de células β pancreáticas.
- 10 3. Un polinucleótido que comprende una secuencia de bases igual o que tiene una homología no menor de 90% con la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, o un polinucleótido que comprende una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases, o una de sus sales, para usar en la profilaxis o tratamiento de la diabetes.
4. El polinucleótido según la reivindicación 3, para usar en la profilaxis o tratamiento de la diabetes, que se usa en la proliferación de células β pancreáticas.
- 15 5. Un método para cribar un fármaco para la profilaxis o tratamiento de la diabetes, que comprende
- (i) cultivar células que tienen una capacidad para expresar un polinucleótido que comprende una secuencia de bases igual o que tiene una homología no menor de 90% con la secuencia de bases mostrada por las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, en presencia o ausencia de una sustancia de ensayo, y
- 20 (ii) medir y comparar los niveles de expresión del polinucleótido, en donde se selecciona una sustancia que promueve la expresión del polinucleótido como un fármaco profiláctico o terapéutico para la diabetes.
6. El método según la reivindicación 5, que es para el cribado de una sustancia que produce la proliferación de células β pancreáticas.

Fig. 1

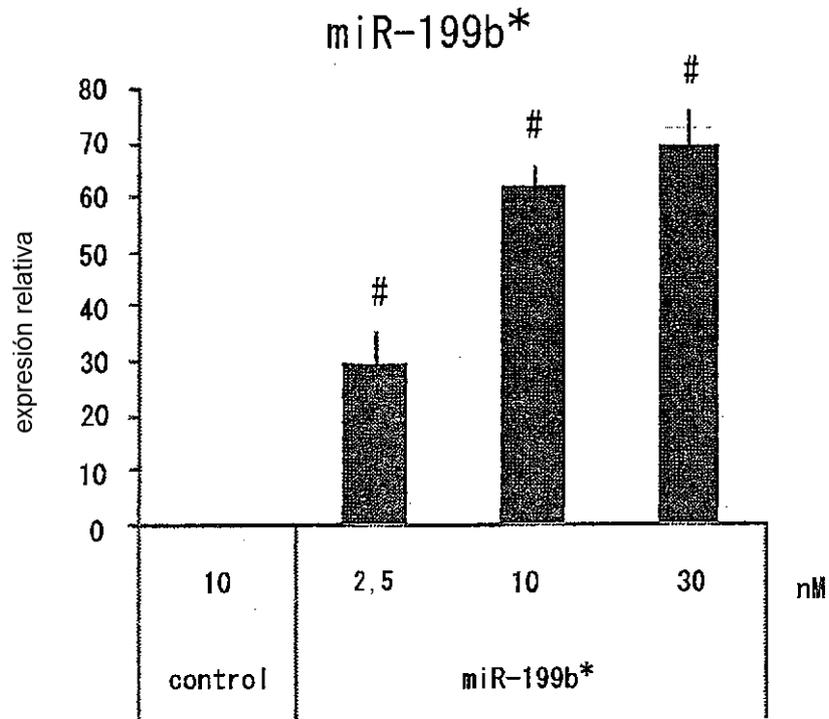


Fig. 2

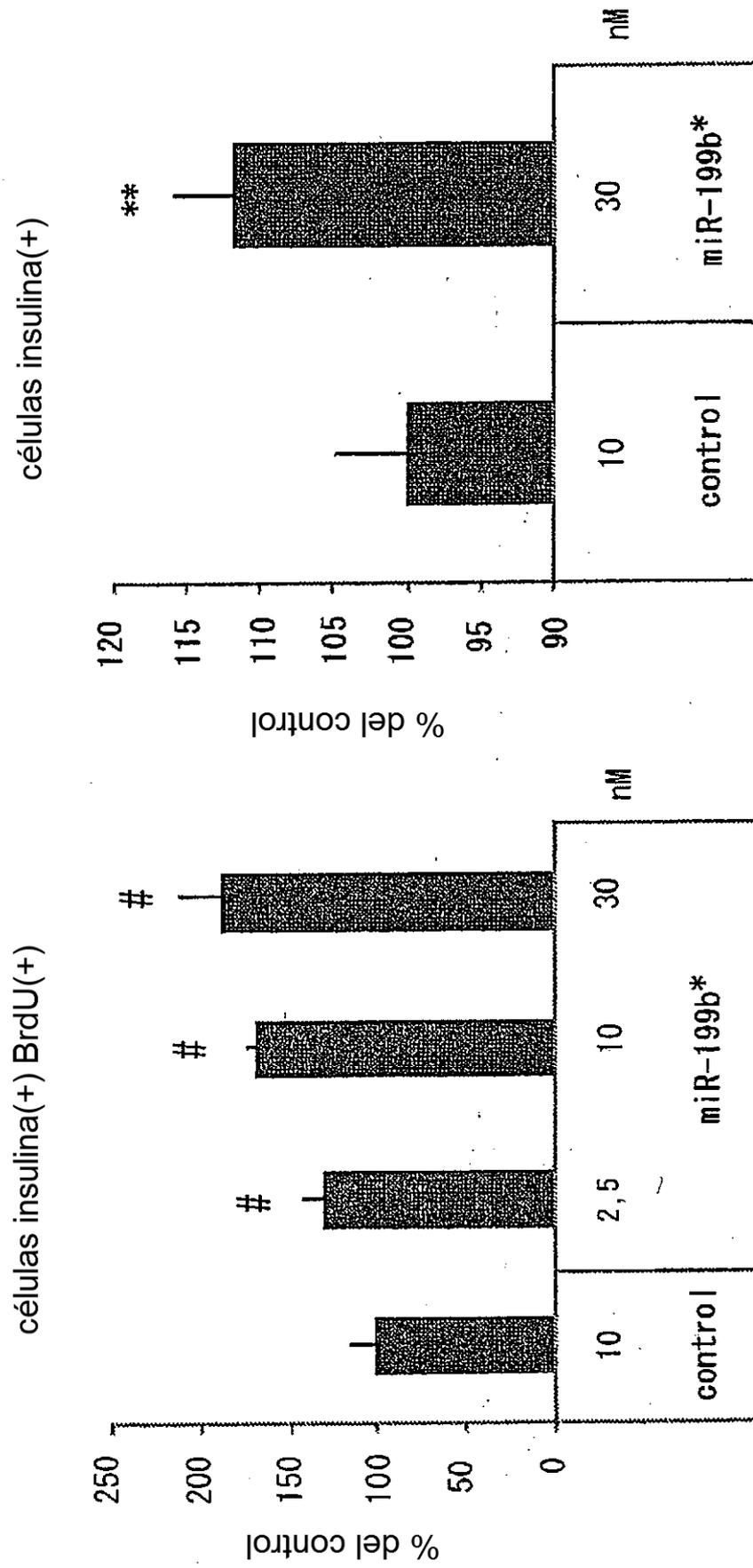


Fig. 3

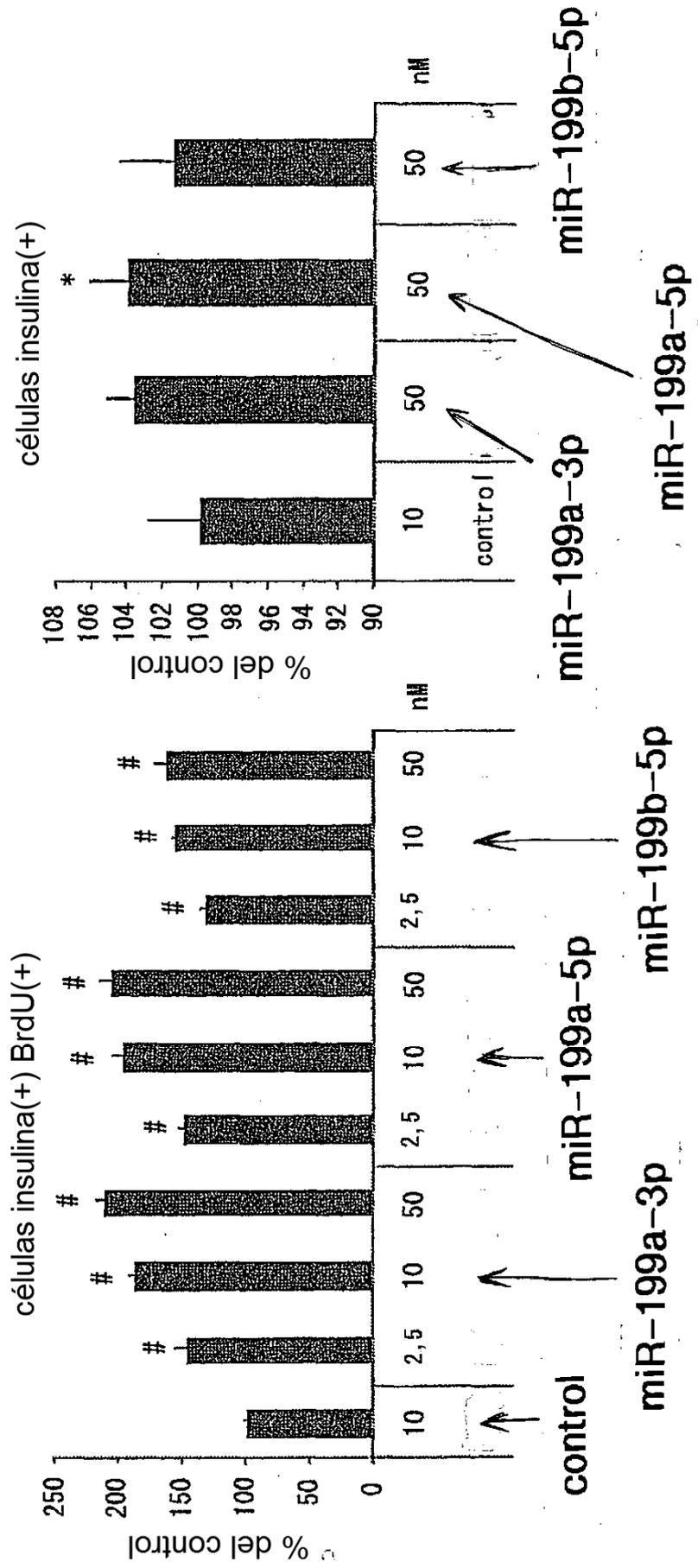


Fig. 4

