

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 055**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61P 9/10 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2010 PCT/AU2010/000698**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.12.2010 WO10139026**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2010 E 10782840 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2438167**

54 Título: **Moléculas terapéuticas y de diagnóstico**

30 Prioridad:

05.06.2009 AU 2009902615

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2017

73 Titular/es:

**CENTENARY INSTITUTE OF CANCER MEDICINE
AND CELL BIOLOGY (33.3%)
Locked Bag No. 6
Newtown, NSW 2042, AU;
THE UNIVERSITY OF SYDNEY (33.3%) y
WENKART FOUNDATION (33.3%)**

72 Inventor/es:

**GAMBLE, JENNIFER;
VADAS, MATHEW;
GOODALL, GREGORY y
YOUNG, JENNIFER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 644 055 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

Moléculas terapéuticas y de diagnóstico

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a especies de microARN (miARN) reguladas negativamente durante la angiogénesis. La invención se refiere así a métodos de inhibición de la angiogénesis y a métodos de potenciación de la angiogénesis mediante la modulación de estos miARN. La invención también se refiere a métodos de prevención y tratamiento de afecciones caracterizadas por, o asociadas con, la angiogénesis anómala. En el presente documento, se proporcionan además distintivos de la expresión de miARN indicadores de procesos angiogénicos, usos de miARN desvelados en el presente documento como agentes antiangiogénicos y en diagnóstico de enfermedades, y usos de antagonistas de miARN desvelados en el presente documento como agentes proangiogénicos.

15 Antecedentes de la invención

La angiogénesis, el proceso mediante el que se forman nuevos vasos sanguíneos, es un proceso fundamental que subyace a muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de los vertebrados, incluyendo la embriogénesis y el desarrollo fetal. También es crucial en las respuestas fisiológicas en curso, como la cicatrización de heridas.

La angiogénesis está regulada por una combinación compleja de factores de crecimiento estimulantes de la angiogénesis e inhibidores de la angiogénesis. El equilibrio entre los moduladores pro- y anti-angiogénicos rige cuándo, dónde y hasta qué punto se produce la angiogénesis dependiendo del estado de desarrollo y/o estado fisiológico del organismo. La mala regulación de la angiogénesis, que conduce a una formación de vasos bien excesiva o insuficiente, puede tener importantes consecuencias, y está asociada con una variedad de afecciones patológicas. La angiogénesis excesiva está asociada, por ejemplo, con afecciones tales como el cáncer, afecciones inflamatorias crónicas, trastornos oculares y enfermedades cardiovasculares. De igual manera, la angiogénesis inadecuada está implicada en, por ejemplo, heridas crónicas isquémicas y cierta infertilidad.

En el cáncer, la angiogénesis es crucial para el desarrollo de muchos cánceres, para el crecimiento tumoral y para la metástasis. Los tumores potencian la angiogénesis mediante la secreción de factores de crecimiento tales como VEGF, induciendo al crecimiento de vasos sanguíneos en el tumor. El desarrollo de los vasos sanguíneos proporciona al tumor el suministro requerido de nutrientes y oxígeno, y un camino para la eliminación de los productos de desecho. Entonces, el aumento de la vasculatura tumoral ofrece una mayor posibilidad de que el tumor forme metástasis. La terapia antiangiogénica ha emergido recientemente como una vía prometedora para el tratamiento del cáncer, y puede ofrecer ventajas frente a las terapias contra el cáncer más tradicionales, por ejemplo, la posibilidad de una susceptibilidad reducida al desarrollo de resistencia. Sin embargo, a pesar de la promesa, hasta la fecha, ha habido un éxito limitado en el desarrollo de agentes antiangiogénicos eficaces, y sigue existiendo la necesidad de identificar nuevas dianas y moléculas terapéuticas.

En vista del papel central de la angiogénesis regulada de manera normal en el desarrollo y en numerosos procesos fisiológicos, en alianza con las consecuencias clínicas significativas de la angiogénesis anómala (regulada tanto positiva como negativamente), existe una clara necesidad de desarrollar nuevas opciones terapéuticas para, cuando sea necesario, la potenciación de la angiogénesis y para la inhibición de la angiogénesis.

Los microARN (miARN) son una clase abundante de moléculas de ARN no codificante endógenas pequeñas (normalmente de 21 a 23 nucleótidos), altamente conservadas. Los miARN sirven como reguladores posteriores a la transcripción de la expresión génica. Son cruciales para muchas funciones celulares normales y desempeñan papeles fundamentales en, por ejemplo, la proliferación y diferenciación celulares, el desarrollo embrionario, la inflamación, la inmunidad y muchos procesos metabólicos. Los miARN específicos, incluyendo los patrones de expresión y la regulación alterada de la expresión de los miARN individuales, también están implicados cada vez más en una variedad de afecciones patológicas, incluyendo el cáncer y las enfermedades cardiovasculares.

Hasta la fecha, se han identificado más de 1.000 miARN, y se han encontrado más de 400 miARN con secuencia conocida en los seres humanos (véase, por ejemplo, <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>). Los miARN individuales normalmente se unen de forma incompleta a su ARN mensajero diana afín (ARNm) y como tal, cada miARN puede unirse a, y posiblemente regular, muchos ARNm diana. El análisis computacional sugiere que puede haber varios cientos de dianas de ARNm para cualquier miARN dado. Por consiguiente, un miARN único puede regular la expresión de uno o más (posiblemente de cientos de) genes diferentes.

Los miARN maduros se derivan de los denominados pri-miARN, que se transcriben a partir de regiones de ADN no codificante. Los pri-miARN, que, por lo general, contienen varios cientos de nucleótidos, son procesados a precursores de tallo-lazo (pre-miARN) de aproximadamente 70 nucleótidos por la RNasa III endonucleasa. Los pre-miARN son transportados activamente al citoplasma, donde se procesan posteriormente a dúplex de ARN cortos, normalmente de 21-23 pb. La cadena de miARN funcional se disocia de su cadena complementaria no funcional y

se sitúa dentro del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). (Como alternativa, el RISC puede cargar directamente estructuras de horquilla de pre-miARN). Los miARN se unen a las UTR de 3' de los ARNm diana, siendo importante en esta unión una región denominada "semilla", de aproximadamente 6-7 nucleótidos, cerca del extremo 5' del miARN (normalmente, las posiciones de nucleótidos 2 a 8). El papel del extremo 3' es menos claro. La regulación inducida por miARN de la expresión génica normalmente se realiza mediante represión traslacional, ya sea degradando proteínas a medida que emergen de los ribosomas o "congelando" ribosomas, y/o potenciando el movimiento de los ARNm diana a sitios de destrucción del ARN.

La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de los inventores de que la expresión de un subconjunto de miARN está regulada negativamente durante la angiogénesis y que la sobreexpresión de dicho miARN inhibe la angiogénesis. Por consiguiente, la presente invención abre vías para la potenciación o la inhibición de la angiogénesis y nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de afecciones asociadas con la angiogénesis anómala.

Sumario de la invención

En el presente documento, los artículos "un" y "una" se usan para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. Por ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones que la siguen, a menos que el contexto lo exija de otro modo, el término "comprender" y las variaciones tales como "comprende" o "comprendiendo", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o de una etapa, o de un grupo de números enteros o de etapas, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa, o grupo de números enteros o etapas.

La presente invención proporciona, inter otras cosas, métodos de potenciación o inhibición de la angiogénesis, comprendiendo dichos métodos la regulación del nivel de expresión de uno o más miARN, normalmente en células endoteliales, en donde la regulación alterada de un miARN seleccionado de miR_27a, miR_27b, miR_24, miR_23a, miR_23b, miR_20a, miR_21, miR_29a, miR_29b, miR_29c, miR_106a, miR_126, miR_193a, miR_195, miR_197, miR_221, miR_347 y miR_126*, en relación con los niveles endógenos normales, es capaz de potenciar o inhibir la angiogénesis.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para inhibir la angiogénesis, comprendiendo el método administrar a un sujeto, o a células o tejido derivados del mismo, uno o más miARN, o sus precursores o variantes, en los que al menos uno de dichos miARN comprende una región semilla que comprende la secuencia UCACAGU (SEQ ID NO: 37).

En una realización, el al menos un miARN que comprende la secuencia de la región semilla UCACAGU es miR_27a. En una realización particular, el miARN miR_27a puede ser hsa_miR_27a y puede comprender la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1.

El sujeto puede sufrir, estar predispuesto o estar en riesgo de desarrollar una afección asociada a una angiogénesis excesiva o no regulada.

La afección puede ser, por ejemplo, cáncer, una enfermedad cardiovascular, un trastorno inflamatorio crónico, un trastorno ocular, endometriosis o adiposidad. El trastorno cardiovascular puede ser aterosclerosis o restenosis. El trastorno inflamatorio crónico puede ser artritis reumatoide, enfermedad de Crohn o soriasis. El trastorno ocular puede ser retinopatía, retinopatía diabética, glaucoma o degeneración macular. La degeneración macular puede ser degeneración macular relacionada con la edad.

La presente invención también proporciona un método de potenciación o inducción de la angiogénesis en células o tejido de un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto, o a células o tejido derivados del mismo, una cantidad eficaz de uno o más antagonistas de un miARN, comprendiendo dicho miARN una región semilla que comprende la secuencia UCACAGU (SEQ ID NO: 37).

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un antagonista de un miARN, en el que dicho miARN comprende una región semilla que comprende la secuencia UCACAGU (SEQ ID NO: 37), para su uso en el tratamiento de una afección asociada a una angiogénesis alterada o suprimida, necesitando dicha afección la potenciación o la inducción de la angiogénesis, en el que dicho antagonista es un oligonucleótido antisentido específico de dicho miARN. En una realización, dicho oligonucleótido antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se expone en SEQ ID NO: 19. En una realización particular, dicha secuencia oligonucleotídica comprende una o más modificaciones tales como análogos de nucleótidos no naturales, enlaces no fosfatos entre nucleótidos y/o restos conjugados.

La potenciación o inducción de la angiogénesis puede ser para la reparación de heridas, tal como la cicatrización de heridas isquémicas. La potenciación o inducción de la angiogénesis puede ser para la reparación de tejidos, regeneración de tejidos u obtención de tejidos por ingeniería genética.

5 El sujeto puede sufrir, estar predispuesto a, o estar en riesgo de, desarrollar una afección asociada a una angiogénesis alterada o suprimida. La afección puede ser, por ejemplo, enfermedad de las arterias coronarias, ictus, un trastorno ginecológico, infertilidad o una herida isquémica.

10 Dicho antagonista de un miARN, siendo dicho miARN miR_27a, también se puede usar en el tratamiento de una afección que requiera la reducción de la permeabilidad de las células endoteliales, siendo dicho antagonista un oligonucleótido antisentido específico de dicho miARN.

15 Dicho antagonista de un miARN, siendo dicho miARN miR_27a, se puede usar además en el tratamiento de una afección que requiera el aumento de los niveles proteicos de VE-cadherina, siendo dicho antagonista un oligonucleótido antisentido específico de dicho miARN.

En el contexto del desarrollo de la invención, el solicitante también describe los siguientes objetos que no forman parte de la invención reivindicada:

20 - Un método de inhibición de la angiogénesis, comprendiendo el método administrar a un sujeto, o a células o tejido derivados del mismo, uno o más miARN, o sus precursores o variantes, en el que dicho miARN se selecciona de miR_27b, miR_24, miR_23a, miR_23b, miR_20a, miR_21, miR_29a, miR_29b, miR_29c, miR_106a, miR_126, miR_193a, miR_195, miR_197, miR_221, miR_347 y miR_126*. El miARN puede comprender una secuencia de nucleótidos como la expuesta en una cualquiera de SEQ ID NO: 2 a 18.

25 - El uso de un miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia UCACAGU (SEQ ID NO: 37), o un miARN seleccionado del grupo que consiste en miR_27a, miR_27b, miR_24, miR_23a, miR_23b, miR_20a, miR_21, miR_29a, miR_29b, miR_29c, miR_106a, miR_126, miR_193a, miR_195, miR_197, miR_221, miR_347 y miR_126*, o uno de sus precursores o variantes, como un agente antiangiogénico.

30 - El uso de un miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia UCACAGU (SEQ ID NO: 37), o un miARN seleccionado del grupo que consiste en miR_27a, miR_27b, miR_24, miR_23a, miR_23b, miR_20a, miR_21, miR_29a, miR_29b, miR_29c, miR_106a, miR_126, miR_193a, miR_195, miR_197, miR_221, miR_347 y miR_126*, o uno de sus precursores o variantes, para la fabricación de un medicamento para la inhibición de la angiogénesis.

35 - Composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más agentes antiangiogénicos que consisten en miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia UCACAGU (SEQ ID NO: 37), o un miARN seleccionado del grupo que consiste en miR_27b, miR_24, miR_23a, miR_23b, miR_20a, miR_21, miR_29a, miR_29b, miR_29c, miR_106a, miR_126, miR_193a, miR_195, miR_197, miR_221, miR_347 y miR_126*, o uno de sus precursores o variantes, como un agente antiangiogénico, opcionalmente, junto con vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

40 - Un método de potenciación o inducción de la angiogénesis en células o tejido de un sujeto, comprendiendo el método administrar a un sujeto, o a células o tejido derivados del mismo, una cantidad eficaz de uno o más antagonistas de un miARN seleccionado del grupo que consiste en miR_27b, miR_24, miR_23a, miR_23b, miR_20a, miR_21, miR_29a, miR_29b, miR_29c, miR_106a, miR_126, miR_193a, miR_195, miR_197, miR_221, miR_347 y miR_126*.

50 El miARN puede comprender una secuencia de nucleótidos como la expuesta en una cualquiera de SEQ ID NO: 2 a 18.

El antagonista puede ser un oligonucleótido antisentido específico del miARN. El oligonucleótido antisentido puede comprender una secuencia de nucleótidos como la expuesta en una cualquiera de SEQ ID NO: 20 a 36.

55 - El uso de un antagonista de miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia UCACAGU (SEQ ID NO: 37) o de un miARN seleccionado del grupo que consiste en miR_27b, miR_24, miR_23a, miR_23b, miR_20a, miR_21, miR_29a, miR_29b, miR_29c, miR_106a, miR_126, miR_193a, miR_195, miR_197, miR_221, miR_347 y miR_126*, como un agente proangiogénico.

60 - El uso de un antagonista de un miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia UCACAGU (SEQ ID NO: 37) o de un miARN seleccionado del grupo que consiste en miR_27b, miR_24, miR_23a, miR_23b, miR_20a, miR_21, miR_29a, miR_29b, miR_29c, miR_106a, miR_126, miR_193a, miR_195, miR_197, miR_221, miR_347 y miR_126* para la fabricación de un medicamento para la potenciación o inducción de la angiogénesis.

65

- 5 - Composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más agentes proangiogénicos que consisten en un antagonista de un miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia UCACAGU (SEQ ID NO: 37) o de un miARN seleccionado del grupo que consiste en miR_27b, miR_24, miR_23a, miR_23b, miR_20a, miR_21, miR_29a, miR_29b, miR_29c, miR_106a, miR_126, miR_193a, miR_195, miR_197, miR_221, miR_347 y miR_126*, opcionalmente, junto con vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 10 - Un método de diagnóstico de una enfermedad o afección asociada a una angiogénesis anómala en un sujeto, o la determinación de la predisposición de un sujeto a dicha enfermedad o afección, comprendiendo el método:
- 15 (a) obtener una muestra biológica del sujeto; y
(b) determinar el nivel de expresión de al menos un miARN, o uno de sus precursores o variantes en la muestra, miARN
- (i) que comprende una región semilla que comprende la secuencia UCACAGU (SEQ ID NO: 37), o
(ii) que se selecciona del grupo que consiste en miR_27a, miR_27b, miR_24, miR_23a, miR_23b, miR_20a, miR_21, miR_29a, miR_29b, miR_29c, miR_106a, miR_126, miR_193a, miR_195, miR_197, miR_221, miR_347 y miR_126*,
- 20 en el que el nivel de expresión de al menos un miARN es indicativo de una enfermedad o afección asociada a una angiogénesis anómala, o una predisposición a la misma, en el sujeto.
- El uso de un miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia UCACAGU (SEQ ID NO: 37) o de un miARN seleccionado del grupo que consiste en miR_27b, miR_24, miR_23a, miR_23b, miR_20a, miR_21, miR_29a, miR_29b, miR_29c, miR_106a, miR_126, miR_193a, miR_195, miR_197, miR_221, miR_347 y miR_126* para la detección de moléculas unidas por o reguladas por dicho miARN, en el que la actividad o la expresión de dichas moléculas está asociada a una angiogénesis.

30 Breve descripción de los dibujos

A continuación, se describirá la presente invención a modo de ejemplo no limitante, con referencia a los dibujos adjuntos.

35 Figura 1. Identificación de microARN que se regulan durante la angiogénesis *in vitro*. A. Gráficos de volcán que muestran los cambios en los microARN detectados por micromatriz de células endoteliales de venas umbilicales humanas aisladas de ARN (HUVEC) a partir de puntos de tiempo asociados con eventos angiogénicos significativos. Se representa gráficamente el logaritmo bayesiano de las posibilidades de la expresión diferencial frente al log2 (expresión en el punto de tiempo dividida entre la expresión en el tiempo cero). B. Se muestra la cuantificación de los niveles de expresión de hsa_miR_27a medidos mediante la PCR en tiempo real de Taqman. Las HUVEC se cosecharon y bien se lisaron (t=0 sin estimulación) o se estimularon con PMA y AC11 y se lisaron (t=0 con estimulación) o se volvieron a sembrar después tras la estimulación con PMA y AC11 en un gel de colágeno 3D durante 15 o 30 minutos. Los datos representan la media de los ensayos de PCR por triplicado \pm ETM. Los resultados mostrados se normalizan con respecto a las estirpes de células endoteliales (EC) snoU6B.3.

45 Figura 2. Los niveles de hsa_miR_27a se reducen significativamente en un medio de cultivo celular tridimensional, pero no en las condiciones de cultivo bidimensionales correspondientes. Se trataron HUVEC con estimuladores de la angiogénesis y luego se sembraron sobre placas recubiertas con colágeno (2D). Se estimuló el control (C) y luego se lisó directamente sin volver a sembrar. Datos agrupados de 3 estirpes independientes de HUVEC con experimentos realizados en diferentes días. *p = 0,05. [Para los resultados de la regulación negativa de los niveles de hsa_miR_27a en un medio de cultivo celular tridimensional, véase la Figura 1].

55 Figura 3. La sobreexpresión de hsa_miR_27a interrumpe la formación de tubos *in vitro*. Se transfectaron HUVEC bien con un control pre-miR negativo (A) o con un precursor de hsa_miR_27a que permitió su sobreexpresión (B). Se sembraron las células de transfección después de 24 h en placas sobre Matrigel™ y se observaron durante un período de tiempo de 24 h. Las zonas en las que los tubos no fueron capaces de unirse y formar una red estable se indican con flechas blancas. Los tubos muy finos se indican mediante flechas negras. (C) Número de tubos capilares formados por campo de visión cuantificado. Los resultados mostrados son la media de cuatro estirpes de HUVEC independientes \pm ETM. *, p < 0,05 control frente a miR_27a.

60 Figura 4. La sobreexpresión de hsa_miR_27a altera la permeabilidad de las células endoteliales. Se sembraron HUVEC transpocillos 24 después de la transfección con bien un control de pre-miARN o precursor de hsa_miR_27a, y se midió la permeabilidad 24 horas más tarde. La permeabilidad se da como la cantidad de FITC-dextrano que pasa de la cámara superior a la cámara inferior (normalizada con respecto al control). Los resultados que se muestran son la media de cinco estirpes de HUVEC independientes \pm ETM. *Control frente a miR-27a, prueba t: p < 0,05.

Figura 5. (A) Expresión de hsa_miR27a en células endoteliales neoangiogénicas (neo) y células endoteliales de vénulas (vénula), obtenidas de un paciente humano con carcinoma hepatocelular. Datos expresados con respecto a la media de Ct ($2^{\Delta\Delta Ct}$). (B) Se aisló ARN de células endoteliales bien de vénulas o vasos neoangiogénicos (Neo) de pacientes con cirrosis (i, ii e iii). Se cuantificaron los niveles de expresión de miR_27a mediante Q-PCR y se normalizaron con respecto a miR-520d*. Los datos representan la media de las reacciones de Q-PCR cuadruplicadas \pm ETM *, $p < 0,05$ vénulas frente a Neo.

Figura 6. La sobreexpresión de miR_27a reduce la formación *in vivo* de tubos capilares. Se implantaron en ratones C57BL/6 por vía subcutánea tapones de Matrigel que contenían 0,5 μ g de FGF-2 y bien 90 μ g de control (C) o mimético de miR_27a o vehículo solamente (V). (A) Cortes histológicos representativos y cortes transversales teñidos con hematoxilina y eosina para vehículo (i), control (ii) y miR_27a (iii). Barra de escala: 20 μ m. (B) Número de vasos que contienen eritrocitos cuantificados. Los datos se expresan como la media \pm ETM. (C) inmunohuímica de CD31 representativa del tapón de Matrigel. Barra de escala: 50 μ m. (D) Número de células positivas en CD31 cuantificadas. Los datos se expresan como la media \pm ETM. Se comparó el análisis estadístico de las diferencias por ANOVA de una vía con la corrección de Bonferroni para las comparaciones múltiples. Para el control, $n = 3$ ratones, y para miR_27a y vehículo, $n = 6$ ratones. Los experimentos se llevaron a cabo en dos días separados usando dos lotes separados de miméticos de miARN.

Las secuencias de nucleótidos de miARN desveladas en el presente documento se exponen en las SEQ ID NO: 1 a 18. Las secuencias de nucleótidos de los oligonucleótidos antisentido ilustrativos complementarios a las secuencias de miARN de SEQ ID NO: 1 a 18 se exponen en las SEQ ID NO: 19 a 36. La secuencia que representa la región semilla de miARN de miR_27a y miR_27b se expone en la SEQ ID NO: 37.

Descripción detallada de la invención

El término "anómalo/a" cuando se usa en el presente documento en relación con la angiogénesis significa angiogénesis no deseada o regulada de manera inapropiada. Así pues, la angiogénesis anómala puede estar regulada positivamente o ser excesiva con respecto a la angiogénesis regulada de manera normal, o como alternativa puede estar regulada negativamente, alterada o suprimida con respecto a la angiogénesis regulada de manera normal. En cada caso, la alteración o anomalía en la angiogénesis puede ser cuantitativa, temporal y/o espacial. Es decir, en caso de la angiogénesis regulada positivamente o excesiva, por ejemplo, la angiogénesis puede ocurrir a un nivel anormalmente alto, ocurrir en un momento en el que la angiogénesis no ocurriría normalmente y/o ocurrir en un tejido o lugar en el que la angiogénesis normalmente no ocurriría. De manera similar, en caso de una angiogénesis alterada o suprimida, una capacidad del tejido o del organismo para inducir o iniciar la angiogénesis puede verse afectada de manera que la angiogénesis no pueda ocurrir a niveles suficientes y/o ocurrir en las circunstancias requeridas (tiempo y/o ubicación) para mantener un estado saludable normal.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "actividad" en lo que respecta a una proteína, a un polipéptido o a un polinucleótido significa cualquier función, acción, efecto o influencia celular ejercido por la proteína, por el polipéptido o por el polinucleótido, ya sea por una secuencia de ácido nucleico o fragmento de la misma, o por la propia proteína o el propio polipéptido o cualquiera de sus fragmentos.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "antagonista" se refiere a cualquier agente capaz de bloquear o inhibir la expresión y/o la actividad de una molécula de miARN. De este modo, el antagonista puede funcionar para impedir la transcripción o el procesamiento posterior a la transcripción del miARN o inhibir de otro modo la actividad del miARN de cualquier manera, ya sea por acción directa o indirecta. El antagonista puede ser, por ejemplo, ácido nucleico, péptido, cualquier otro compuesto o molécula química adecuado(a) o cualquier combinación de los mismos. Además, se entenderá que al afectar indirectamente a la actividad del miARN, el antagonista puede afectar a la actividad de otras moléculas celulares que, a su vez, puedan actuar como reguladores de la expresión de la actividad del propio miARN. De manera similar, el antagonista puede efectuar la actividad de moléculas que están sujetas a regulación o modulación por el miARN.

Como se usa en el presente documento, la expresión "asociado/a con" cuando se usa en el contexto de una enfermedad o afección "asociada con" la angiogénesis anómala significa que la enfermedad o la afección puede deberse a, dar lugar a, estar caracterizada por o estar asociada de otro modo con la angiogénesis anómala. Por lo tanto, la asociación entre la enfermedad o la afección y la angiogénesis anómala puede ser directa o indirecta y puede estar separada temporalmente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" incluye dentro de su significado una cantidad o dosis no tóxica, pero suficiente, de un agente o un compuesto para proporcionar el efecto deseado. La cantidad o dosis exacta requerida variará de un sujeto a otro dependiendo de factores tales como la especie que se está tratando, la edad y estado general del sujeto, la gravedad de la afección que se está tratando, el agente que se administra en particular y el modo de administración, etcétera. Por lo tanto, no es posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, para cualquier caso dado, un experto habitual en la materia puede determinar una "cantidad eficaz" apropiada usando solo experimentación de rutina.

Se entenderá que, como se usa en el presente documento, el término "expresión" puede referirse a la expresión de un polipéptido o de una proteína, o a la expresión de un polinucleótido o de gen, dependiendo del contexto. El polinucleótido puede ser codificante o no codificante (por ejemplo, miARN). La expresión de un polinucleótido se puede determinar, por ejemplo, midiendo la producción de niveles de transcripción de ARN. La expresión de una proteína o de un polipéptido se puede determinar, por ejemplo, mediante inmunoensayo usando uno o varios anticuerpos que se une/n con el polipéptido.

Como se usa en el presente documento, la expresión "especies de miARN" se refiere a un microARN de una secuencia de nucleótidos específica. Las expresiones "especies de miARN", "miARN" y "molécula de miARN" se pueden usar indistintamente en el presente documento. Los expertos en la materia reconocerán que la referencia a un miARN o a una molécula de miARN no significa una sola molécula (numérica), sino más bien un solo tipo o especie de molécula.

Como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido" se refiere a una secuencia monocatenaria de bases ribonucleotídicas o desoxirribonucleotídicas, análogos conocidos de nucleótidos naturales o mezclas de los mismos. Un "oligonucleótido" comprende una molécula basada en ácido nucleico que incluye ADN, ARN, PNA, LNA o cualquier combinación de los mismos. Un oligonucleótido que comprende predominantemente bases ribonucleotídicas, naturales o no naturales, se puede denominar un oligonucleótido de ARN. Los oligonucleótidos son normalmente secuencias cortas (por ejemplo, menos de 50 nucleótidos de longitud) que pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, síntesis química directa o clonación y restricción de secuencias apropiadas. Los "oligonucleótidos antisentido" son oligonucleótidos complementarios a una secuencia específica de ADN o ARN. Por lo general, en el contexto de la presente invención, un oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido de ARN complementario a un miARN específico. El oligonucleótido antisentido se une y silencia o reprime, parcial o completamente, la actividad de su miARN complementario. No todas las bases de un oligonucleótido antisentido necesitan ser complementarias a la secuencia "diana" o de miARN; el oligonucleótido solo necesita contener suficientes bases complementarias para permitir que el oligonucleótido reconozca la diana.

Un oligonucleótido también puede incluir bases adicionales. La secuencia de oligonucleótidos antisentido puede ser una secuencia ribonucleotídica sin modificar o puede modificarse químicamente o conjugarse mediante una variedad de medios como se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" se refiere a un polímero monocatenario o bicatenario de bases desoxirribonucleotídicas, ribonucleotídicas o análogos conocidos de nucleótidos naturales o mezclas de los mismos. Un "polinucleótido" comprende una molécula basada en ácido nucleico que incluye ADN, ARN, PNA, LNA o cualquier combinación de los mismos. El término incluye la referencia a la secuencia específica, así como a la secuencia complementaria a la misma, a menos que se indique lo contrario. Los polinucleótidos pueden modificarse químicamente mediante una variedad de medios conocidos por los expertos en la materia. Así pues, un "polinucleótido" comprende una molécula basada en ácido nucleico que incluye ADN, ARN, PNA, LNA o cualquier combinación de los mismos.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a mamíferos e incluye seres humanos, primates, animales de ganado (por ejemplo, ovejas, cerdos, ganado, caballos, burros), animales de laboratorio (por ejemplo, ratones, conejos, ratas, cobayas) animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos) y animales salvajes en cautiverio (por ejemplo, zorros, canguros, ciervos). Preferentemente, el mamífero es un ser humano o un animal de ensayo de laboratorio. Incluso más preferentemente, el mamífero es un ser humano.

Como se usan en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento", "prevenir" y "prevención" se refieren a todos y cada uno de los usos que remedian una afección o sus síntomas, previenen el establecimiento de una afección o enfermedad, o previenen, obstaculizan, retardan o revierten la progresión de una afección o enfermedad u otros síntomas no deseados de cualquier manera. Por lo tanto, los términos "tratar" y "prevenir" y similares deben considerarse en su contexto más amplio. Por ejemplo, el tratamiento no implica necesariamente que un paciente sea tratado hasta su recuperación total. En las afecciones que presentan o se caracterizan por múltiples síntomas, el tratamiento o la prevención no necesariamente tiene que remediar, prevenir, obstaculizar, retardar o revertir la totalidad de dichos síntomas, sino que puede prevenir, obstaculizar, retrasar o revertir uno o más de dichos síntomas.

Como se ilustra en el presente documento, los inventores han determinado que el nivel de expresión de un grupo de miARN específicos se regula negativamente de forma rápida y significativa tras la inducción de condiciones angiogénicas en cultivo celular. En el presente documento, se demuestra que la sobreexpresión de al menos uno de estos miARN inhibe la formación de vasos sanguíneos. Los hallazgos descritos en el presente documento ofrecen nuevas dianas terapéuticas para la modulación de la angiogénesis y vías para el tratamiento, la prevención y el diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas con la angiogénesis anómala.

El miARN descrito en el presente documento como regulado negativamente durante la angiogénesis incluye: miR_27a, miR_27b, miR_24, miR_23a, miR_23b, miR_20a, miR_21, miR_29a, miR_29b, miR_29c, miR_106a, miR_126, miR_193a, miR_195, miR_197, miR_221, miR_347 y miR_126*.

Estos hallazgos son sorprendentes, pues los estudios de Kuehbacher *et al.* (Circulation Research, vol. 101, n.º 1, 6 de julio de 2007, pág. 59-68 y *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 29, n.º 1, 18 de diciembre de 2007, pág. 12-15) enseñan que miR-27b potencia la angiogénesis mediante la dirección de genes antiangiogénicos tales como tromboespondina-1. Mertens-Talcott *et al.* (*Cancer Research*, vol. 67, n.º 22, 15 de noviembre de 2007) y el documento WO 2009/017803 también enseñan que los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a miR-27a aumentan ZBTB10, lo que, a su vez, reduce la expresión de los genes angiogénicos tales como VEGF y VEGFR1, de nuevo, una enseñanza contraria a la presente invención.

En aspectos particulares, la presente invención proporciona métodos y agentes para la inhibición de la angiogénesis y para el tratamiento o la prevención de afecciones asociadas con la angiogénesis excesiva o no regulada. Los métodos pueden comprender la administración de uno o más miARN, comprendiendo al menos uno de ellos una región semilla que comprende la secuencia UCACAGU (SEQ ID NO: 37), precursores o variantes de la misma.

Preferentemente, dicho miARN que comprende la región semilla UCACAGU es miR_27a.

La administración puede realizarse directamente a un sujeto que necesite tratamiento, o puede ser una administración *ex vivo* a células o tejido derivados del sujeto. Los miARN que se vayan a administrar pueden producirse sintéticamente o derivarse de manera natural de una fuente celular. Por lo general, el miARN puede derivarse de la especie del sujeto que se vaya a tratar, o constituir una secuencia idéntica al miARN de esa especie.

Por lo tanto, normalmente cuando el sujeto es un ser humano, el miARN será secuencias de miARN derivadas de ser humano. Las realizaciones desveladas en el presente documento contemplan la administración de miARN maduro, sus precursores o variantes, o agentes capaces de modular la expresión o actividad de dicho miARN. Los precursores incluyen moléculas de pri-miARN y pre-miARN que se pueden procesar en el miARN activo maduro intracelularmente. Las variantes incluyen secuencias de nucleótidos que son esencialmente similares a las secuencias de miARN desveladas en el presente documento. Por lo general, las secuencias variantes poseerán una actividad biológica cualitativa en común. Las variantes pueden comprender restos alterados en una o más ubicaciones y pueden compartir, por ejemplo, identidad de secuencia del 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Como alternativa o además, las variantes pueden comprender modificaciones, tales como restos no naturales en una o más posiciones.

Las secuencias de nucleótidos del miARN humano (hsa) y de rata (rno) desveladas en el presente documento se muestran en SEQ ID NO: 1 a 18. La correspondencia entre la designación de miARN y SEQ ID NO se da en la Tabla 2 en el Ejemplo 1. Se puede encontrar más información de secuencias para estos miARN, incluyendo la ubicación genómica, en <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>.

La invención también proporciona antagonistas de estos miARN y sus usos. En aspectos particulares, la presente invención proporciona métodos y agentes para la potenciación de la angiogénesis y para el tratamiento o la prevención de afecciones asociadas con la angiogénesis alterada o suprimida. Los métodos pueden comprender la administración de antagonistas de uno o más miARN, comprendiendo al menos uno de los miARN una región semilla que comprende la secuencia UCACAGU (SEQ ID NO: 37), o siendo el miARN miR_27a.

Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que los antagonistas adecuados para su uso de acuerdo con las realizaciones desveladas en el presente documento pueden adoptar una variedad de formas. El antagonista puede ser una construcción antisentido que comprenda una secuencia de nucleótidos específica de un miARN de la invención, o una parte de la misma, en el que la construcción antisentido inhibe, al menos parcialmente, la expresión o la actividad del miARN. Por "específico" se entiende que la construcción antisentido es esencialmente específica del miARN, pero no necesariamente exclusivamente. Es decir, siendo específica de una determinada secuencia de miARN, la construcción antisentido también puede hibridarse de forma cruzada con otras secuencias, tales como otros miARN suficientes para inhibir la expresión. Además, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de una construcción antisentido de acuerdo con la presente invención puede mostrar menos del 100 % de identidad de secuencia con un determinado miARN y conservar su especificidad. Los expertos en la materia apreciarán que las construcciones antisentido adecuadas no necesitan unirse directamente con el miARN hacia el que se dirigen para efectuar la expresión o actividad de esos miARN. La unión de una construcción antisentido a su secuencia de nucleótidos celular complementaria puede interferir con la transcripción, con el procesamiento de ARN, con el transporte y/o con la estabilidad del miARN para el que es específica. Una molécula antisentido puede comprender ADN, ARN, LNA, PNA o cualquier combinación de los mismos.

Las construcciones antisentido adecuadas para su uso de acuerdo con las realizaciones desveladas en el presente documento incluyen, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, ARN de interferencia pequeños (ARNip) y construcciones de ácido nucleico antisentido catalíticas. Los oligonucleótidos antisentido adecuados pueden prepararse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Por lo general, los oligonucleótidos se sintetizarán químicamente en sintetizadores automatizados. A modo de ejemplo no limitante, las secuencias de oligonucleótidos antisentido particulares específicos de los miARN desvelados en el presente documento se muestran en SEQ ID NO: 19 a 36. El miARN para el que estos oligonucleótidos son específicos se indica en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1: SEQ ID NO para los miARN desvelados en el presente documento y los correspondiente oligonucleótidos antisentido ilustrativos

SEQ ID NO		SEQ ID NO	
miARN	Oligonucleótido antisentido	miARN	Oligonucleótido antisentido
1	19	10	28
2	20	11	29
3	21	12	30
4	22	13	31
5	23	14	32
6	24	15	33
7	25	16	34
8	26	17	35
9	27	18	36

Estos oligonucleótidos ilustrativos son 100 % complementarios a sus respectivos miARN, aunque los expertos en la materia apreciarán fácilmente que se pueden realizar uno o más cambios de base de manera que exista una complementariedad inferior al 100 %, mientras que el oligonucleótido conserva la especificidad hacia su miARN y conserva la actividad antagonista contra este miARN. Además, como se describe a continuación, las secuencias de oligonucleótidos pueden incluir una o más modificaciones químicas sin apartarse del alcance de la presente invención.

Los oligonucleótidos de acuerdo con la invención pueden incluir modificaciones diseñadas para mejorar su liberación en células, su estabilidad una vez dentro de una célula y/o su unión a la diana de miARN apropiada. Por ejemplo, la secuencia de oligonucleótidos puede modificarse mediante la adición de uno o más enlaces fosforotioato (por ejemplo, fosforomonotioato o fosforditioato) entre restos de la secuencia, o la inclusión de uno o anillos de morfolina en la estructura principal. Los enlaces no fosfato alternativos entre los restos incluyen los enlaces fosfonato, hidroxamina, hidroxilhidrazinilo, amida y carbamato (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. n.º 20060287260, Manoharan I.), metilfosfonatos, fosfortiolatos, fosforamidatos o derivados de boro. Los restos de nucleótidos presentes en el oligonucleótido pueden ser nucleótidos naturales o pueden ser nucleótidos modificados. Los nucleótidos modificados adecuados incluyen nucleótidos 2'-O-metilo, tales como 2'-O-metil-adenina, 2'-O-metil-uracilo, 2'-O-metil-timina, 2'-O-metil-citosina, 2'-O-metil-guanina, 2'-O-metil-2-amino-adenina; 2-amino-adenina, 2-amino-purina, inosina; nucleótidos propinilo tales como 5-propinil-uracilo y 5-propinil-citosina; 2-tio-timidina; bases universales tales como 5-nitro-indol; ácido nucleico bloqueado (LNA) y ácido nucleico peptídico (PNA). Se puede reemplazar el resto de azúcar ribosa que se produce de forma natural en ribonucleósidos, por ejemplo, con un azúcar hexosa, un anillo de heteroalquilo policíclico o un grupo ciclohexenilo como se describe en la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. n.º 20060035254, Manoharan *et al.* Como alternativa, o además, la secuencia oligonucleotídica puede conjugarse con uno o más restos químicos adecuados en uno o ambos extremos. Por ejemplo, el oligonucleótido puede conjugarse con colesterol a través de un enlace adecuado tal como un enlace de hidroxiprolinol en el extremo 3'.

La síntesis de oligonucleótidos modificados con actividad de "silenciamiento" contra miARN específico ("anti-miR") se describe en Krutzfeldt, J. *et al.*, 2005, *Nature* 438:685-689. Por ejemplo, Krutzfeldt *et al.* desvelan las secuencias de anti-miR que comprenden nucleótidos 2-O-metilo, enlaces fosforotioato entre los restos en el extremo 5' y 3', y un resto de colesterol conjugado a través de un enlace hidroxiprolinol en el extremo 3'. Las realizaciones desveladas en el presente documento contemplan el uso de anti-miR modificados de la manera descrita en Krutzfeldt *et al.*, así como las modificaciones o variaciones de los mismos. El diseño de oligonucleótidos o anti-miR para su uso de acuerdo con las realizaciones desveladas en el presente documento está dentro de las capacidades de los expertos en la materia.

Se puede usar una tecnología antisentido alternativa, conocida como interferencia de ARN (ARNi), véase, por ejemplo, Chuang *et al.* (2000) *PNAS* EE.UU. 97: 4985), de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Fire *et al.* (1998) *Nature* 391: 806-811; Hammond, *et al.* (2001) *Nature Rev, Genet.* 2: 110-1119; Hammond *et al.* (2000) *Nature* 404: 293-296; Bernstein *et al.* (2001) *Nature* 409: 363-366; Elbashir *et al.* (2001) *Nature* 411: 494-498; documentos WO 99/49029 y WO 01/70949), para inhibir la expresión o la actividad de miARN. ARNi se refiere a un medio de silenciamiento de genes posterior a la transcripción, selectivo de la destrucción de ARN específico por pequeñas moléculas de ARN interferentes (ARNip). El ARNip se genera mediante la escisión de ARN bicatenario, donde una cadena es idéntica al mensaje que se va a inactivar. Se pueden sintetizar moléculas de ARN bicatenario en las que una cadena es idéntica a una región específica de la transcripción de miARN y se introduce directamente.

Como alternativa, se puede emplear el ADNbc correspondiente, que, una vez presentado intracelularmente, se convierte en ARNbc. Los métodos de síntesis de moléculas adecuadas para su uso en ARNi y para lograr el silenciamiento génico posterior a la transcripción son conocidos por los expertos en la materia.

Un medio adicional de inhibición de la expresión o actividad de miARN al que se refiere la invención se puede realizar introduciendo construcciones catalíticas de ácido nucleico antisentido, tales como ADNzimas y ribozimas,

que son capaces de escindir productos de la transcripción de miARN. Las ribozimas, por ejemplo, están dirigidas a, o se hibridan con, una determinada secuencia, en virtud de dos regiones de complementariedad de secuencia con la diana que flanquea el sitio catalítico de ribozima. Tras la unión, la ribozima escinde la diana de una manera específica del sitio. El diseño y ensayo de ribozimas que reconocen y escinden específicamente las secuencias de miARN se pueden realizar mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la materia (por ejemplo, Lieber y Strauss, (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15:540-551).

Los expertos en la materia también reconocerán que un antagonista de acuerdo con realizaciones de la invención puede efectuar un modulador o regulador de la expresión o actividad de un miARN desvelado en el presente documento. De forma similar, el antagonista puede efectuar una diana de un miARN desvelado en el presente documento. De este modo, los antagonistas pueden adoptar cualquier forma adecuada, dependiendo de la naturaleza e identidad de la/s molécula/s que se van a afectar, tales como, por ejemplo, un inhibidor de molécula pequeña, un inhibidor de péptido o un anticuerpo.

Las realizaciones de la presente invención se refieren a métodos y a composiciones para el tratamiento de enfermedades y afecciones asociadas con la angiogénesis anómala, como se define en el presente documento. La angiogénesis anómala puede ser excesiva o no regulada, o puede ser alterada o suprimida. Por lo tanto, dichos tratamientos normalmente se diseñan para modular la angiogénesis con el fin de normalizar el nivel, el tiempo y/o la ubicación de la angiogénesis y así tratar o retrasar la progresión de la enfermedad o afección. Las realizaciones de la invención también contemplan métodos para la prevención de enfermedades y afecciones asociadas con la angiogénesis anómala, normalmente en un sujeto predispuesto a dicha enfermedad o afección, o, de otro modo, en riesgo de desarrollar dicha enfermedad o afección.

Los expertos en la materia apreciarán fácilmente el alcance completo de enfermedades y afecciones que pueden estar asociadas con la angiogénesis anómala y a las que pueden dirigirse las realizaciones de la invención. A modo de ejemplo no limitante, las enfermedades y afecciones asociadas con la angiogénesis excesiva o regulada positivamente, y por lo tanto, en las que se puede desear la inhibición de la angiogénesis de acuerdo con realizaciones de la invención, incluyen cáncer (tumores sólidos y hematológicos), enfermedades cardiovasculares tales como aterosclerosis y restenosis, trastornos inflamatorios crónicos tales como artritis reumatoide y enfermedad de Crohn, trastornos oculares tales como retinopatía diabética, glaucoma y degeneración macular (incluyendo degeneración macular relacionada con la edad), endometriosis, soriasis y adiposidad. De igual manera, como ejemplo no limitante, las circunstancias en las que se pueda desear la potenciación de la angiogénesis de acuerdo con realizaciones de la invención incluyen la cicatrización de heridas, tal como el tratamiento de heridas isquémicas, en el tratamiento de algunos trastornos ginecológicos e infertilidad, en el tratamiento de la enfermedad de las arterias coronarias, en la prevención de ictus, en la reparación o regeneración de tejidos y en la ingeniería de tejidos.

En el caso de la ingeniería de tejidos, la generación de grandes volúmenes de tejido requiere una vascularización rápida de construcciones de armazón tridimensionales. El papel de miR_27a en la angiogénesis en un medio tridimensional, como se ilustra en el presente documento, sugiere la posible aplicación de la inhibición de miARN tal como miR_27a en la potenciación de la angiogénesis en armazones de obtención de tejido mediante ingeniería genética.

De acuerdo con realizaciones de la invención, el miARN y sus antagonistas administrados para conseguir la inhibición o potenciación de la angiogénesis pueden administrarse en cualquier forma adecuada. Por lo general, se administrarán como composiciones farmacéuticas, cuyas composiciones pueden comprender uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones pueden administrarse en cualquier vía conveniente o adecuada, tal como a través de la vía parenteral, oral, nasal o tópica. Así pues, las composiciones se pueden formular en una variedad de formas adecuadas para la vía de administración escogida, por ejemplo, como cápsulas, comprimidos, comprimidos oblongos, elixires para la ingestión oral, en forma de aerosol adecuada para la administración por inhalación (tal como por inhalación intranasal o inhalación oral), pomada, crema o loción adecuada para la administración tópica, o en una formulación inyectable adecuada para la administración parenteral, tal como la inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa. La vía de administración preferida dependerá de una serie de factores que incluyen la afección que se vaya a tratar y el resultado deseado. La vía más ventajosa para cualquier circunstancia dada puede ser determinada por los expertos en la materia.

Se entenderá que el nivel de dosis específico de una composición para cualquier individuo en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen, por ejemplo, la actividad de los agentes específicos empleados, la edad, el peso corporal, la salud general y la dieta del individuo que se vaya a tratar, el momento de la administración, la tasa de excreción y la combinación con cualquier otro tratamiento o terapia. Pueden llevarse a cabo administraciones únicas o múltiples con niveles de dosis y patrón seleccionados por el médico tratante.

Los ejemplos de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables son agua desmineralizada o destilada; solución salina; aceites de base vegetal tales como aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceites de sésamo tales como aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo, aceite de cacahuete o aceite de coco; aceites de silicona, incluyendo polisiloxanos, tales como metil-polisiloxano, fenil-polisiloxano y metilfenil-

polisilpoxano; siliconas volátiles; aceites minerales tales como parafina líquida, parafina blanda o escualano; derivados de celulosa tales como metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica o hidroxipropilmetilcelulosa; alcanos inferiores, por ejemplo, etanol o isopropanol; aralcanos inferiores; polialquilenglicoles inferiores o alquilenglicoles inferiores, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, etilenglicol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol o glicerina; ésteres de ácidos grasos tales como palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo u oleato de etilo; polivinilpiridona; agar; carragenano; goma de tragacanto o goma arábiga y vaselina. Por lo general, el vehículo o los vehículos formarán del 10 % al 99,9 % en peso de las composiciones.

Las composiciones pueden estar en una forma adecuada para la administración parenteral o en forma de una formulación adecuada para la ingestión oral (tales como cápsulas, comprimidos, comprimidos oblongos, elixires, por ejemplo).

Algunos ejemplos de vehículos, diluyentes, excipientes y adyuvantes adecuados para un uso oral incluyen aceite de cacahuete, parafina líquida, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, alginato sódico, goma arábiga, goma tragacanto, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, gelatina y lecitina. Además, estas formulaciones orales pueden contener agentes aromatizantes y colorantes adecuados. Cuando se usan en forma de cápsulas, las cápsulas pueden recubrirse con compuestos tales como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, que retardan la desintegración. Los adyuvantes normalmente incluyen emolientes, emulsionantes, agentes espesantes, conservantes, bactericidas y agentes de tamponamiento. Para la administración como una solución o suspensión inyectable, los diluyentes o vehículos no tóxicos aceptables por vía parenteral pueden incluir solución de Ringer, solución salina isotónica, solución salina tamponada con fosfato, etanol y 1,2-propilenglicol.

Las formas sólidas para la administración oral pueden contener aglutinantes aceptables en la práctica farmacéutica humana y veterinaria, edulcorantes, agentes desintegrantes, diluyentes, aromatizantes, agentes de recubrimiento, conservantes, lubricantes y/o agentes retardantes en el tiempo. Los aglutinantes adecuados incluyen goma arábiga, gelatina, almidón de maíz, goma tragacanto, alginato de sodio, carboximetilcelulosa o polietilenglicol. Los edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, glucosa, aspartamo o sacarina. Los agentes desintegrantes adecuados incluyen almidón de maíz, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma de guar, goma de xantano, bentonita, ácido algínico o agar. Los diluyentes adecuados incluyen lactosa, sorbitol, manitol, dextrosa, caolín, celulosa, carbonato cálcico, silicato cálcico o fosfato dicálcico. Los agentes aromatizantes adecuados incluyen aceite de menta, aceite de gaulteria, y aroma de cereza, naranja o frambuesa. Los agentes de recubrimiento adecuados incluyen polímeros o copolímeros de ácido acrílico y/o ácido metacrílico y/o sus ésteres, ceras, alcoholes grasos, zeína, goma laca o gluten. Los conservantes adecuados incluyen benzoato de sodio, vitamina E, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno o bisulfito sódico. Los lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, oleato sódico, cloruro sódico o talco. Los agentes retardantes en el tiempo adecuados incluyen monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las formas líquidas para la administración oral pueden contener, además de los agentes anteriores, un vehículo líquido. Los vehículos líquidos adecuados incluyen agua, aceites tales como aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de cacahuete, aceite de coco, parafina líquida, etilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol, etanol, propanol, isopropanol, glicerol, alcoholes grasos, triglicéridos o mezclas de los mismos.

Las suspensiones para la administración oral pueden comprender además agentes dispersantes y/o agentes de suspensión. Los agentes de suspensión adecuados incluyen carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, alginato sódico o alcohol acetílico. Los agentes dispersantes adecuados incluyen lecitina, ésteres de polioxietileno de ácidos grasos tales como ácido esteárico, mono- o di-oleato, -estearato o -laurato de polioxietileno-sorbitol, mono- o di-oleato, -estearato o -laurato de polioxietilensorbitano, y similares.

Las emulsiones para la administración oral pueden comprender además uno o más agentes emulsionantes. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen agentes dispersantes como los ilustrados anteriormente o gomas naturales tales como goma guar, goma arábiga o goma tragacanto.

Los métodos de preparación de composiciones administrables por vía parenteral son evidentes para los expertos en la materia, y se describen con más detalle en, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Science", 15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa.

La composición puede incorporar cualquier tensioactivo adecuado tal como un tensioactivo aniónico, catiónico o no iónico tal como ésteres de sorbitano o derivados de polioxietileno de los mismos. También se pueden incluir agentes de suspensión tales como gomas naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos tales como sílices silíceas y otros ingredientes tales como lanolina.

Los miARN y sus antagonistas se pueden administrar en forma de liposomas. En general, los liposomas se derivan de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas, y están formados por cristales líquidos hidratados mono- o multilamelares que se dispersan en un medio acuoso. Se puede usar cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y

metabolizable capaz de formar liposomas. Las composiciones en forma de liposomas pueden contener estabilizantes, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticas. Los métodos de formación de liposomas son conocidos en la técnica, y en relación con los mismos, se hace referencia específica a: Prescott, Ed., "Methods in Cell Biology", volumen XIV, Academic Press, Nueva York, N.Y. (1976), pág. 33 y siguientes. Los agentes también se pueden administrar en forma de micropartículas. Por ejemplo, pueden usarse micropartículas biodegradables formadas a partir de polilactida (PLA), polilactida-co-glicolida (PLGA) y épsilon-caprolactona (ϵ -caprolactona).

La solicitud también describe formulaciones encapsuladas para proteger agentes polinucleotídicos y oligonucleotídicos contra la eliminación rápida del organismo, tal como a través de formulaciones de liberación controlada y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos de preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia.

Se pueden administrar miARN y construcciones antisentido tales como oligonucleótidos antisentido a un sujeto en un vector. El vector puede ser un vector plasmídico, un vector viral o cualquier otro vehículo adecuado adaptado para la inserción y secuencias foráneas y la introducción en células eucariotas. Preferentemente, el vector es un vector de expresión capaz de dirigir la transcripción de la secuencia de ADN de una molécula antisentido de la invención al ARN. Los vectores de expresión víricos preferidos incluyen, por ejemplo, vectores basados en el virus de Epstein-Barr, virus del papiloma bovino, adenovirus y adeno-asociados. En una realización particular, el vector es episomal. El uso de un vector episomal adecuado proporciona un medio de mantenimiento de la molécula antisentido en las células diana requeridas en alto número de copias a nivel extracromosómico, eliminando así los posibles efectos de la integración cromosómica.

En el tratamiento o en la prevención de enfermedades y afecciones, la presente invención contempla la administración de múltiples miARN y/o múltiples antagonistas de miARN. Los expertos en la materia pueden determinar si es adecuado o deseable administrar uno o más miARN, uno o más antagonistas de miARN u, opcionalmente, tanto miARN como antagonistas de miARN caso por caso. La invención también contempla terapias de combinación, en las que los agentes descritos en el presente documento se administran junto con otros agentes adecuados que pueden facilitar el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Por ejemplo, en el contexto del cáncer, se puede tratar de mantener terapias anticancerígenas en curso tales como quimioterapia y/o radioterapia, con el fin de tratar la afección del paciente, mejorar el control local del tumor y/o reducir el riesgo de metástasis, empleando a la vez agentes de acuerdo con realizaciones de la presente invención. Por "administración conjunta" se entiende la administración simultánea en la misma formulación o en dos formulaciones diferentes a través de las mismas o diferentes vías, o la administración secuencial por las mismas o diferentes vías. Por administración "secuencial" se entiende una diferencia en el tiempo, por ejemplo, de segundos, minutos, horas, días, semanas o meses entre la administración de las dos formulaciones o terapias. Las formulaciones o terapias se pueden administrar en cualquier orden.

El solicitante también describe el uso de miARN desvelados en el presente documento para el diagnóstico o la determinación de la predisposición a enfermedades y afecciones asociadas con la angiogénesis anómala. Dicho método de diagnóstico de una enfermedad o afección asociada a una angiogénesis anómala en un sujeto, o de determinación de la predisposición de un sujeto a dicha enfermedad o afección comprende:

(a) obtener una muestra biológica del sujeto; y
(b) determinar el nivel de expresión de al menos un miARN, o uno de sus precursores o variantes en la muestra, miARN

(i) que comprende una región semilla que comprende la secuencia UCACAGU (SEQ ID NO: 37), o
(ii) que se selecciona del grupo que consiste en miR_27a, miR_27b, miR_24, miR_23a, miR_23b, miR_20a, miR_21, miR_29a, miR_29b, miR_29c, miR_106a, miR_126, miR_193a, miR_195, miR_197, miR_221, miR_347 y miR_126*,

en el que el nivel de expresión de al menos un miARN es indicativo de una enfermedad o afección asociada a una angiogénesis anómala, o una predisposición a la misma, en el sujeto.

El miARN y los antagonistas del mismo descritos en el presente documento también se pueden usar para la detección e identificación de moléculas y compuestos que interactúan con el miARN desvelado en el presente documento, incluyendo dianas de ácidos nucleicos y polipéptidos endógenos de estos miARN. Dichas dianas pueden ser reguladas por el miARN, pueden regular el miARN y/o pueden ejercer un efecto sobre otras moléculas celulares o procesos implicados en la angiogénesis. Así pues, dichas moléculas y compuestos pueden ofrecer nuevas dianas terapéuticas. Por "regular" se entiende regulación o modulación (bien positiva o negativa) de la actividad o la expresión. Así pues, por ejemplo, una molécula o un compuesto puede inducir, potenciar, activar, aumentar, inhibir o prevenir la actividad o la expresión de otra/s molécula/s o compuesto/s. Las moléculas y los compuestos adecuados pueden ejercer su efecto en virtud de una interacción directa (por ejemplo, de unión) o

indirecta. Las moléculas y los compuestos que se unen, o interactúan de otra manera, con el miARN desvelado en el presente documento pueden identificarse mediante una variedad de métodos adecuados conocidos por los expertos en la materia.

5 El solicitante también describe kits para su uso de acuerdo con los métodos de la invención. Por ejemplo, los kits pueden contener oligonucleótidos que representan los miARN desvelados en el presente documento y/o antagonistas de los mismos, tales como moléculas antisentido específicas de estos miARN. Dichos kits pueden usarse, por ejemplo, para detectar la presencia de miARN en una muestra biológica y/o detectar dianas moleculares o parejas de unión de dicho miARN. La detección usando dichos kits es útil para una variedad de fines, incluyendo, pero sin limitación, el diagnóstico de enfermedades, estudios epidemiológicos y la realización de los métodos de selección de la presente invención. Además, los kits pueden contener medios para detectar la unión de un miARN de la invención a una pareja de unión. Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden conjugarse con un sustrato detectable tal como un compuesto fluorescente, radiactivo o luminiscente, que permita su detección en ensayos conocidos por los expertos en la materia. Los kits también pueden incluir otros componentes necesarios para realizar los métodos de la presente invención, tales como tampones y/o diluyentes. Los kits normalmente incluyen recipientes para alojar los diversos componentes e instrucciones de uso de los componentes del kit en los métodos de la presente invención.

20 La referencia en la presente memoria descriptiva a cualquier publicación previa (o información derivada de la misma), o a cualquier asunto que se conozca, no se toma ni se debe tomar como un reconocimiento ni como una admisión ni como ninguna forma que sugiera que esa publicación previa (o información derivada de la misma) o materia conocida forme parte del conocimiento general común en el campo de trabajo al que se refiere la presente memoria descriptiva.

25 La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos específicos, que, en modo alguno, se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

30 Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención y, bajo ningún concepto, deben interpretarse como limitantes de la naturaleza general de la divulgación de la descripción a lo largo de la presente memoria descriptiva.

Ejemplo 1 - Regulación de los miARN durante la angiogénesis

35 El análisis de micromatrices se realizó para determinar los patrones de expresión de miARN en condiciones angiogénicas en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). Las HUVEC se aislaron mediante tratamiento con colagenasa como se describe en Gamble *et al.*, 1993 (*J Cell Biol* 121:931-943). Las células se cultivaron en matraces de 25 cm² recubiertos con gelatina (Sigma) en medio de HUVEC (M199 con sales de Earles, HEPES 20 mM, suero fetal de ternera al 20 % (FCS, Cytosystems), bicarbonato sódico, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales, piruvato sódico, fungizona, penicilina y estreptomycin). Las células se cultivaron a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las HUVEC formaron una monocapa confluyente en un período de dos a cuatro días, y luego se recogieron mediante tratamiento con tripsina-EDTA y se transfirieron a un matraz de 75 cm² recubierto con gelatina. Se añadió suplemento de crecimiento endotelial (50 µg/ml, ECGS, Collaborative Research) y heparina (50 µg/ml, Sigma). Las células se pasaron (separación 1:2) cada tres o cuatro días y se usaron entre el paso dos y cuatro.

45 Para la inducción de una angiogénesis, se recogieron HUVEC y (i) se lisaron, (ii) se estimularon con PMA y AC11 y se lisaron, o (iii) se volvieron a sembrar después de la estimulación con PMA y AC11 en un gel de colágeno 3D.

50 Se realizaron micromatrices de miARN esencialmente como se describe en Thomson *et al.*, 2004 (*Methods Enzymol* 427:107-122). En resumen, se extrajo ARN usando Trizol (Invitrogen) y 5 µg marcado con 500 ng de dinucleótidos acoplados Cy3 o Cy5 (CU) en 1 x tampón Igloi (ATP 0,1 mM, HEPES 50 mM pH 7,8, DTT 3,5 mM, MgCl₂ 2 Mm, 10 mg/ml de BSA, DMSO al 10 %) usando 20 U de ARN ligasa de T4 (NEB). Se volvió a suspender el ARN marcado en tampón de hibridación (NaO₂HPO₄ 400 nM, BSA al 0,8 %, SDS al 5,0 %, formamida al 13 %) y se hibridó a micromatrices con aplicación puntual de sondas a 377 miARN (Conjunto de sondas de miARN 1564V1 mirVana™ de Ambion). Las hibridaciones competitivas se realizaron usando ARN de dos experimentos de estirpes de células HUVEC separados con los datos de estos replicados biológicos agrupados para cada punto de tiempo. Las matrices se exploraron usando un escáner GenePix 4000B dirigido por GenePixPro 4.0 (Molecular Devices). El análisis se realizó usando la programación estadística libremente disponible y el entorno gráfico R (<http://cran.r-project.org>). Los miARN que se expresaron diferencialmente se identificaron usando el enfoque empírico de Bayes, que clasifica los genes en una combinación de magnitud y coherencia de expresión diferencial (Smyth, 2004, *Stat Appl Genet Mol Biol* 3: artículo 3).

65 La Figura 1A muestra gráficos de volcán de miARN regulados diferencialmente en los puntos de tiempo entre 30 minutos y 24 horas después de la estimulación. Se representa gráficamente el logaritmo bayesiano de las posibilidades de la expresión diferencial frente al log₂ (expresión en el punto de tiempo dividida entre la expresión en

el tiempo cero). Se observó que un conjunto de 18 miARN se regularon negativamente de manera significativa, como se indica en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2. miARN regulado diferencialmente

miARN	A ¹	t ²	SEQ ID NO:
hsa_miR_27a	10,76	-24,09	1
hsa_miR_27b	9,327	-31,61	2
hsa_miR_24	11,62	-9,765	3
hsa_miR_23a	11,15	-10,38	4
hsa_miR_23b	10,62	-18,43	5
hsa_miR_20a	10	-15,73	6
hsa_miR_21	9,317	-36,25	7
hsa_miR_29a	9,769	-28,74	8
hsa_miR_29b	11,23	-21,49	9
hsa_miR_29c	9,223	-19,09	10
hsa_miR_106a	10,56	-7,238	11
hsa_miR_126	11,06	-20,89	12
hsa_miR_193a	9,953	-14,48	13
hsa_miR_195	9,424	-17,54	14
hsa_miR_197	9,467	-11,93	15
hsa_miR_221	10,12	-15,16	16
rno_miR_347	9,357	-15,02	17
hsa_miR_126*	9,886	-11,81	18
1 A = intensidad de la mancha en la micromatriz			
2 t = valor de probabilidad			

5

En la Figura 1B, se muestra la cuantificación de los niveles de expresión de uno de estos miARN, hsa_miR_27a. Se recogieron las HUVEC y bien se lisaron (t=0 sin estimulación) o se estimularon con PMA y AC11 y se lisaron (t=0 con estimulación) o se volvieron a sembrar después de la estimulación con PMA y AC11 en un gel de colágeno 3D durante 15 o 30 minutos. La regulación negativa de la expresión de miR_27a fue evidente en comparación con los niveles observados en las células que se separaron, pero no se estimularon o a los niveles en las células que se separaron, se estimularon, pero no se sembraron en el gel de colágeno. Sorprendentemente, como se muestra en la Figura 2, la regulación negativa de los niveles de expresión de hsa_miR_27a endógeno se observan solamente en un medio de cultivo celular tridimensional angiogénico inductor de la diferenciación en lugar de en un sistema de cultivo celular bidimensional convencional en las mismas condiciones.

15

Ejemplo 2 - La sobreexpresión de hsa_miR_27a inhibe la formación de vasos

Se investigó el efecto de la expresión de hsa_miR_27a en la formación de vasos en modelos de angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*.

20

Métodos generales

Transfección con moléculas de precursor de miARN pre-miR™

Se sembraron HUVEC a 6×10^5 células por matraz de 25 cm², y 24 h después se transfectaron con microARN sintéticos (moléculas de precursor de miARN Pre-miR™, Ambion) a una concentración final de 15 nM usando reactivo de transfección HiPerFect (Qiagen). Se recogieron el ARN total y la proteína bien a las 24 horas o 48 horas de la transfección. Se sembraron células HEK293 a 5×10^4 células en una placa de 24 pocillos y se transfectaron 24 horas más tarde con 50 ng de plásmido además de moléculas de microARN sintético a una concentración final de 15 nM. Los lisados celulares se prepararon 24 horas después de la transfección.

30

Extracción de ARN o PCR en tiempo real

Se aisló ARN total de HUVEC mediante extracción de Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN aislado se cuantificó posteriormente usando el espectrofotómetro NanoDrop a 260 nm. Para el análisis del ARNm, con el fin de eliminar el ADN residual del ARN aislado, se realizó el tratamiento con DNasa (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cebó aleatoriamente el ADN complementario (ADNc) a partir de 1 µg de ARN total usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems).

35

Entonces, se llevó a cabo la PCR en tiempo real por triplicado con una dilución 1:4 del ADNc, usando Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma) en una máquina de PCR de la serie Rotorgene 6000 (Corbett Research). El análisis de los datos se realizó usando el software que acompaña a la máquina de PCR y los datos se normalizaron con respecto a la β-actina. Para el análisis de la expresión de miARN, se realizó la síntesis de ADNc usando el kit de transcripción inversa de microARN TaqMan® (Applied Biosystems) usando los ensayos de microARN TaqMan® de

40

acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems). Los datos de microARN se expresan en relación con el ARN nuclear pequeño U6 (snoU6).

Ensayo de formación de tubos Matrigel®

De acuerdo con las instrucciones del fabricante, se descongeló Matrigel® (Becton Dickinson) y se añadieron 100 µl de Matrigel® a una placa de 96 pocillos de fondo plano que se dejó polimerizar a 37 °C durante 1 hora. A continuación, se sembraron HUVEC a $3,6 \times 10^4$ células por pocillo en medio HUVEC. Se tomaron fotografías a intervalos regulares durante 24 horas.

Ensayo de permeabilidad

El ensayo de permeabilidad se realizó como se ha descrito previamente (Li *et al.*, 2004, *Blood* 104:1716). En resumen, 24 h después de la transfección, se sembraron HUVEC en placas a 1×10^5 células por transpocillo (Corning) durante 24 horas en medio HUVEC y luego en medio HUVEC con FCS al 2 % durante otras 24 horas. Se añadió dextrano conjugado con FITC (2 µg) a la cámara superior de todos los pocillos. Se determinó la cantidad de FITC-dextrano de las cámaras inferiores de los transpocillos usando un espectrómetro de luminescencia LS 50B (Perkin Elmer) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. La permeabilidad se da como la cantidad de FITC-dextrano que pasa de la cámara superior a la cámara inferior. Se sembraron las HUVEC que sobreexpresaron miR-27a en transpocillos 24 horas después del procedimiento de transfección y se trataron de la misma manera que las células transfectadas con un control de pre-miR.

Inmunotransferencia

Se lisaron las HUVEC en tampón de lisis enfriado con hielo (Tris.HCl 1 M, pH 7,5, con NP-40 al 1 %, NaCl 5 M, EGTA 200 mM, NaF 500 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 100 mM y cóctel de inhibidor de proteasas). Las concentraciones de proteína se ensayaron usando reactivo Bradford (BioRad). Se cargaron cantidades iguales de proteína en un gel de acrilamida, se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membrana de PVDF, se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5 % en PBS y se sondaron con un anticuerpo primario y secundario apropiado. Después del lavado, se detectaron las bandas reactivas por quimioluminiscencia (Amersham 8 Pharmacia Biotech). Se lavaron las membranas y se volvieron a sondear usando un anticuerpo monoclonal anti-actina beta (Sigma) como control de carga.

Ensayo de colágeno

El ensayo de formación de tubos capilares se realizó como se ha descrito previamente (Gamble *et al.*, 1993, *J Cell Biol* 121:931). En resumen, se sembraron $6,4 \times 10^4$ células/160 µl de medio HUVEC sobre 100 µl de colágeno de tipo I de rata gelificado (Becton Dickinson) en placas de microvaloración de 96 pocillos de fondo plano. Se estimuló la formación de tubos capilares mediante la adición de 20 ng/ml de acetato de miristato de forbol (PMA) y un anticuerpo contra la integrina $\alpha 2\beta 1$ (RMAC11), que potencia la formación de tubos multicelulares complejos.

Resultados

Como se muestra en la Figura 3, la sobreexpresión de hsa_miR_27a interrumpe la formación de tubos *in vitro*. Se transfectaron HUVEC bien con un control negativo de pre-miR (A) o con un precursor de hsa_miR_27a que permitió su sobreexpresión (Figura 3B). Se observó que tanto el control como las células transfectadas a miR_27a se realinearon en las 6 primeras horas como era normal. Sin embargo, las células que sobreexpresaban miR_27a no se extendieron ni maduraron (Figura 3B). A las 12 horas, las células sobreexpresoras de miR_27a mostraron proyecciones delgadas que, a menudo, no se unían, los tubos que se habían formado dentro de este período se estaban rompiendo y hubo una disminución significativa del número de tubos capilares completamente formados (Figura 3C). Estos resultados indican que la regulación negativa de miR_27a es necesaria para la formación de tubos capilares estables y que se produzca la maduración.

Otra evidencia del efecto de la sobreexpresión de hsa_miR_27a en la formación de tubos puede verse en la Figura 4 que ilustra el aumento de la permeabilidad de las células endoteliales tras la transfección con el precursor de hsa_miR_27a, lo que sugiere una alteración en la configuración de las uniones celulares.

Ejemplo 3 - Expresión de hsa_miR_27a en la enfermedad humana

Se determinó el nivel de expresión de hsa_miR_27a en células endoteliales de pacientes humanos con carcinoma hepatocelular. Se obtuvo material de archivo de muestras de hígado fijadas de parafina de pacientes con carcinoma hepatocelular a través del departamento hepático del Royal Prince Alfred Hospital. También se obtuvieron cortes hepáticos embebidos en parafina de tres pacientes con cirrosis. Se sabe que el área fibrótica que rodea los nódulos regenerativos es una zona en la que se están formando neovasos, y esta zona del hígado normal está libre de dichos neovasos. Los vasos sanguíneos se detectaron usando la expresión de PECAM. La escisión de las células endoteliales de los vasos venulares y neoangiogénicos se realizó usando el instrumento Arcturus PixCell IIe. El

- protocolo de extracción fue el recomendado por el fabricante. Se ajustó el diámetro del láser a 7,5 μM y el pulso láser se ajustó a 0,2 segundos. Las células endoteliales se transfirieron a tapones de LCM CapSure Macro, lo que permite la extracción precisa y rápida de poblaciones de células puras de vénulas y neovasos mediante microdissección por captura láser (LCM). Aproximadamente, se recogieron de 5 a 10 tapones de LCM para las dos poblaciones de células endoteliales. Las imágenes se adquirieron a temperatura ambiente usando los objetivos UPlanFI x4/0,13, UPlanFI x10/0,30, LCPlanFI x20/0,40 de un microscopio Arcturus PixCell IIe (Molecular Devices) y se adquirieron en una cámara a color de un solo chip CCD de 1/2 pulgada (Hitachi). Se ajustó el brillo y el contraste de las imágenes usando el software LCM versión 2.0.
- 5 Se realizó el aislamiento del ARN total usando TRIzol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis de miARN se realizó usando matrices humanas de baja densidad de TaqMan (Applied Biosystems). Se obtuvieron valores de ciclo umbral (Ct) sin procesar para cada miARN y se extrajeron para el análisis de la expresión. Los niveles de miR_27a se midieron mediante Q-PCR.
- 10 Los datos obtenidos usando células endoteliales neoangiogénicas y células endoteliales de las vénulas de una muestra de paciente con carcinoma hepatocelular se muestran en la Figura 5A. Se puede observar que la expresión de miR_27a se reduce casi el doble en las células neoangiogénicas en comparación con las células venulares. Se obtuvieron resultados similares para una segunda muestra de paciente con carcinoma hepatocelular (datos no mostrados). En los cortes hepáticos de los tres pacientes con cirrosis, hubo una disminución muy significativa de la expresión de miR_27a en los neovasos en comparación con las vénulas (Figura 5B). Los resultados se normalizaron con respecto a miR-520d* (un miARN confirmó no ser regulado entre las dos poblaciones de células endoteliales).
- 15
- 20

Ejemplo 4 - La sobreexpresión de miR_27a reduce la formación *in vivo* de tubos capilares

- 25 Se usó un ensayo de tapón de Matrigel murino para confirmar que miR_27a es fundamental para la regulación de la angiogénesis *in vivo*.
- El ensayo se realizó como se ha descrito previamente (Zhang *et al.*, 2006, *J Cell Sci* 119:3219). Se inyectaron a ratones C57BL/6 hembra de seis a ocho semanas de vida por vía subcutánea (ijadas derechas) 50 μl de Matrigel que contenía FGF-2 (0,5 μg , (Sigma, MI), 90 μg de control o mimético de miR-27a, o no mimético, y FuGENE6 (2,5 ml). 14 días después, se extrajeron los tapones y se fijaron en paraformaldehído al 10 %. Se tiñeron cortes transversales de 5 μm con hematoxilina-eosina. Se cuantificaron los vasos que contenían eritrocitos de los tapones mediante microscopía óptica a un aumento x 100 y se expresaron como la media de tres campos aleatorios. Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de cuidado y ética de los animales de la Universidad de New South Wales. Las imágenes se adquirieron a temperatura ambiente usando un objetivo UplanFI x20/0,50 para el panel A y un objetivo UPlanFI x40/0,77 para el panel B en un microscopio BX51 de una cámara DP70 usando el software DPC Controller 3.1.1.267 (todos de Olympus). Tras la adquisición de los datos, se usó ImageJ (NIH) para realizar los ajustes de luminosidad y contraste.
- 30
- 35
- 40 Los cortes transversales teñidos con hematoxilina y eosina de la superficie de contacto de Matrigel/piel mostraron vasos que contenían eritrocitos o vasos maduros en crecimiento. El desarrollo estromal inducido, la infiltración celular y los vasos sanguíneos lumbales capilares eran visibles en los controles, pero no en la misma medida en el implante de miR_27a (Figura 6A y B). Además, esta reducción significativa en el número de vasos también fue detectable cuando se tiñeron los cortes para CD31 (PECAM) (Figura 6C y 7D). Por lo tanto, la sobreexpresión de miR_27a inhibe la invasión de los vasos sanguíneos en el tapón de Matrigel, lo que sugiere que miR_27a es anti-angiogénico.
- 45

Ejemplo 5 - Efecto de miR_27a sobre la expresión de VE-cadherina

- 50 Usando los algoritmos de predicción de dianas basados en la Web, incluyendo TargetScan, PicTar y miRanda, se predijo que miR_27a se dirigía a la VE-cadherina, la molécula de adhesión celular dependiente del calcio específica endotelial, responsable de las interacciones célula-célula y la adhesión en tejidos sólidos. La UTR de 3' de la VE-cadherina contiene un único sitio 8-mero previsto para miR-27 con una coincidencia exacta en las posiciones 2-8 del miARN maduro seguido de un 'A' (la región semilla + la posición 8).
- 55 Para determinar si miR_27a regula la expresión de VE-cadherina, se midieron los niveles de proteínas de VE-cadherina en células con sobreexpresión de miR_27a. Para estos experimentos, se sembraron HUVEC a 4×10^5 células por matraz de 25 cm^2 , y 24 horas más tarde se transfectaron con miméticos de microARN (moléculas de precursor de miARN Pre-miRTM, Ambion) o LNA (Exiqon) a una concentración final de 15 nM usando reactivo de transfección HiPerFect (Qiagen). En cinco estirpes de HUVEC independientes ensayadas, hubo una disminución significativa (25 % \pm 4 %) en la expresión de la proteína VE-cadherina a las 48 horas después de la transfección. El aumento de la dosis de mimético de miARN no alteró significativamente los efectos sobre la VE-cadherina observados (datos no mostrados). Se midió el nivel de ARNm de VE-cadherina usando Q-PCR. Se observó una disminución (31 % \pm 7 %) en los niveles de ARNm de VE-cadherina observados en las células con sobreexpresión de miR_27a en cinco estirpes de HUVEC independientes ensayadas. Por el contrario, la desactivación de miR_27a
- 60
- 65

usando tecnología basada en ácido nucleico bloqueado (LNA) mostró una regulación positiva (22 % ± 4 %, n = 2) de VE-cadherina a nivel de proteína.

5 Otros experimentos en los que se usaron construcciones de indicador de luciferasa generadas mediante la codificación de la UTR de 3' de tipo silvestre de VE-cadherina o en las que se mutó el sitio de miR_27a mostraron que miR_27a tiene la capacidad de regular la expresión de la VE-cadherina mediante la unión directa a la UTR de 3' de VE-cadherina. Hubo una represión significativa de la actividad de la luciferasa (33 % ± 3 %) en células transfectadas con la construcción que contenía la UTR de 3' de tipo silvestre más mimético de miR-27a, en comparación con la UTR de 3' de tipo silvestre más el mimético de control. La mutación del sitio de miARN fue capaz de revertir la represión de la actividad luciferasa (datos no mostrados). Además, se demostró que la sobreexpresión o desactivación de miR-27a causó una redistribución significativa de la VE-cadherina dentro de la célula (datos no mostrados).

15 Listado de secuencias

- 15 <110> Centenary Institute of Cancer Medicine and Cell Biology University of Sydney Medvet Science Pty Ltd
Wenkart Foundation
- 20 <120> Moléculas terapéuticas y de diagnóstico
- <130> 20542923
- <160> > 37
- 25 <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- <211> 21
- <212> ARN
- 30 <213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- uucacagugg cuaaguuccg c 21
- 35 <210> 2
- <211> 21
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- 40 <400> 2
- uucacagugg cuaaguucug c 21
- <210> 3
- <211> 23
- <212> ARN
- 45 <213> *Homo sapiens*
- <400> 3
- 50 gugccuacug agcugauauc agu 23
- <210> 4
- <211> 21
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- 55 <400> 4
- aucacauugc cagggauuuc c 21
- <210> 5
- <211> 21
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- 60 <400> 5
- 65 aucacauugc cagggauuac c 21

ES 2 644 055 T3

	<210> 6	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
5		
	<400> 6	
	uaaagugcuu auagugcagg uag	23
10		
	<210> 7	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15		
	<400> 7	
	uagcuuauca gacugauguu ga	22
20		
	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 8	
	uagcaccauc ugaaaucggu u	21
25		
	<210> 9	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
30		
	<400> 9	
	uagcaccauu ugaaucagu guu	23
35		
	<210> 10	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
40		
	<400> 10	
	uagcaccauu ugaaaucggu ua	22
45		
	<210> 11	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
50		
	<400> 11	
	aaaagugcuu acagugcagg uag	23
55		
	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60		
	<400> 12	
	ucguaccgug aguaaauaug c	21
65		
	<210> 13	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 13	
	aacuggccua caaagucca gu	22

	<210> 14	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
5		
	<400> 14	
	uagcagcaca gaaauauugg c	21
10		
	<210> 15	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15		
	<400> 15	
	uucaccaccu ucuccaccca gc	22
20		
	<210> 16	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25		
	<400> 16	
	agcuacauug ucugcugggu uuc	23
30		
	<210> 17	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> <i>Rattus norvegicus</i>	
35		
	<400> 17	
	ugucccucug ggucgccca	19
40		
	<210> 18	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45		
	<400> 18	
	cauuuuacu uuugguacgc g	21
50		
	<210> 19	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
55		
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
60		
	<400> 19	
	gcggaacuua gccacuguga a	21
65		
	<210> 20	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
70		
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
75		
	<400> 20	
	gcagaacuua gccacuguga a	21
80		
	<210> 21	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	

	<220>		
	<223> Construcción sintética		
5	<400> 21 acugauauca gcucaguagg cac	23	
	<210> 22		
	<211> 21		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
15	<400> 22 ggaaaucuccu ggcaauguga u	21	
	<210> 23		
	<211> 21		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
25	<400> 23 gguaaocuccu ggcaauguga u	21	
	<210> 24		
	<211> 23		
30	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
35	<400> 24 cuaccugcac uauaagcacu uua	23	
	<210> 25		
	<211> 22		
40	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
45	<400> 25 ucaacaucag ucugauaagc ua	22	
	<210> 26		
	<211> 21		
50	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
55	<400> 26 aaccgauuuc agauggugcu a	21	
	<210> 27		
	<211> 23		
60	<212> ARN		
	<213> Artificial		
65			

	<220> <223> Construcción sintética	
5	<400> 27 aacacugauu ucaaauggug cua	23
10	<210> 28 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
15	<220> <223> Construcción sintética	
20	<400> 28 uaaccgauuu caaauggugc ua	22
25	<210> 29 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
30	<220> <223> Construcción sintética	
35	<400> 29 cuaccgacac uguaagcacu uuu	23
40	<210> 30 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
45	<220> <223> Construcción sintética	
50	<400> 30 gcuuuuuac ucacgguacg a	21
55	<210> 31 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
60	<220> <223> Construcción sintética	
65	<400> 31 acugggacuu uguaggccag uu	22
70	<210> 32 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
75	<220> <223> Construcción sintética	
80	<400> 32 gccauuuuu cugugcugcu a	21
85	<210> 33 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	

	<220>		
	<223> Construcción sintética		
5	<400> 33		
	gcugggugga gaagguggug aa	22	
	<210> 34		
	<211> 23		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
15	<400> 34		
	gaaaccagc agacaaugua gcu	23	
	<210> 35		
	<211> 19		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
25	<400> 35		
	ugggcgaccc agagggaca	19	
	<210> 36		
	<211> 21		
30	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
35	<400> 36		
	cgcguaaccaa aaguaauaau g	21	
	<210> 37		
	<211> 7		
	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
45	<400> 37		
	ucacagu	7	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un miARN que comprende una región semilla que comprende la secuencia UCACAGU (SEQ ID NO: 37), o uno de sus precursores o una de sus variantes, para su uso en el tratamiento de una afección asociada a una angiogénesis excesiva o no regulada, necesitando dicha afección la inhibición de la angiogénesis en un sujeto.
2. El miARN para el uso de acuerdo con la invención 1, en el que el miARN que comprende la secuencia UCACAGU de la región semilla es miR_27a.
- 10 3. El miARN de acuerdo con la invención 1 o 2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el miR_27a es hsa_miR_27a que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1.
- 15 4. El miARN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sujeto padece, está predispuesto a, o de otra manera, está en riesgo de, desarrollar una afección asociada a una angiogénesis excesiva o no regulada.
- 20 5. El miARN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 4, en el que la afección se selecciona de cáncer, enfermedad cardiovascular (opcionalmente, aterosclerosis o restenosis), un trastorno inflamatorio crónico (opcionalmente, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn o soriasis), un trastorno ocular (opcionalmente, retinopatía, retinopatía diabética, glaucoma o degeneración macular, incluyendo degeneración macular relacionada con la edad), endometriosis o adiposidad.
- 25 6. Un antagonista de un miARN, en el que dicho miARN comprende una región semilla que comprende la secuencia UCACAGU (SEQ ID NO: 37), para su uso en el tratamiento de una afección asociada a una angiogénesis alterada o suprimida, necesitando dicha afección la potenciación o la inducción de la angiogénesis, en el que dicho antagonista es un oligonucleótido antisentido específico de dicho miARN.
- 30 7. El antagonista de acuerdo con la reivindicación 6, para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como la expuesta en SEQ ID NO: 19.
- 35 8. El antagonista de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la secuencia oligonucleotídica comprende una o más modificaciones tales como análogos de nucleótidos no naturales, enlaces no fosfato entre nucleótidos y/o restos conjugados.
- 40 9. El antagonista de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la potenciación o inducción de la angiogénesis es para la reparación de heridas, tal como la cicatrización de heridas isquémicas.
- 45 10. El antagonista de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 9, en el que la potenciación o inducción de la angiogénesis es para la reparación de tejido, regeneración de tejido u obtención de tejido mediante ingeniería genética.
- 50 11. El antagonista de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6, 9 o 10, en el que el sujeto padece, está predispuesto a, o de otra manera, está en riesgo de, desarrollar una afección asociada a una angiogénesis alterada o suprimida.
- 55 12. El antagonista de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la afección se selecciona de enfermedad de las arterias coronarias, ictus, un trastorno ginecológico, infertilidad o una herida isquémica.
13. Un antagonista de un miARN, siendo dicho miARN miR_27a, para su uso en el tratamiento de una afección que requiera la reducción de la permeabilidad de las células endoteliales, siendo dicho antagonista un oligonucleótido antisentido específico de dicho miARN.
14. Un antagonista de un miARN, siendo dicho miARN miR_27a, para su uso en el tratamiento de una afección que requiere el aumento de los niveles proteicos de VE-cadherina, siendo dicho antagonista un oligonucleótido antisentido específico de dicho miARN.

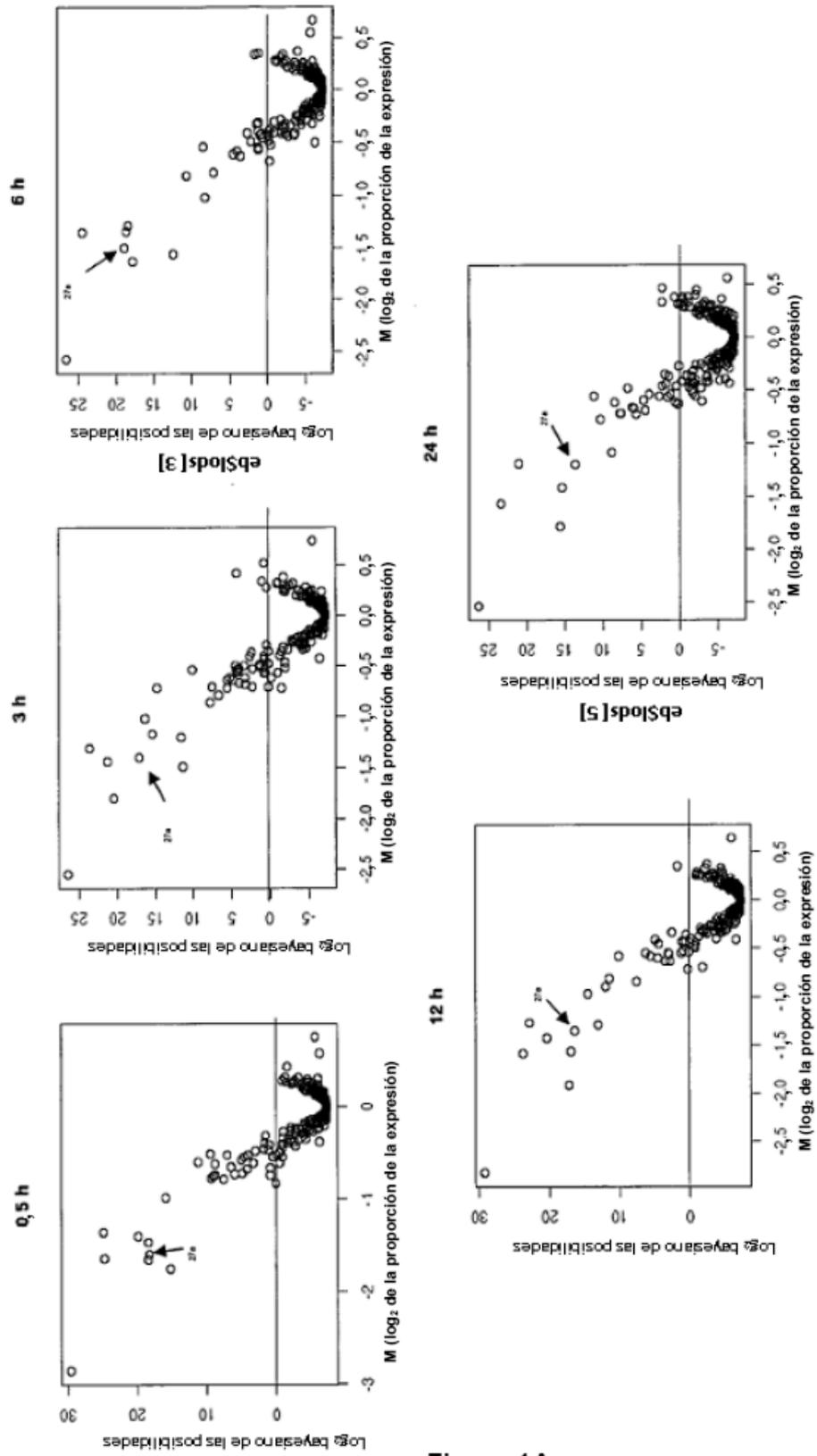


Figura 1A

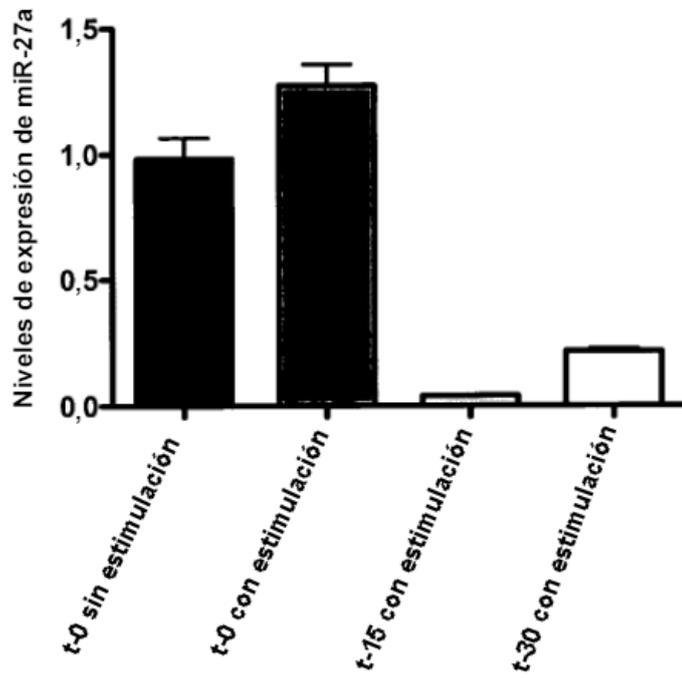


Figura 1B

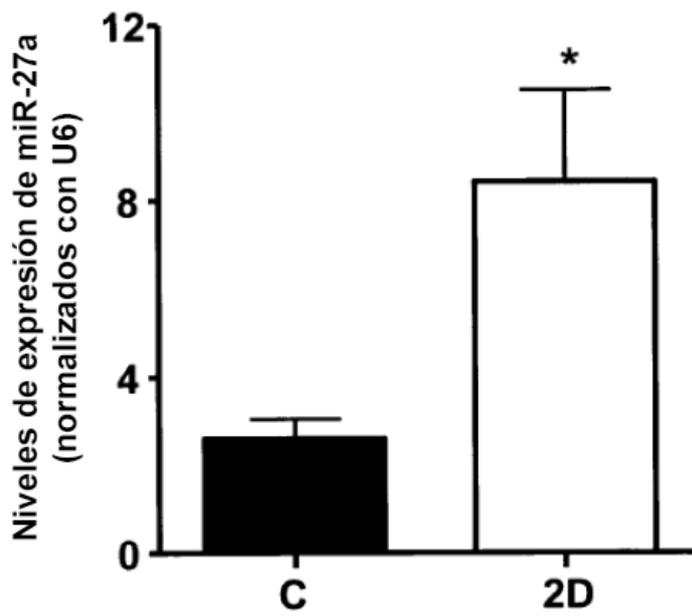


Figura 2

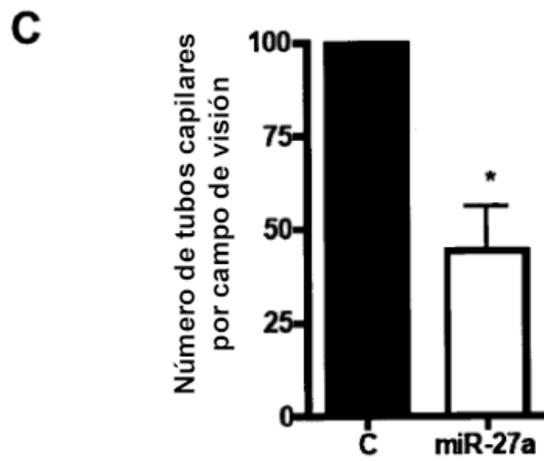
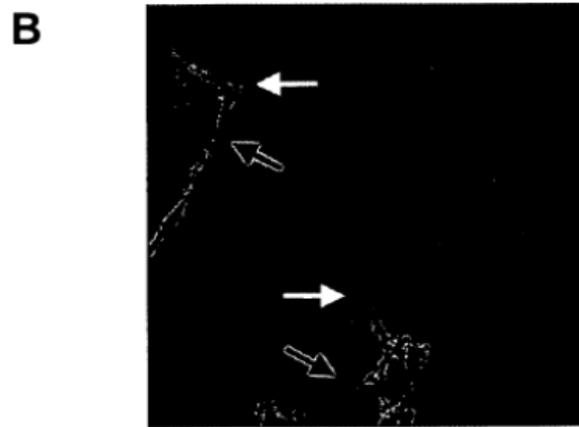
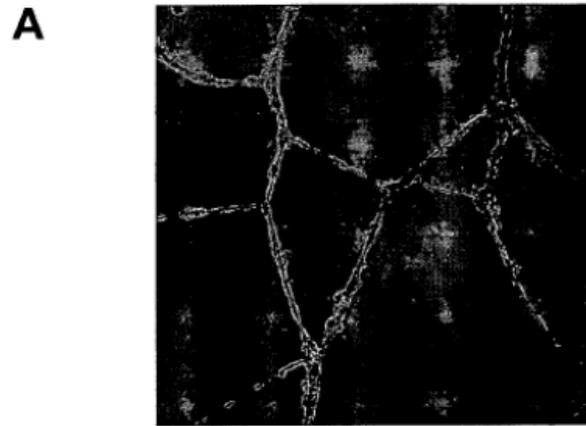


Figura 3

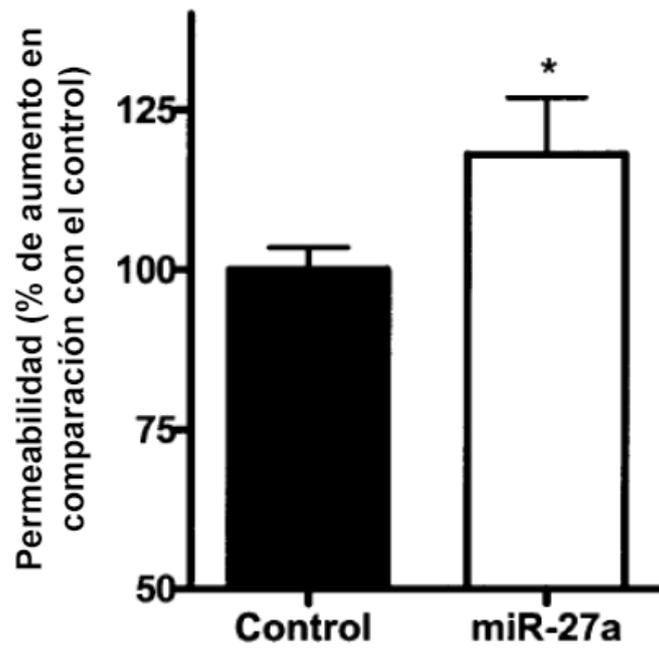
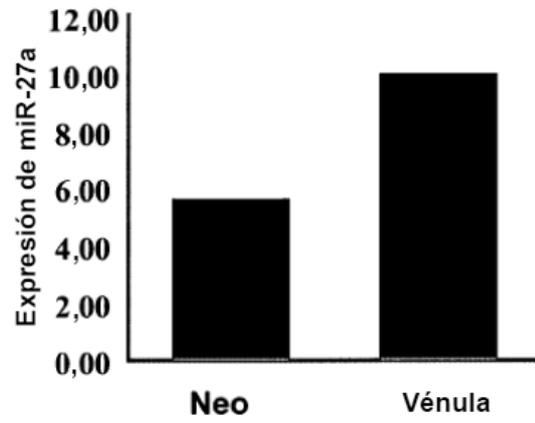


Figura 4

A



B

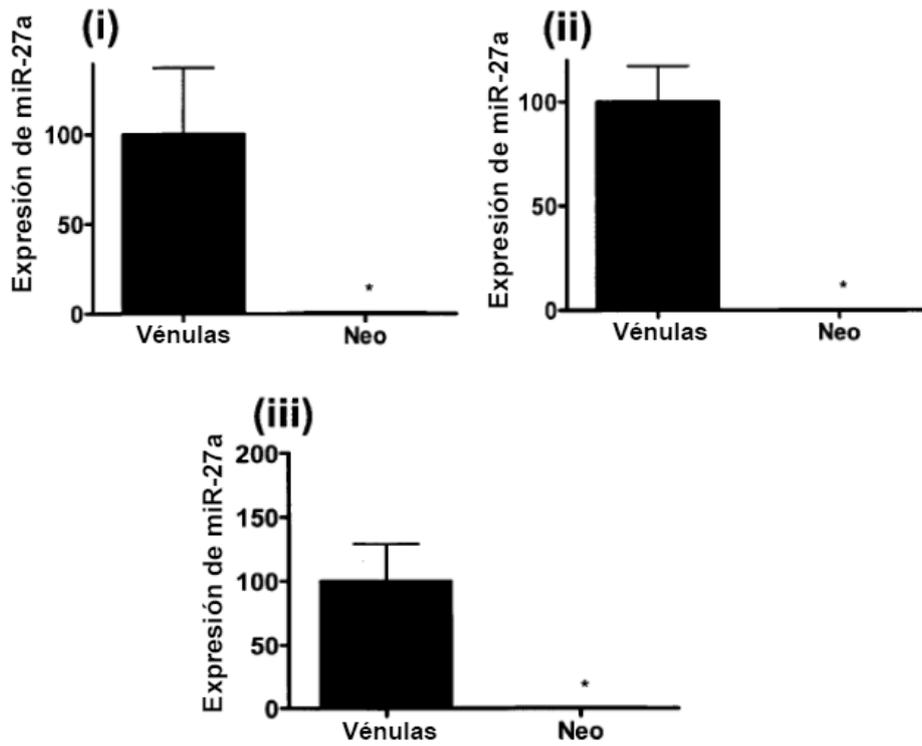


Figura 5

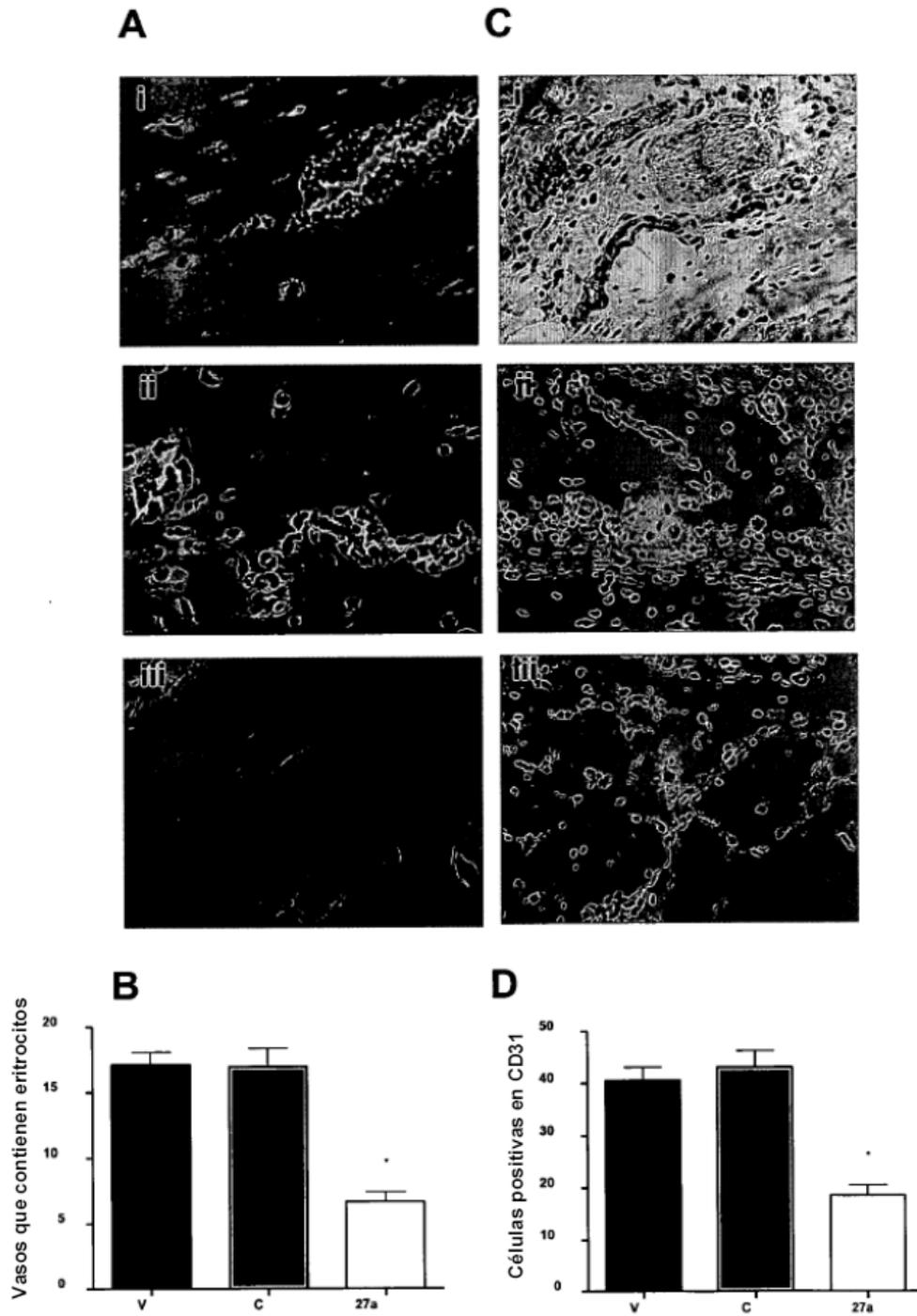


Figura 6