

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 111**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2015 PCT/GB2015/050066**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15107340**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2015 E 15706497 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 3094727**

54 Título: **Materiales y métodos para la modulación de la cicatrización de tendones**

30 Prioridad:

**14.01.2014 GB 201400598**

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

**27.03.2018**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY  
OF GLASGOW (100.0%)  
The Gilbert Scott Building University Avenue  
Glasgow, Strathclyde G12 8QQ, GB**

72 Inventor/es:

**GILCHRIST, DEREK STEWART y  
MILLAR, NEAL LINDSAY**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 661 111 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

Materiales y métodos para la modulación de la cicatrización de tendones

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al uso del microARN 29 y precursores y miméticos del mismo para el tratamiento de daños en los tendones y la modulación de las propiedades biomecánicas de los tendones.

10 **Antecedentes de la invención**

La reparación de tejidos mal regulada y la inflamación caracteriza muchas patologías musculoesqueléticas<sup>1</sup> comunes, incluyendo los trastornos de los tendones. Las tendinopatías representan un precipitante común de consultas musculoesqueléticas en atención primaria<sup>2-3</sup> y comprende del 30-50 % de todas las lesiones deportivas<sup>3</sup>.  
15 La tendinopatías se caracteriza por una producción alterada de colágeno de los subtipos 1 a 3 dando como resultado una disminución de la resistencia a la tensión que puede presagiar la rotura tendinosa<sup>4</sup> clínica.

Los mediadores inflamatorios se consideran cruciales en la aparición y perpetuación de la tendinopatía<sup>5</sup>. Se ha demostrado la expresión de distintas citocinas en las líneas celulares inflamatorias y tenocitos que sugieren que tanto las poblaciones infiltrantes como residentes participan en la patología<sup>6-9</sup>. Las propiedades mecánicas de la cicatrización de tendones en ratones deficientes a IL-6 son inferiores en comparación con los controles normales<sup>10</sup> mientras que el bloqueo de TNF- $\alpha$  mejora la fuerza de la cicatrización del tendón-hueso en un modelo de lesión tendinosa<sup>11</sup> en rata. Aunque estos datos plantean la interesante posibilidad de que el direccionamiento a citocinas podría ofrecer una utilidad terapéutica, actualmente hay un entendimiento mecánico insuficiente de la biología de  
25 citocinas/matriz en las enfermedades tendinosas para manifestar esta posibilidad en la práctica.

La interleucina 33 es un miembro de la familia de la citocina IL-1 que a su vez tiene un papel principal en las respuestas inmunitarias innatas. La IL-33 se expresa en las células endoteliales y fibroblastos, se co-localiza con la cromatina en el núcleo<sup>12</sup>. La IL-33 se libera a continuación de un daño celular<sup>13</sup> y sobrecarga biomecánica<sup>14</sup>, y por lo tanto se considera como una 'alarmina'<sup>15</sup>. Se ha implicado en varias patologías inflamatorias que incluyen enfermedades pulmonares, cutáneas y articulares<sup>16</sup>. La IL-33 funciona mediante su receptor ST2 equivalente que existe unido en la membrana (mST2) o en forma soluble (sST2) y se señala mediante una cascada de señalización IL-1R canónica. Las citocinas se regulan a menudo a nivel post-transcripcional mediante microARN (miARN) que controlan la expresión genética por supresión de la traducción y desestabilización de los ARNm<sup>17</sup>. Las redes de  
30 microARN están emergiendo como reguladores homeostáticos clave de la reparación tisular con papeles fundamentales propuestos en biología de células madre, inflamación, respuesta a la hipoxia, y angiogénesis<sup>18</sup>.

Los microARN (miR) son ARN pequeños no codificantes que tienen un impacto sustancial en la función celular mediante la represión de la traducción (bien mediante la inhibición de la traducción o la inducción de la degradación del ARNm). Los microARN se derivan de transcripciones de ARN primario (pri-miARN) sintetizados por ARN pol II, que puede tener varios miles de nucleótidos de longitud. Una única transcripción de pri-miARN puede dar lugar a más de un miARN activo.  
40

En el núcleo, la enzima RNasa tipo III Drosha procesa la transcripción del pri-miARN en un precursor de miARN (pre-miARN) que consiste en una estructura en tallo-bucle u horquilla, normalmente de aproximadamente 70 a 100 nucleótidos de longitud. El pre-miARN se transporta entonces al citoplasma, donde se procesa adicionalmente por la RNasa Dicer, eliminando el bucle y dando lugar a una molecular de miARN madura de doble cadena, que tiene una cadena "guía" activa (normalmente de 15 a 25 nucleótidos de longitud) que se hibrida a una cadena "pasajera" complementaria parcial o completamente.  
50

El miARN maduro de doble cadena se incorpora entonces en el complejo de silenciamiento inducido por ARN, en el que la cadena guía se hibrida a un sitio de unión en el ARNm diana.

La cadena guía puede no ser complementaria por completo al sitio de unión diana. Sin embargo, una región de la cadena guía denominada la secuencia "semilla" habitualmente es completamente complementaria a la secuencia correspondiente del sitio de unión diana. La secuencia semilla tiene normalmente 2 a 8 nucleótidos de longitud y se localiza en o cerca (a 1 o dos nucleótidos de) el extremo 5' de la cadena guía.  
55

Se cree que las cadenas guía únicas no emparejadas también pueden ser capaces de incorporarse en RISC. También se cree que las modificaciones en la cadena pasajera (por ejemplo, a los azúcares, bases, o estructura matriz) que impide la incorporación de la cadena pasajera en el RISC también puede aumentar la eficacia de la inhibición dirigida por un miARN de doble cadena. Ogawa et al (2010) desvela que el miR-29b es un supresor del colágeno tipo I a nivel del ARNm y proteico mediante su unión directa a la 3' UTR del Col1a1 y por lo tanto está implicado directamente en la regulación del colágeno tipo I en las células estrelladas hepáticas. Maurer et al (2010) desvela que la sobre-expresión del miR-29a da lugar directamente a un aumento de los niveles de ARN mensajero y proteínas para el colágeno tipo I y tipo III en la esclerosis sistémica. Kwiecinski et al (2011) desvela que la 3'-UTR de los subtipos colágeno-1 y 4 se unen al miR-29 y por lo tanto, la sobre-expresión de miR-29a/b en las células  
65

estrelladas hepáticas da como resultado la reducción de la síntesis de colágeno-I y IV. Yong et al (2013) se refiere al papel de los miembros de la familia miR-29 en la fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, y fibrosis cardíaca y expone su potencial como estrategia terapéutica para tratar la enfermedad con fibrosis. Parece que los miembros de la familia miR-29 son un regulador común de la fibrosis tisular debido a que reprimen la síntesis de colágeno mediante la unión directa a su 3' UTR en los fibroblastos. El documento WO2010/026213 se refiere a métodos de tratamiento de la escleroderma que comprende el aumento de la cantidad de miR-29. El documento WO2010/148050 desvela métodos de modulación de una función y/o la expresión de los polinucleótidos genéticos del colágeno en células del paciente pero no hace referencia al miR-29. El documento WO2013/142336 se refiere a una "terapia de combinación para mejorar la cicatrización de articulaciones, tendones y ligamentos" promoviendo la movilización celular de un progenitor vasculogénico endógeno derivado de médula ósea (BM), la sensibilización de dichas células y la quimiotaxis a sitios de lesión o enfermedad. Es por lo tanto mudo sobre el miR-29.

**Sumario de la invención**

La cicatrización de una lesión tendinosa a menudo es sub-óptima, al menos en parte debido a un cambio en la síntesis de colágeno tipo 1 a tipo 3 durante las tendinopatías. El colágeno tipo 3 es mecánicamente inferior al colágeno tipo 1, lo que da como resultado un tendón con una fuerza de tensión menor. Las propiedades biomecánicas del tendón mejorarían si el balance entre los subtipos de colágeno se pudiera modificar hacia el colágeno tipo 1. El miR-29 se había identificado previamente como un regulador de la síntesis de colágeno en distintos procesos biológicos, tal como en fibrosis y escleroderma. Sin embargo, los inventores han descubierto, por primera vez, que los tenocitos contienen formas cortadas y empalmadas alternativamente de transcripciones de colágeno tipo 1. Las transcripciones predominantes para el tipo 1a1 y 1a2 son regiones 3' no traducidas (UTR) cortas que no contienen sitios de unión al miR-29, mientras que la enorme transcripción de colágeno tipo 3 presente es una forma larga sensible a miR-29. Como resultado, las síntesis del colágeno tipo 1 en tenocitos está afectada en un grado mucho menor por el miR-29 que la síntesis de colágeno tipo 3. Sorprendentemente, entonces, por regulación positiva de la actividad del miR-29, es posible modular el balance entre los subtipos de colágeno a favor del colágeno tipo 1, mitigando y aboliendo la reducción de la fuerza de tensión del tendón y modulando sus propiedades biomecánicas tales como su fuerza de rotura máxima.

En su forma más amplia, la invención se refiere al uso del microARN 29 (miR-29) y precursores, miméticos y agonistas del mismo para la modulación de la cicatrización de tendones y las propiedades biomecánicas del tendón.

Por lo tanto, la invención proporciona un método para la modulación de la cicatrización de tendones, comprendiendo el método el aumento de la expresión o actividad de miR-29 en una célula tendinosa. Esto se puede conseguir por suministro directo de miR-29 en la célula diana, por suministro de un mimético del miR-29, o por suministro de una molécula precursora que se procesa en la célula diana en un miR-29 activo o un mimético de miR-29.

El método puede comprender la etapa de suministro del miR-29, un mimético del mismo o un precursor de cualquiera, a una célula tendinosa.

El miR-29, mimético o precursor se puede suministrar en asociación con (por ejemplo, formando un complejo o encapsulado por) una molécula de un vehículo adecuado, tal como un lípido o polímero farmacéuticamente aceptable.

La molécula de un vehículo puede comprender adicionalmente un agente de direccionamiento capaz de unirse a la superficie de la célula diana.

El método puede comprender la etapa de suministrar un ácido nucleico que codifica un miR-29, un mimético del mismo, o un precursor de cualquiera, a una célula tendinosa de manera que dicho miR-29, mimético o precursor se exprese en la célula tendinosa.

De manera alternativa, el método puede comprender la etapa de suministrar un agonista capaz de regular positivamente la actividad del miR-29 endógeno a una célula tendinosa.

Cualquiera de los métodos descritos se pueden llevar a cabo *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Más normalmente, los métodos se llevarán a cabo *in vivo* por la administración de una composición adecuada a un sujeto.

La invención también proporciona un miR-29, un mimético del mismo, o un precursor de cualquiera, para su uso en un método de modulación de la cicatrización del tendón.

La invención también proporciona el uso de un miR-29, un mimético del mismo, o un precursor de cualquiera, en la fabricación de un medicamento para la modulación de la cicatrización del tendón.

La invención también proporciona el uso de un ácido nucleico que codifica un miR-29, un mimético del mismo, o un precursor de cualquiera, para su uso en un método de modulación de la cicatrización de tendones.

La invención también proporciona el uso de un ácido nucleico que codifica el miR-29, un mimético del mismo, o un precursor de cualquiera, en la fabricación de un medicamento para la modulación de la cicatrización de tendones.

5 En cualquier aspecto, el miR-29 puede ser un miR-29a, miR-29b (b1 y/o b2), un miR-29c o cualquier combinación de los mismos. Puede ser deseable que el miR-29 sea el miR-29a o una combinación que incluya el miR-29a.

10 Se puede suministrar el ácido nucleico que codifica el miR-96, un mimético o precursor, como un ácido nucleico desnudo. De manera alternativa se puede suministrar en asociación con (por ejemplo, formando un complejo o encapsulado por) una molécula de vehículo adecuada, tal como un lípido o polímero farmacéuticamente aceptable o una combinación de los mismos. En cualquier caso, el ácido nucleico es normalmente un ADN.

La molécula de vehículo puede comprender adicionalmente un agente de direccionamiento capaz de unirse a la superficie de la célula diana.

15 De manera alternativa, el ácido nucleico que codifica el miR-96, un mimético o precursor, se puede suministrar mediante un vector vírico.

20 Se puede emplear cualquier tipo de vector vírico adecuado, incluyendo, vectores adenovíricos, virus adeno-asociados (AAV), retrovíricos (especialmente lentivíricos) y herpesvíricos. Los adenovirus y lentivirus pueden ser particularmente preferidos ya que tienen la capacidad de conseguir la expresión de los genes suministrados en células que no están dividiéndose activamente.

miR-29 y precursores del mismo

25 Las tres isoformas principales en los seres humanos son miR-29a, miR-29b1, miR-29b2, y miR-29c.

El término "miR-29" se utiliza en esta memoria descriptiva para referirse a un oligonucleótido ARN que consiste en la secuencia de la "cadena guía" madura de una cualquiera de estas tres isoformas.

30 El miR-29a humano maduro ("hsa-miR-29a") tiene la secuencia:

UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA.

35 El miR-29b1 maduro y el miR-29b2 ("hsa-miR-29b1" y "hsa-miR-29b2") son idénticos y tienen la secuencia:

UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU.

El miR-29c humano maduro ("hsa-miR-29c") tiene la secuencia:

40 UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA.

Es convencional en la nomenclatura de los micro-ARN incluir un prefijo de tres letras que designan la especie de la cual se origina el micro-ARN. Por lo tanto "hsa" se pone para el Homo sapiens. Estas secuencias de miR 29 maduro se encuentran idénticamente en la mayoría de los mamíferos, incluyendo el caballo.

45 Las cuatro cadenas guía maduras comparten la misma región "semilla", que se une al ARNm diana, y tiene la secuencia:

AGCACCA.

50 El oligonucleótido de la cadena guía del miR-29 puede ser monocatenario, o puede hibridarse con un segundo oligonucleótido de ARN, a la que se hace referencia como una "cadena pasajera". La cadena guía y la cadena pasajera se disponen de manera anti-paralela entre ellas en el complejo hibridado, al que se puede hacer referencia como "miR-29 de cadena doble". (Se puede hacer referencia a la cadena guía, cuando está presente aislada como "miR-29 monocatenario").

60 La cadena pasajera y la cadena guía pueden contener varias no coincidencias con el resultado de que no todos los nucleótidos de una o ambas cadenas se hibridan con nucleótidos complementarios en la otra cadena. Por lo tanto el miR-96 puede contener una o más protuberancias (una protuberancia es un nucleótido sin emparejar, o una pluralidad de nucleótidos consecutivos sin emparejar, solo en una cadena) o bucles internos (nucleótidos opuestos sin emparejar en ambas cadenas). Uno o más nucleótidos en los extremos pueden también estar sin emparejar.

La cadena pasajera puede ser un 100 % complementaria con la secuencia semilla de la cadena guía.

65 Las cadenas pasajeras humanas nativas tienen la secuencia:

ACUGAUUUUCUUUUGGUGUCAG (miR-29a)

GCUGGUUUUCAUAUGGUGGUUAGA (miR-29b1);

5 CUGGUUUUCACAUGGUGGCUUAG (miR-29b2); y

UGACCGAUUUCUCCUGGUGUUC (miR-29c).

10 Una o ambas cadenas del miR-29 de doble cadena puede comprender una protuberancia 3', por ejemplo de 1, 2 o 3 nucleótidos. Esto significa que uno o dos nucleótidos del extremo 3' de la cadena se extiende más allá del último nucleótido 5' de la cadena complementaria (incluyendo cualquiera de los nucleótidos terminales no emparejados) y por lo tanto no tienen nucleótidos correspondientes en la cadena complementaria. Por ejemplo, ambas cadenas pueden comprender una protuberancia 3' de 1, 2 o 3 nucleótidos. De manera alternativa el complejo puede tener una protuberancia terminal en uno o ambos extremos. En algunas realizaciones, la cadena pasajera tiene la misma longitud que la cadena guía, o tiene una longitud diferente, por ejemplo, de hasta cinco nucleótidos o incluso más, dependiendo del grado de falta de coincidencias entre las dos cadenas y las longitudes de cualquier protuberancia 3'.

20 Los precursores de miR-29 incluye el pre-mir-29 y el pri-mir-29 de cualquiera de las tres isoformas, así como fragmentos y variantes de las mismas que se pueden procesar en el miR-29 maduro (sea de cadena sencilla o doble).

25 El término "pre-mir-29" se utiliza para referirse a un oligonucleótido de ARN consiste en cualquier secuencia pre-mir-29 de mamífero de longitud completa, o un fragmento o variante de la misma que comprende una secuencia guía de miR-29 maduro conectada mediante una secuencia bucle con una secuencia pasajera correspondiente que es completa o parcialmente complementaria con la secuencia guía, y en el que el oligonucleótido es capaz de formar una estructura tallo-bucle (u "horquilla") en la que la secuencia guía y la secuencia pasajera se hibridan entre ellas.

30 Un pre-mir-29 es capaz de actuar como sustrato para la ribonucleasa específica de ARN de doble cadena (enzima RNasa tipo III) Dicer, que lo procesa de esta manera en un miR-29 maduro de doble cadena.

Las secuencias pre-mir-29 de mamíferos de longitud completa incluyen las secuencias humanas:

35 AUGACUGAUUUUCUUUUGGUGUUCAGAGUCAAUAAUUUUUCUAGCACCAUCUGAAAUCGGUUUAU (hsa-pre-mir-29a: alternativa (i));

AUGACUGAUUUUCUUUUGGUGUUCAGAGUCAAUAAUUUUUCUAGCACCAUCUGAAAUCGGUUUAU  
AAUGAUUGGGG (hsa-pre-mir-29a: alternative (i.i));

CUUCAGGAAGCUGGUUUCAUAUGGUGGUUUAGAUUUAAAUAGUGAUUGUCUAGCACCAUUUGAAAUCAG  
UGUUUCUUGGGGG (hsa-pre-mir-29b1);

CUUCUGGAACCUGGUUUCACAUGGUGGCUUAGAUUUUUUCCAUUUUUUAGCACCAUUUGAAAUC  
GUGUUUUAGGAG (hsa-pre-mir-29b2);

40 y

AUCUCUUACACAGGUGACCGAUUUUCUCCUGGUGUUCAGAGUCUGUUUUUGUCUAGCACCAUCUGAAAUC  
CGGUUUAUGAUGUAGGGGGA (hsa-pre-mir-29c)

Las secuencias de la cadena guía madura correspondientes están subrayadas.

45 El pre-mir-29 puede poseer una o más modificaciones al margen de la secuencia madura, en comparación con las secuencias que se muestran.

50 La secuencia corriente arriba (5') de la secuencia madura puede tener, por ejemplo, al menos un 50 % de identidad, al menos un 55 % de identidad, al menos un 60 % de identidad, al menos un 65 % de identidad, al menos un 70 % de identidad, al menos un 75 % de identidad, al menos un 80 % de identidad, al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 91 % de identidad, al menos un 92 % de identidad, al menos un 93 % de identidad, al menos un 94 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 % de identidad, al menos

un 97 % de identidad, al menos un 98 % de identidad, o al menos un 99 % de identidad con la secuencia humana correspondiente.

5 Por ejemplo, la secuencia corriente arriba (5') de la secuencia del miR-29a maduro puede diferenciarse en hasta 20 nucleótidos de la secuencia 5' humana correspondiente cuando se alinean de manera óptima entre ellas, por ejemplo por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos.

10 La secuencia corriente arriba de la secuencia de miR-29b1 o b2 maduros puede diferenciarse en hasta 25 nucleótidos de la secuencia 5' humana correspondiente cuando se alinean de manera óptima entre ellas, por ejemplo, por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos.

15 La secuencia corriente arriba de la secuencia del miR-29c maduro puede diferenciarse en hasta 25 nucleótidos de la secuencia 5' humana correspondiente cuando se alinean de manera óptima entre ellas, por ejemplo, por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos.

20 La secuencia corriente abajo (3') de la secuencia madura puede tener, por ejemplo al menos un 50 % de identidad, al menos un 55 % de identidad, al menos un 60 % de identidad, al menos un 65 % de identidad, al menos un 70 % de identidad, al menos un 75 % de identidad, al menos un 80 % de identidad, al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 91 % de identidad, al menos un 92 % de identidad, al menos un 93 % de identidad, al menos un 94 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 % de identidad, al menos un 97 % de identidad, al menos un 98 % de identidad, o al menos un 99 % de identidad con la secuencia humana correspondiente.

25 La secuencia corriente abajo (3') de la secuencia del miR-29a maduro puede ser la misma que la secuencia 3' humana, o puede ser diferente. Puede tener un nucleótido diferente del que se encuentra en la más corta de las dos secuencias que se muestran anteriormente, es decir, la alternativa (i). Puede ser más larga que la secuencia que se muestra en la alternativa (i). Por ejemplo, puede diferenciarse en hasta 6 nucleótidos de la secuencia 2' correspondiente de la alternativa (ii) que se muestra anteriormente.

30 La secuencia corriente abajo (3') de la secuencia de miR-29b1 o b2 maduros puede diferenciarse en hasta 4 nucleótidos de la secuencia 3' humana correspondiente cuando se alinean de manera óptima entre ellas, por ejemplo por 1, 2, 3 o 4 nucleótidos.

35 La secuencia corriente abajo (3') de la secuencia de miR-29c maduro puede diferenciarse en hasta 7 nucleótidos de la secuencia 3' humana correspondiente cuando se alinean de manera óptima entre ellas, por ejemplo por 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos.

40 El término "pri-mir-29" se utiliza para referirse a un oligonucleótido de ARN que consiste en cualquier pri-mir-29 de mamífero de longitud completa, o un fragmento o variante del mismo que comprende una secuencia pre-mir-29 que es capaz de procesarse en una secuencia pre-mir-29 por la ribonucleasa específica de ARN de doble cadena (enzima RNasa tipo III) Drosha.

45 Una transcripción sencilla puede ser capaz de procesarse en dos o más moléculas de mir-29, miméticos o precursores del mismo.

50 El hsa-mir 29a y mir 29b1 se codifican por el exón final de la transcripción que tiene el número de registro en el GenBank EU154353 (EU154353.1 GI: 161324377). La región que codifica mir 29a y mir 29b1, más la secuencia flanqueante, se muestra posteriormente. (El hsa-mir 29a se muestra en mayúscula negrita estando la secuencia del miR-29a maduro subrayada. El hsa-mir 29b se muestra en mayúscula estando el miR-29b subrayado).

ES 2 661 111 T3

```

gaaagcguuu uuuuucaaacu uduauggagc acuuugcuugc uuuguccuau uuugcaugucc
gacggacggg uuucccaggcac cacugcuagu cguccuuccgc cugccuugggu acougaucac
aggauGCCUC UgaCuUcUcc uGCCUUUacc caagcaaaagG auuuuccuug ucuucccacc
caagagugac ggggcuGaca ugugcccuug ccucuaaaug sugaagcuga accuuugucu
gggcaacuua acuuuaagaa aagggagucc caggcaugcu cucccaucaa uaacaaaauc
agugacaucA gubuaugaa auaugaaau ugccaaaagcu cuguuuagac cacugaguaa
cucacagcua ggubuaaacu uuuccuuaCu agguugucuu ggguuuuuug uaagagagca
uuugaagaa aaaaauagau cauaaagcuu CUUCAGGAAG CUGGUUUCAU AUGGUGGUUU
AGAUUUAAAU AGUGAUUGCC UAGCACCAUU UGAAAUcAGU GUUCUUGGGG Gagaaccagcu
gCGcugcacu accaacagca aaagaaguga auGGgacagc ucugaaguu uuGaaagcaa
cagcaggaug gcugugagaa ccugccucac auguagcuga ccccuuccc accccugcca
acaguggugg cauaauacac aaauGGcagu caggucucug cacuggcggg uccaacugug
aucgaaaguu uuccaaaaau aaguuguguc uguuuugaac augaacagac uuucuuucug
uuuuuuuuuu cuaaacaauac ugcauaaCa uuuuuuugau acuuuuugau ugcauuuagu
uuucuaagua acuuagagac gauuuaaagu auaccggagg augugugua gguuauigca
aaucuaacac cauuuuuuuu cagagacuug agcaucugug gaauuuugua uccaaggggc
uuucuggaac caaucccuca aggauaccaa gggauGaaug uaaauGuaCa ggauauGca
uuuguggaaU uuuaauCuUc uuuguggaaU aaaccuauag cacuuuuuag auaguacaga
cucuuuccau ugugccuuggg uuuaagagcc caauguugc uggauuuagu aagauuuGGg
cccucccaac ccuCaagacc uuCuGugacc CCUAGAGGA UGACUGAUU CUUUUGGUGU
UCAGAGUCA UAUAAUUUU UAGCACCAU UGAAAUcGGU UAUaaugauu ggggaagagc
accaugaugc ugacugcuga gaggaaaugu auGGgugacc guuggggcca uggaCaagaa
cuaagaaaac aaugcaaaG cauaaagca aaggugauuu uuCuUcUcc aguuuCuag
uuGaauuuCa cuGaccugaa uuGcaugugg uauaauacua acaaaugguu cacuuuagc
auaucaugaa ugguuuuacu uuauagaaau uccauagacu ugguGGgggu uuGuuuugg
ugacggauac cuagaaacac uccuggggaa aaucgagac ugguuuagau gaugggaaag
gagcagcgag ggagucuuuu cuguuuuuga ugagaagcug caccagcuau cucugaacuc
uccucucuaa gcugggcugag gaguuccuc caugguuaaa caggucuuuu ucuuacauaa
ggaaaaauGG uccagagaaa cuggguuuuu auGGcugaga cagaacugug cuuuuuugug
uc

```

El hsa-pri-miR 29b2 y hsa-pri-mir 29c están codificados en una única transcripción que se muestra posteriormente. El hsa-mir 29b2 se muestra en mayúsculas con el hsa-miR-29b2 maduro subrayado. El hsa-mir 29c se muestra en mayúsculas con el hsa-miR-29c maduro subrayado.

5

```

agcuuuucaa aaucucuuua ggggugugcg uaggcuccug ugucuaugcc ugcuuuugac
ugcccaguuG aagccucuuC cuauGccuuU uaaaauuuCa cgcacuaaa gGaggaagag
cucagggcuc ccaaaaCuUU uuuuuuagag ggaagaaugc uagggagauG gguauGcaga
ggguugacca aaauGGaaGa aaaauuuuau ucuGuaguuu gguguuGGaa aagggaauuu

```

```

uccaauuagc cacaccucag uguugcggca aaauaaauuu uggouccccc ggaaaacgcuu
gggcaaggua gggcagagcu gcugcugcug auacugccac caccouggrc uuccugcuga
cucugggcua cucccugggg acaadagauu ugcauugaag uccggggcug uccagaggcc
cucaagagcc aguugugagc ugagcccagu auaggaaaga ucuaccuucu ggaagcuacu
acuacugugu gcuuuggaaag aggacucagg agagugcagc uugcucugug agugggugac
aacucucugg cgacucaggc ucagcugagg auaggucagc ugugccggag acagccguca
uacugccgga uagaguggcu cacuugcaug uauuuggaac aaaaaaaggga gaugccuggc
agccccgcuc ucugcagugc uguugagoca ccauuuuuug ugguuuuug accacaagug
cugacugaug cgacaugacc ccagucuuuu cagugaauc uacaccaggcu gcuuacugga
aacuggaugc agcaaggaaa uaggauuuua ccgucucucug ccucccagga gccugaaaau
cagcauuccc agaggaaaga agaugggccau cugggcuugg cuuccggcuc cccccaucug
gcuggaacac acaucaguca cccugugua accuuccucug ugccuuuccc auggagcacu
gugucuuuuc acaaguagaa cuacaagaag auuuuuuucc ucagggcaga ggcugggucu
uccgaurgaa ucucccuucu uuuuuauuug agauccuCUU CUUCUGGAAG CUGGUUUCAC
AUGGUGGCUU AGAUUUUUCC AUUUUUGUUA CUAGCACCAU UUGAAAUCAG UGUUUUAGGA
Guaagaauug_cagcacagcc aaggguuggac ugcagaggaa cugcugcuca uggaacuggc
uccucuccuc uugccacuug agucuguuug agaaguccag ggaagaacuu gaagagcaaa
auacacucuu gaguuuguuu gguuuuggga gagugacag uagagaaggg gguuguguuu
aaaauaaaca caguggcug agcaggggca gagguuguga ugcuuuuuu guugacuccu
agcagccauc accagcauga auuguuuugu agggccuuug aguguggcga uugcauuuu
cugauggaa acaauuuuuu gggugucgau ugcauugggg caggggagag ggcaguacac
cuggaggacc auuuugucca caucgacacc aucagucugc ucuuagagga ugcccuggag
uauucggcgu ugauugcggg gcaccogaaa ucagacuugc caccuggacu gucagggugc
agaaccuggg agcaccacug gccAAUCUCU UACACAGGCU GACCGAUUUC UCCUGGUGUU
CAGAGUCUGU UUUUGUCUAG CACCAUUGA AAUCGGUUAU GAUGUAGGGG GAAAagcagc
agccucgaag ccucaugcca acucugggca gcagcagccu gugguuuccu ggaagaugga
ugggcagaga auagggaagg aagaucaugc uuuuuccuac uaacuuucgu aacugcaugu
augaucauu auugcagagg uaagagauag uuuauggau uuuuuuuuac aauuuacuuu
auuuuauucg auuuucucua guugcauuuu gcugaaaugu agugcuguc uaaauucugu
auuuugauug cuguuugaau auuuuucgu ugagaagagu cuuuuauugc auccugaccu
uuuuuuuac uauuuucagu uu

```

5 Por lo tanto, un pri-mir-29 puede contener más de una secuencia de miR-29 maduro o un mimético. Por ejemplo, puede contener un miR-29a y un miR-29b1 o miméticos de los mismos, o un miR-29b2 y miR-29c o miméticos de los mismos.

De manera alternativa, el pri-mir-29 puede contener solo una secuencia del miR-29 maduro o un mimético del mismo.

10 El pri-mir-29 puede tener al menos un 50 % de identidad, al menos un 55 % de identidad, al menos un 60 % de identidad, al menos un 65 % de identidad, al menos un 70 % de identidad, al menos un 75 % de identidad, al menos un 80 % de identidad, al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 91 % de identidad, al menos un 92 % de identidad, al menos un 93 % de identidad, al menos un 94 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 % de identidad, al menos un 97 % de identidad, al menos un 98 % de identidad, o al menos un 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias del pri-mir-29 que se muestran anteriormente, o con un fragmento de una o las secuencias que contienen una de las secuencias del miR-29 maduro.

20 El pri-mir-29 puede poseer una o más modificaciones al margen de la secuencia madura o al margen de la secuencia del pre-mir-29 nativa, en comparación con las secuencias mostradas.

25 Por ejemplo, la secuencia corriente arriba (5') de la secuencia madura puede tener al menos un 50 % de identidad, al menos un 55 % de identidad, al menos un 60 % de identidad, al menos un 65 % de identidad, al menos un 70 % de identidad, al menos un 75 % de identidad, al menos un 80 % de identidad, al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 91 % de identidad, al menos un 92 % de identidad, al menos un 93 % de identidad, al menos un 94 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 % de identidad, al menos un 97 % de identidad, al menos un 98 % de identidad, o al menos un 99 % de identidad con la secuencia humana correspondiente.

30 La secuencia corriente arriba (5') de la secuencia de pre-mir-29 puede tener al menos un 50 % de identidad, al menos un 55 % de identidad, al menos un 60 % de identidad, al menos un 65 % de identidad, al menos un 70 % de

5 identidad, al menos un 75 % de identidad, al menos un 80 % de identidad, al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 91 % de identidad, al menos un 92 % de identidad, al menos un 93 % de identidad, al menos un 94 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 % de identidad, al menos un 97 % de identidad, al menos un 98 % de identidad, o al menos un 99 % de identidad con la secuencia humana correspondiente.

10 La secuencia corriente abajo (3') de la secuencia madura puede tener, por ejemplo, al menos un 50 % de identidad, al menos un 55 % de identidad, al menos un 60 % de identidad, al menos un 65 % de identidad, al menos un 70 % de identidad, al menos un 75 % de identidad, al menos un 80 % de identidad, al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 91 % de identidad, al menos un 92 % de identidad, al menos un 93 % de identidad, al menos un 94 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 % de identidad, al menos un 97 % de identidad, al menos un 98 % de identidad, o al menos un 99 % de identidad con la secuencia humana correspondiente.

15 La secuencia corriente abajo (3') de la secuencia del pre-miR-29 nativa puede tener, por ejemplo, al menos un 50 % de identidad, al menos un 55 % de identidad, al menos un 60 % de identidad, al menos un 65 % de identidad, al menos un 70 % de identidad, al menos un 75 % de identidad, al menos un 80 % de identidad, al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 91 % de identidad, al menos un 92 % de identidad, al menos un 93 % de identidad, al menos un 94 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 % de identidad, al menos un 97 % de identidad, al menos un 98 % de identidad, o al menos un 99 % de identidad con la secuencia humana correspondiente.

25 El precursor miR-29 puede tener cualquier longitud adecuada, a condición de que se pueda procesar en un miR-29 maduro (sea de cadena sencilla o doble). Por lo tanto un precursor de miR-29a tiene al menos 23 nucleótidos de longitud, un precursor del miR 29b tiene al menos 24 nucleótidos de longitud, y un precursor de miR-29c tiene al menos 25 nucleótidos de longitud.

30 El precursor de miR 29 puede tener al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 110, al menos 120, al menos 130, al menos 140, al menos 150, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 350, al menos 400, al menos 450, al menos 500, al menos 1000, al menos 1500 o al menos 2000 nucleótidos de longitud.

35 De manera alternativa, el precursor puede tener como máximo 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 1000, 1500, 2000 o 2500 nucleótidos de longitud, aunque son posibles transcripciones de precursor más largas.

40 Se debería señalar que el término "oligonucleótido" no pretende implicar cualquier longitud en particular, y se utiliza simplemente para hacer referencia a cualquier cadena sencilla continua de nucleótidos unidos.

Miméticos del miR-29 y precursores del mismo

45 Un mimético de miR-29 es un oligonucleótido que tiene una o más modificaciones en la estructura o secuencia en comparación con un miR-29 de origen natural pero que mantiene la capacidad para hibridarse con un sitio de unión al miR-29 en el ARNm regulado por miR-29, y para inhibir la traducción o promueve la degradación de dicho ARNm. Los ARNm regulados por el miR-29 incluyen los del colágeno tipo 3 (Col3a1).

Ejemplos de sitios de unión del miR-29 incluyen:

50 CCAUUUUUAUACCAAAGGUGCUAC (del ARNm Col1a1);  
 UGUUCAUAAUACCAAAGGUGCUAA (del ARNm Col1a2); y  
 UUCAAAAUGUCUCA AUGGUGCUA (del ARNm col3a1).

55 Un oligonucleótido mimético de miR-29 tiene normalmente 15-35 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 15 a 30, 15 a 25, 18 a 25, 20 a 25, por ejemplo, 20 a 23, por ejemplo, 20, 21, 22 o 23 nucleótidos de longitud.

El mimético del miR-29 puede diferenciarse en la secuencia de bases, la estructura de nucleótidos, y/o la unión de la matriz en comparación con la de las secuencias de miR-29 maduro nativo.

60 El mimético del miR-29 comprende una secuencia semilla que puede ser idéntica a la secuencia semilla nativa:

AGCACCA

65 El mimético del miR-29 puede comprender o consistir en un oligonucleótido que tiene una secuencia guía de un miR-29 maduro nativo tal como:

UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA (hsa-miR-29a);  
UAGGACCAUUUGAAAUCAGUGUU (hsa-miR-29b1 y 2); o  
UAGCACCAQUUGAAAUCGGUUA (hsa-miR-29c);

5 (en la que la secuencia semilla está subrayada en cada caso);  
o que se diferencia de la secuencia nativa madura en:

- (i) no más de tres posiciones en la secuencia semilla; y
- (ii) no más de cinco posiciones fuera de la secuencia semilla.

10 Por lo tanto la secuencia semilla mimética se diferencia de la secuencia semilla nativa en no más de tres posiciones, por ejemplo, en no más de dos posiciones, por ejemplo en no más de una posición. Preferentemente, la secuencia semilla es idéntica a la secuencia semilla nativa.

15 Adicional o alternativamente, el mimético se diferencia de la secuencia nativa al margen de la secuencia semilla en no más de cinco posiciones, por ejemplo, en no más de cuatro posiciones, no más de tres posiciones, no más de dos posiciones, por ejemplo, en no más de una posición.

20 El mimético de miR-29 puede hibridarse con un segundo oligonucleótido. Como con el miR-29 nativo, se puede hacer referencia al oligonucleótido activo como la "cadena guía" y el oligonucleótido asociado como la "cadena pasajera". Se puede hacer referencia al complejo hibridado como mimético de miR-29 de doble cadena.

25 La secuencia de la cadena pasajera mimética puede ser idéntica a la secuencia de la cadena pasajera nativa o se puede diferenciar de la cadena pasajera nativa en una o más posiciones. Por ejemplo, la secuencia de la cadena pasajera mimética se puede diferenciar de la cadena pasajera nativa en no más de 10 posiciones, no más de 9 posiciones, no más de 8 posiciones, no más de 7 posiciones, no más de 6 posiciones, no más de 5 posiciones, no más de 4 posiciones, no más de 3 posiciones, no más de 2 posiciones o no más de 1 posición.

30 Una de ambas cadenas de un miR-29 mimético de doble cadena puede comprender una protuberancia 3' de 1 o 2 nucleótidos. Por ejemplo, ambas cadenas pueden comprender una protuberancia 3' de dos nucleótidos. Alternativamente, el complejo puede tener extremos truncados en uno o ambos extremos. En algunas realizaciones, la cadena pasajera es de la misma longitud que la cadena guía, o se diferencia en longitud por uno o dos nucleótidos.

35 Un precursor de un miR-29 mimético es cualquier molécula que se puede procesar en la célula diana en un miR-29 mimético como se ha definido anteriormente, normalmente por acción de la enzima Dicer o por la acción secuencial de las enzimas Drosha y Dicer.

40 Por lo tanto, un precursor puede tener una secuencia de oligonucleótido corriente arriba (5') y/o corriente abajo (3') de la secuencia mimética.

45 El precursor puede comprender la secuencia guía del miR-29 mimético conectada por una secuencia bucle a una secuencia pasajero correspondiente que es completa o parcialmente complementaria a la secuencia guía, y en el que el oligonucleótido es capaz de formar una estructura tallo-lazo (u "horquilla") en la que la secuencia guía y la secuencia pasajera se hibridan entre ellas. Dicho oligonucleótido se puede considerar como un pre-mir-29 mimético y es capaz de actuar como un sustrato para la ribonucleasa específica de ARN de doble cadena (enzima RNasa tipo III) Dicer, de esta manera se procesa a un miR-29 mimético de doble cadena, que comprende las cadenas guía y pasajera separadas.

50 La secuencia corriente arriba (5') de la secuencia madura puede tener, por ejemplo, al menos un 50 % de identidad, al menos un 55 % de identidad, al menos un 60 % de identidad, al menos un 65 % de identidad, al menos un 70 % de identidad, al menos un 75 % de identidad, al menos un 80 % de identidad, al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 91 % de identidad, al menos un 92 % de identidad, al menos un 93 % de identidad, al menos un 94 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 % de identidad, al menos un 97 % de identidad, al menos un 98 % de identidad, o al menos un 99 % de identidad con la secuencia humana correspondiente.

60 La secuencia corriente abajo (3') de la secuencia madura puede tener, por ejemplo, al menos un 50 % de identidad, al menos un 55 % de identidad, al menos un 60 % de identidad, al menos un 65 % de identidad, al menos un 70 % de identidad, al menos un 75 % de identidad, al menos un 80 % de identidad, al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 91 % de identidad, al menos un 92 % de identidad, al menos un 93 % de identidad, al menos un 94 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 % de identidad, al menos un 97 % de identidad, al menos un 98 % de identidad, o al menos un 99 % de identidad con la secuencia humana correspondiente.

65

De manera alternativa, el precursor puede ser un pri-mir-29 mimético (es decir, tiene una secuencia adicional corriente arriba (5') y/o corriente abajo (3') de la secuencia del pre-mir-29 mimético) y es posible procesarlo en una secuencia del pre-mir-29 mimético por la ribonucleasa específica de ARN de doble cadena (enzima RNasa tipo III) Droscha.

5 Por ejemplo, la secuencia corriente arriba (5') de la secuencia del miR-29 mimético maduro puede tener, por ejemplo, al menos un 50 % de identidad, al menos un 55 % de identidad, al menos un 60 % de identidad, al menos un 65 % de identidad, al menos un 70 % de identidad, al menos un 75 % de identidad, al menos un 80 % de identidad, al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 91 % de identidad, al menos un 92 % de identidad, al menos un 93 % de identidad, al menos un 94 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 % de identidad, al menos un 97 % de identidad, al menos un 98 % de identidad, o al menos un 99 % de identidad con la secuencia humana correspondiente.

15 La secuencia corriente arriba (5') de la secuencia del pre-mir-29 mimético puede tener, por ejemplo, al menos un 50 % de identidad, al menos un 55 % de identidad, al menos un 60 % de identidad, al menos un 65 % de identidad, al menos un 70 % de identidad, al menos un 75 % de identidad, al menos un 80 % de identidad, al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 91 % de identidad, al menos un 92 % de identidad, al menos un 93 % de identidad, al menos un 94 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 % de identidad, al menos un 97 % de identidad, al menos un 98 % de identidad, o al menos un 99 % de identidad con la secuencia humana correspondiente.

20 La secuencia corriente abajo (3') de la secuencia del miR-29 mimético maduro puede tener, por ejemplo, al menos un 50 % de identidad, al menos un 55 % de identidad, al menos un 60 % de identidad, al menos un 65 % de identidad, al menos un 70 % de identidad, al menos un 75 % de identidad, al menos un 80 % de identidad, al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 91 % de identidad, al menos un 92 % de identidad, al menos un 93 % de identidad, al menos un 94 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 % de identidad, al menos un 97 % de identidad, al menos un 98 % de identidad, o al menos un 99 % de identidad con la secuencia humana correspondiente.

30 La secuencia corriente abajo (3') de la secuencia del pre-mir-29 mimético puede tener, por ejemplo, al menos un 50 % de identidad, al menos un 55 % de identidad, al menos un 60 % de identidad, al menos un 65 % de identidad, al menos un 70 % de identidad, al menos un 75 % de identidad, al menos un 80 % de identidad, al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 91 % de identidad, al menos un 92 % de identidad, al menos un 93 % de identidad, al menos un 94 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 % de identidad, al menos un 97 % de identidad, al menos un 98 % de identidad, o al menos un 99 % de identidad con la secuencia humana correspondiente.

40 El precursor del miR-29 mimético puede tener cualquier longitud que sea adecuada, a condición de que se pueda procesar en miR-29 mimético maduro (sea de cadena sencilla o doble). Por lo tanto el precursor tiene al menos 23 nucleótidos de longitud, y puede tener al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 110, al menos 120, al menos 130, al menos 140, al menos 150, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 350, al menos 400, al menos 450, al menos 500, al menos 1000, al menos 1500 o al menos 2000 nucleótidos de longitud.

45 De manera alternativa, el precursor puede tener un máximo de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 1000, 1500, 2000 o 2500 nucleótidos de longitud.

## 50 Modificaciones estructurales

Además de, o como una alternativa de las modificaciones de secuencia que se exponen anteriormente, un miR-29 mimético o precursor del mismo puede comprender una o más modificaciones estructurales en comparación con un oligonucleótido de ARN.

55 El miR-29 mimético o precursor puede comprender uno o más nucleótidos que comprenden un resto de azúcar modificado, es decir, un resto de azúcar distinto de un resto de ribosa. Ejemplos de dichos restos de azúcar modificados incluyen 2'-O-metil ribosa, 2'-O-metoxietil ribosa, 2'-fluoro ribosa y 4-tio-ribosa, así como azúcares bicíclicos. Los azúcares bicíclicos comprenden normalmente un anillo furanosil con un puente 2',4' (por ejemplo un puente metileno) que limita el anillo a la endo configuración C3'. Se hace referencia a un nucleótido que contiene un azúcar bicíclico a menudo como un resto de ácido nucleico bloqueado ("LNA").

65 El miR-29 mimético o precursor puede contener individualmente uno o más de cualquiera de estos tipos de restos de azúcar modificados. Por ejemplo, el mimético puede contener uno, dos, tres, cuatro, cinco, hasta 10, hasta 15, hasta 20 o incluso más restos de azúcar modificados. En ciertas realizaciones, todos los nucleótidos comprenden un resto de azúcar modificado.

Adicional o alternativamente, el miR-29 mimético o precursor puede comprender una o más modificaciones de la matriz, por ejemplo, un enlace internucleósido modificado.

5 Por lo tanto, se pueden unir uno o más nucleótidos adyacentes mediante un resto de unión alternativo en vez de un resto fosfato.

Puede ser particularmente deseable que esté presente un enlace internucleósido modificado en uno o ambos extremos del miR-29 mimético, es decir entre el nucleótido del extremo 5' y el nucleótido adyacente, y/o entre el nucleótido del extremo 3' y el nucleótido adyacente.

10 Los restos adecuados para su uso como enlaces internucleósidos incluyen los restos fosforotioato, morfolino y fosfonocarboxilato, así como restos de siloxano, sulfuro, sulfona, acetilo, formacetilo, tioformacetilo, formacetilo de metileno, tioformacetilo, alquenilo, sulfamato, metilimino, metilenoimidazina, sulfonato y sulfonamida.

15 En un resto de fosforotioato, se reemplaza un átomo de oxígeno no puenteado con un átomo de sulfuro. los grupos fosforotioato pueden promover la unión a la proteína sérica y pueden así mejorar la distribución y biodisponibilidad *in vivo* del mimético. Esto puede ser deseable si el mimético se va a administrar sistémicamente al receptor.

20 Adicional o alternativamente, el miR-29 mimético o precursor puede comprender una o más bases modificadas como alternativas a la adenina, citosina, guanina y uracilo de origen natural. Dichas bases modificadas incluyen 5-metilcitosina (5-me-C9), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina y otros derivados alquilo de bases pirimidínicas, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo,  $\alpha$ -amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halo (que incluyen 5-bromo, 5-trifluorometil y otros uracilos y citosina sustituidos en 5), 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

30 Se ha sugerido que cuanto más pesadamente se modifique la cadena pasajera, menos probable es que se incorpore en el complejo RISC, y por lo tanto más eficaz será la cadena guía. Por lo tanto, incluso aunque la cadena guía sea de un miR-29 nativo, puede ser deseable que la cadena pasajera comprenda una o más modificaciones, por ejemplo, uno o más restos de azúcar modificados, uno o más enlaces internucleósidos modificados, y/o una o más bases modificadas.

35 Adicional o alternativamente, un miR-29 mimético o precursor puede comprender un resto de tránsito de membrana, para facilitar el tránsito a través de la membrana plasmática de la célula diana. Este resto puede ser un lípido adecuado u otro resto graso, incluyendo, pero sin limitarse a restos de colesterol y estearoil.

40 Otros restos de tránsito de membrana incluyen péptido penetrantes de la célula ("CPP", tales como TAT y MPG del VIH-1, penetratina, poliarginina) y péptido fusogénicos (por ejemplo, derivados endodominio de la envoltura del VIH-1 (HGP) o gripe, péptido fusogénico (dilNF-7)). El resto de tránsito de membrana se puede conjugar con una molécula de vehículo que no está asociada covalentemente con el propio miR-29 mimético o precursor. De manera alternativa el resto de tránsito de membrana se puede conjugar con el propio miR-29 mimético o el precursor.

45 El resto de tránsito de membrana puede conjugarse con cualquiera de la cadena guía o la cadena pasajera, aunque se prefiere la cadena pasajera, y que no altera la función de la cadena guía. La conjugación en cualquiera de los extremos 5' o 3' suele preferirse, aunque también es posible la conjugación con un resto interno.

50 Para evitar cualquier duda, una molécula de miR-29 (es decir que no posee de otra manera ninguna diferencia estructural o de secuencia con la molécula nativa) se podría considerar como un miR-29 mimético o precursor cuando se une a un resto de tránsito de membrana.

Un ejemplo de un miR-29 mimético es la cadena guía:

55 5'- rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArUrCrGrGmUmumA -3'

donde "r" indica un azúcar ribosa y "m" indica 2'-O-metil ribosa.

60 La cadena guía puede ser parte de un miR-29 mimético de doble cadena en combinación con una cadena pasajera. Ejemplos de cadenas pasajeras adecuadas son:

5'mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmCrGmCrUA-3'

y

65

5'-mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUmAdG-3'

Suministro de miR-29, miméticos y precursores

Se pueden proporcionar composiciones en las que se asocian miR-29, miméticos y precursores con (por ejemplo, forman complejos o se encapsulan por) un vehículo adecuado.

5 Los vehículos adecuados incluyen lípidos y polímeros farmacéuticamente aceptables, y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la composición puede tener la forma de liposomas, vesículas lipídicas, complejos lipídicos o complejos de polímeros.

10 Por ejemplo, las vesículas lipídicas y liposomas son particular lipídicas con bicapa que tienen un centro acuoso que contiene la carga de oligonucleótido.

15 Los complejos lipídicos (o "lipoplejos") y los complejos de polímeros ("poliplejos") contienen normalmente lípidos o polímeros cargados positivamente que interactúan con los oligonucleótidos cargados negativamente para formar complejos.

20 Los polímeros o lípidos catiónicos pueden interactuar también con moléculas cargadas negativamente en la superficie de las células diana. Mediante la elección adecuada de lípidos y grupos de cabeza, se pueden hacer a medida los complejos para que faciliten la fusión con la membrana plasmática de la célula diana o con una membrana interna seleccionada (tal como la membrana endosómica o la membrana nuclear) para facilitar el suministro de la carga de oligonucleótido en el compartimento sub-celular adecuado. El suministro genético mediante lipoplejos o poliplejos se revisa, por ejemplo, por Tros de Iarduya et al. en Eur. J. Pharm. Sci. 40 (2010) 159-170.

25 Las emulsiones lipídicas neutras también se pueden utilizar para formar complejos particulados con miARN que tienen diámetros del orden de nanómetros.

30 Los lípidos adecuados se pueden seleccionar por el experto en la técnica dependiendo de la aplicación, carga y la célula diana. Se pueden utilizar lípidos simples, o, más comúnmente, combinaciones de lípidos.

Los lípidos adecuados se describen, por ejemplo, en el documento WO2011/088309 y las referencias que se citan en el mismo, e incluyen:

35 - Lípidos neutros y fosfolípidos, tales como esfingomiélin, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoil fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, dilinaoleoilfosfatidilcolina, fosfatidilcolina (PC), 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), lecitina, fosfatidiletanolamina (PE), lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, esfingomiélin (SM), cardiolipina, ácido fosfatídico, 1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE), 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC), 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DMPE), 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), dipalmitololeoil-PE, difitanoil-PE, DSPE, dilaidoil-PE, dilinaoleoil-SM, y dilinaoleoil-PE;

45 - esteroides, por ejemplo, colesterol

50 - lípidos modificados por polímeros, por ejemplo, lípidos modificados con polietilenglicol (PEG), incluyendo fosfatidiletanolamina modificada por PEG y ácido fosfatídico, conjugado de ceramida-PEG, dialquilaminas modificadas por PEG, y 1,2-diaciloxipropan-3-aminas modificadas con PEG. Particularmente adecuados son los dialciligliceroides y dialquilgliceroides modificados con PEG, por ejemplo, PEG-dimiristoil glicerol (PEG-DSG) y PEG-carbamoil-1,2-dimiristiloxipropilamina (PEG-cDMA);

55 - lípidos catiónicos tales como cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio ("DODAC"); cloruro de N-(2,3-dioleiloil)propil-N,N,N-trietilamonio ("DOTMA"); bromuro de N,N-distearil-N,N-dimetilamonio ("DDAB"); cloruro de N-(2,3-dioleiloil)propil N,N,N-trimetilamonio ("DOTAP"); sal de cloruro de 1,2-Dioleiloil-3-trimetilaminopropano ("DOTAP.Cl"); 3β-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol ("DC-Col"), N-(1-(2,3-dioleiloil)propil)-N-2-(esperminocarboxamido)etil-N,N-dimetilamonio trifluoracetato ("DOSPA"), dioctadecilamidoglicil carboxiespermina ("DOGS"), 1,2-dioleil-sn-3-fosfoetanolamina ("DOPE"), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio propano ("DODAP"), N,N-dimetil-2,3-dioleiloil)propilamina ("DODMA"), bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietil amonio ("DMRIE"), 1,2-dilinoileiloxi-3-dimetilaminopropano (DLinDMA) 1,2-Dilinoileil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1-Linoileil-2-linoileiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMAP), 1,2-Dilinoileilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-Dilinoileil-3-dimetilamino-propano (DLin-S-DMA), y 2,2-Dilinoileil-4-10 dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA). Las preparaciones comerciales de lípidos catiónicos incluyen la Lipofectina™ (que comprende DOTMA y DOPE, disponible en Gibco/BRL), y Lipofectamina™ (que comprende DOSPA y DOPE, disponible en Gibco/BRL).

65

- los lípidos aniónicos incluyen, fosfatidilglicerol, cardiolipina, diacilfosfatidilserina, ácido diacilfosfatídico, N-dodecanoil fosfatidiletanolamina, N-succinil fosfatidiletanolamina, N-glutaril fosfatidiletanolamina y lisilfosfatidilglicerol.

5 El documento WO/0071096 describe diferentes formulaciones, tales como el DOTAP:colesterol, o una formulación derivada de colesterol que se puede utilizar eficazmente para el suministro de oligonucleótidos.

Una composición disponible en el comercio capaz de conseguir un buen suministro de miARN en los pulmones es la emulsión lipídica neutra MaxSuppressor *in vivo* RNALancerII (BIOO Scientific, Austin, TX) que consiste en 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina, aceite de escualeno, polisorbato 20 y un antioxidante. Formando un complejo con miARN sintéticos, forma nanopartículas de un diámetro en el intervalo de nanómetros.

Los polímeros adecuados incluyen histonas y protaminas (y otras proteínas de unión al ADN), poli(etilenoimina) (PEI), dendrímeros catiónicos tales como dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM), 2-dimetil(aminoetil) metacrilato (pDMAEM), poli(L-lisina) (PLL), polímeros basados en carbohidratos tales como el quitosano, etc... Véase, Tros de Ildruya et al. en Eur. J. Pharm. Sci. 40 (2010) 159-17 como revisión.

También se pueden utilizar proteínas y péptidos tales como el atelocolágeno. El atelocolágeno es una forma hidrosoluble del colágeno producido por tratamiento con proteasas, en particular el colágeno tipo I tratado con pepsina de la dermis de ternera.

También se pueden utilizar ciclodextrinas para el suministro.

#### Agentes de direccionamiento

25 Las moléculas de vehículo también pueden albergar agentes de direccionamiento capaces de unirse a la superficie de la célula diana. Por ejemplo, el agente de direccionamiento puede ser una pareja de unión específica, capaz de unirse específicamente en una molécula que se expresa en la superficie de una célula tendinosa diana. Las parejas de unión adecuadas incluyen anticuerpos y similares, dirigidos contra moléculas de superficie celular, o ligandos o receptores de dichas moléculas de superficie celular. Los marcadores de superficie que pueden ayudar al direccionamiento de las células tendinosas incluyen la Tenascina C, CD55 y tenomodulina.

El término "par de unión específica" se utiliza para describir un par de moléculas que comprenden un miembro de unión específico (sbm) y una pareja de unión (bp) que tienen especificidad particular entre ellas y que en condiciones normales se unen entre ellas de preferencia para unirse a otras moléculas. Ejemplos de parejas de unión específica son los anticuerpos y sus epítopos/antígenos equivalentes, ligandos (tales como hormonas, etc.) y receptores avidina/estreptavidina y biotina, lecitinas y carbohidratos, y secuencias de nucleótidos complementarias.

Se sabe bien que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden llevar a cabo la función de unirse a antígenos. Ejemplos de los fragmentos de unión funcionales son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un anticuerpo sencillo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en el que el dominio VH y el dominio VL están unidos por un péptido enlazador que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird et al, Science, 242, 423-426, 1988; Huston et al, PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988); (viii) dímeros de Fv de cadena sencilla biespecíficos (documento PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión genética (documento WO94/13804; P. Holliger et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993).

50 Como los anticuerpos se pueden modificar de varias maneras, el término "anticuerpo" debería por lo tanto considerarse como que cubre cualquier sustancia de unión específica que tenga un dominio de unión con la especificidad necesaria. Por lo tanto, este término cubre los fragmentos de anticuerpo descritos anteriormente, así como derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión de inmunoglobulinas, sea natural o sintética. Las moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión de inmunoglobulina o un equivalente, fusionado a otro polipéptido se incluyen por lo tanto. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023.

60 Las alternativas a los anticuerpos están cada vez más disponibles. Las llamadas "proteínas de afinidad" o "armazones proteicos modificados" se pueden hacer a medida de manera rutinaria para la afinidad contra una diana en particular. Normalmente están sobre un armazón proteico no inmunoglobulina con un centro rígido o conformacionalmente estable, que se ha modificado para que tenga afinidad por la diana. La modificación puede incluir la sustitución de uno o más restos de superficie, y/o la inserción de uno o más restos de superficie del armazón proteico. Por ejemplo, se puede insertar un péptido por afinidad por la diana en un bucle de superficie del armazón proteico o se puede sustituir una parte o todo el bucle de superficie del armazón proteico. Los armazones

adecuados y sus equivalentes modificados incluyen:

- BPTI, LAC-DI, ITI-D2 (dominios de armazones de Kunitz);
- ETI-II, AGRP (Knottin);
- 5 - tiorredoxina (aptámero peptídico);
- Fn3 (AdNectina);
- lipocalina (BBP) (Anticalina);
- repetición de anquirina (DARPin);
- dominio Z de la proteína A (Aficuerpo);
- 10 - gamma-B-cristalina/ubiquitina (Afilina);
- dominio-LDLR-A (Avimer).

Véase, por ejemplo, Gebauer, M y Skerra, A, *Current Op. Chem. Biol.* 2009, 13: 245-255, y Friedman, M y Stahl, S, *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2009) 53: 1-29, y las referencias citadas en el mismo.

15

#### Ácidos nucleicos que codifican miR-29, miméticos y precursores

Como alternativa para suministrar oligonucleótidos miR-29, miméticos y precursores directamente a una célula diana, es posible suministrar un ácido nucleico que codifica un oligonucleótido miR-29, un mimético del mismo o precursores de cualquiera, a la célula diana, de manera que el miR-29, el mimético o el precursor se exprese en la célula diana, Dicha estrategia se puede considerar como una "terapia genética".

20

Será evidente fácilmente para el experto que los ácidos nucleicos solo pueden utilizarse para codificar miR-29, miméticos y precursores de los mismos compuestos de ARN, es decir, compuestos de los cuatro nucleótidos de origen natural que componen el ARN, sin bases, azúcares o enlaces internucleósidos modificados.

25

El ácido nucleico normalmente comprende una construcción de expresión, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el oligonucleótido miR-29, mimético o precursor, unida operativamente a secuencias reguladoras para facilitar la expresión. Las secuencias reguladoras se pueden seleccionar dependiendo de la célula diana, pero normalmente incluirán un promotor apropiado y opcionalmente un amplificador que dirigen la transcripción por la ARN polimerasa II, así como un terminador de la transcripción (que incluye normalmente una señal de poliadenilación).

30

El promotor puede ser un promotor específico de tejido, que dirige la transcripción preferente o exclusivamente en la célula o tejido diana en comparación con otros tipos de células o tejidos.

35

por lo tanto, el promotor puede ser un promotor que dirija la transcripción preferente o exclusivamente en las células tendinosas. El promotor del colágeno 1a1 (col1a1) puede ser un promotor adecuado.

#### 40 Suministro de ácidos nucleicos a las células diana

Los ácidos nucleicos que codifican los miR-29, miméticos y precursores se pueden suministrar por cualquier vía conveniente.

45 Los métodos para suministrar un ácido nucleico a las células *in vitro* incluyen la precipitación en fosfato cálcico, DEAE-dextrano, electroporación, microinyección, liposomas cargados por ADN, sonicación y bombardeo utilizando microproyectiles revestidos de ácido nucleico (por ejemplo, microperlas de oro o tungsteno). Varias de estas técnicas se han adaptado satisfactoriamente para su uso *in vivo* y *ex vivo*.

50 Por lo tanto, el ácido nucleico se puede administrar en forma desnuda, asociado con (por ejemplo, formando complejos o encapsulados por) un vehículo apropiado tal como un polímero o lípido (como se ha descrito en otro sitio de la presente memoria descriptiva), o revistiendo una superficie de una partícula. En dichas realizaciones, normalmente el ácido nucleico es ADN. El ácido nucleico o vehículo puede comprender también un resto de direccionamiento o un resto de transporte en la membrana como se ha descrito en otra parte de la presente memoria descriptiva. Cualquiera de estos métodos se puede adaptar también como sea apropiado para el suministro de los propios miR 96, precursores y miméticos.

55

60 El ácido nucleico normalmente tiene la forma de un vector de expresión. El experto será capaz de diseñar vectores de expresión de ácidos nucleicos adecuados para su uso terapéutico (así como otros usos descritos en la presente memoria descriptiva). Los vectores contendrán normalmente una construcción de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica el miR-29, mimético o precursor, en unión operativa con secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras y secuencias de terminación de la transcripción, opcionalmente combinadas con secuencias amplificadoras, marcadores genéticos y otras secuencias dependiendo de la aplicación particular. Puede pretenderse que los vectores se integren en el cromosoma de la célula huésped, o pueden existir y replicarse independientemente de los cromosomas del huésped como un episoma, por ejemplo, un plásmido.

65

De manera alternativa, se puede utilizar un vector vírico para suministrar el ácido nucleico.

Se puede emplear cualquier vector vírico como vehículo de suministro genético. Estos incluyen vectores adenovíricos, virus adeno-asociados (AAV), retrovirus (especialmente lentivirus) y herpesvirus. Los adenovirus y lentivirus pueden ser particularmente preferidos ya que tienen la capacidad de conseguir la expresión de los genes suministrados en células que no se están dividiendo en ese momento.

El vector vírico normalmente comprende proteínas estructurales víricas y una carga útil de ácido nucleico que comprende la construcción de expresión deseada en una forma funcional para expresar el gen en la célula o tejido diana. Por lo tanto, normalmente el gen está unido operativamente a un promotor y otras señales reguladoras de la transcripción apropiadas.

En los vectores adenovíricos, la carga útil de ácido nucleico es una molécula de ADN de doble cadena (dsADN). En los vectores retrovíricos, es normalmente un ARN de cadena sencilla.

La carga útil de ácido nucleico contiene elementos adicionales necesarios para empaquetarse en el vehículo de suministro genético y se procesa apropiadamente en la célula o tejido diana.

Para los vectores adenovíricos, pueden incluir secuencias de repetición terminal invertida (ITR) adenovíricas y una señal de empaquetamiento apropiada.

Para los vectores retrovíricos, incluyen secuencias terminales características (denominadas secuencias "R-U5" y "U3-R") y una señal de empaquetamiento. Las secuencias terminales hacen posible la generación de secuencias de repetición directas ("repeticiones terminales largas" o "LTR") en cualquier extremo del provirus que resulta de la transcripción inversa, lo cual facilita entonces la integración del provirus en el genoma de la células huésped y la expresión directa posterior.

La carga útil de ácido nucleico también puede contener un marcador genético, es decir, un gen que codifica un producto que permite la fácil detección de las células transducidas. Los ejemplos incluyen genes para proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP), enzimas que producen un producto de reacción visible (por ejemplo, beta-galactosidasa, luciferasa) y genes de resistencia a antibióticos.

El vector vírico normalmente no es competente para la replicación. Esto quiere decir que la carga útil de ácido nucleico no contiene todos los genes víricos (y otros elementos genéticos) necesarios para la replicación vírica. El vector vírico contendrá no obstante todos los de las proteínas estructurales y actividades enzimáticas necesarias para la introducción de la carga útil en la célula huésped y para el procesamiento apropiado de la carga útil de manera que se pueda expresar el miR-29, mimético o precursor.

Por lo tanto, para un vector adenovírico, la carga útil de ácido nucleico normalmente carece de uno o más genes adenovíricos funcionales de las regiones E1, E2, E3 o E4. Estos genes pueden eliminarse o inactivarse de otra manera, por ejemplo, por inserción de una unidad de transcripción que comprende el gen heterólogo o un marcador genético.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico contiene genes no funcionales. Por lo tanto, para un vector adenovírico, los únicos componentes víricos presentes pueden ser las ITR y la señal de empaquetamiento.

Se pueden preferir los ácidos nucleicos que no tienen genes víricos funcionales, ya que se reduce el riesgo de una respuesta inmunitaria del huésped que se desarrolla contra la célula o tejido transducidos como resultado de la síntesis de proteínas víricas.

Los vectores víricos se pueden modificar de manera que posean proteínas de superficie modificadas capaces de unirse a marcadores en la célula diana, aumentando de esta manera la posibilidad de que se transducirá la célula diana deseada y reduciendo la probabilidad de transducción no específica de otros tipos de células y tejidos. A veces se hace referencia a esta estrategia como pseudotipaje. Por lo tanto el vector vírico puede comprender una proteína de superficie capaz de unirse a un marcador de superficie en una célula tendinosa. Los marcadores de superficie que pueden ayudar al direccionamiento a las células tendinosas incluyen la Tenascina C y CD55.

### El tendón y daño del tendón

Los tendones son el tejido conjuntivo que une el músculo al hueso. Permiten que la transmisión de fuerza de un músculo en contracción se extienda en la estructura esquelética unida a una distancia del propio músculo<sup>1</sup>.

Los tendones son un tejido organizado sistemáticamente, complejo y comprende varias capas distintas.

El propio tendón es un compuesto más o menos uniaxial que comprende alrededor de un 30 % de colágeno y un 2 % de elastina (por peso húmedo), embebidos en una matriz extracelular que contiene distintos tipos de células,

sobre todo tenocitos<sup>3</sup>.

El colágeno predominante es el colágeno tipo I, que tiene un gran diámetro (40-60 nm) y se une en conjunto para formar manojos apretados de fibras. También está presente el colágeno tipo 3 y es menor de diámetro (10-20 nm), formando manojos reticulares más sueltos.

El colágeno se organiza (en complejidad creciente) en fibrillas, fibras, manojos de fibras y fascículos, rodeados por una capa de matriz de tejido conjuntivo, rica en lípidos y colágenos, laxa conocida como endotendón<sup>4</sup>. Una capa del mismo material, llamada epitendón, cubre la superficie del tendón completo. Rodeando el epitendón hay un tejido conjuntivo llamado paratendón que contiene fibrillas de colágeno tipo 1 y tipo 3, algunas fibrillas elásticas y una capa de células sinoviales. Algunos tendones están rodeados adicionalmente por una vaina tendinosa.

Los tipos celulares principales en el tendón son los tenocitos y tenoblastos, las cuales son ambas células tipo fibroblasto<sup>14</sup>. Ambos tipos de células son importantes en el mantenimiento de un tendón sano, ya que ambas producen colágeno y mantienen la matriz extracelular<sup>15</sup>. Por lo tanto, la expresión "célula tendinosa" como se utiliza en la presente memoria descriptiva engloba tanto tenocitos como tenoblastos.

Los tenocitos son células planas, ahusadas, con forma de huso longitudinalmente, y estrelladas en la sección transversal, y se detectan en pequeñas cantidades en filas entre las fibras de colágeno. Tienen procesos celulares elaborados que forman una red tridimensional que se extiende a lo largo de la matriz extracelular, se comunican mediante procesos celulares, y pueden ser móviles.

Los tenoblastos son precursores de tenocitos. Son células con forma de huso o estrelladas con núcleos ahusados, largos, planos, eosinófilos. Son móviles y altamente proliferativos.

Durante el desarrollo embrionario, los tenoblastos y por tanto los tenocitos se originan de compartimentos mesodérmicos, como lo hacen los mioblastos esqueléticos, condrocitos, y osteoblastos<sup>16</sup>. Algunas de las células progenitoras mesenquimáticas multipotenciales que se originan de estos compartimentos expresan el factor de transcripción básico hélice-bucle-hélice, la escleraxis. Sin embargo, una vez que se dedican a convertirse en células que dan lugar a un tejido específico, solo los tenoblastos y tenocitos mantienen la capacidad para expresar escleraxis. El gen de la escleraxis es por lo tanto el primer gen principal que se ha descubierto como esencial para el establecimiento del linaje tendinoso durante el desarrollo. La tenomodulina es una glicoproteína transmembrana de tipo II inducida en tendones de ratón en una fase tardía del desarrollo (día embrionario [E] 17,5) y también se observa en tendones de adultos. Por lo tanto la escleraxis representa un marcador para tenoblastos y tenocitos, mientras que la tenomodulina es un marcador de superficie de tenocitos maduros<sup>19</sup>.

El daño del tendón se puede producir o se asocia con numerosos factores que incluyen (pero no se limitan a) trauma externo, tensión mecánica (incluyendo el sobre-uso), degeneración, inflamación y combinaciones de estos, al que se hace referencia a menudo como "tendinopatía".

La expresión "lesión tendinosa" se utiliza en general para referirse a la lesión aguda debido a un único evento traumático, que incluye el trauma externo y la rotura del tendón (es decir, el fallo completo del tendón).

La tendinopatía es multifactorial, tiene un espectro desde aguda a crónica, y se asocia a menudo con el sobre-uso del tendón, que puede ser instantáneo o durante un periodo de tiempo extenso. La tendinopatía puede implicar la degeneración u otros tipos de daño mecánico del colágeno a un nivel microscópico o macroscópico (a la que a veces se hace referencia como "tendinosis"), inflamación, o una combinación de ambos (al que a veces se hace referencia como "tendinitis").

Las propiedades biomecánicas del tendón, especialmente su fuerza de tensión, se relacionan con el área del corte transversal (es decir, el espesor), el contenido de colágeno, la relación entre los diferentes tipos de colágeno. Después de la lesión aguda, durante la tendinopatía y durante la cicatrización del daño tendinoso, se produce un cambio en la síntesis de colágeno, desde el colágeno tipo 1 hacia el colágeno tipo 3. La síntesis de colágeno tipo 1 puede volver a niveles normales después de una caída inicial, pero el aumento persistente en la síntesis del tipo 3 da lugar a un desequilibrio en la relación de colágeno. Esto tiene un efecto significativo y perjudicial en las propiedades biomecánicas del tendón. En particular, reduce la fuerza de tensión del tendón, reduciendo su fuerza de fallo final y por tanto haciendo que tienda más a la rotura posterior.

Los métodos de la invención se pueden aplicar a cualquier tendón dañado. Los tendones principales afectados por tendinopatías en seres humanos son el tendón de Aquiles, el tendón del supraespinoso, el tendón flexor común y el tendón extensor común. El tendón principal afectado por tendinopatía en los sujetos equinos es el tendón flexor superficial. Estos pueden representar dianas particularmente significativas para el tratamiento.

Aplicación terapéutica de miR-29, miméticos y precursores

Los inventores han descubierto que, aumentando la actividad del miR-29 en las células tendinosas, es posible alterar el balance de colágeno a favor de la síntesis de colágeno tipo y lejos de la síntesis de colágeno tipo 3.

5 Por lo tanto, la invención proporciona métodos para modular la cicatrización de un tendón mediante la aplicación terapéutica. Los métodos descritos en esta memoria descriptiva pueden considerarse como métodos para la modulación de la composición relativa y/o síntesis de colágeno en el tendón, en particular el contenido y síntesis relativa de colágeno tipo 1 y tipo 3 en el tendón. Se cree que el balance que se va a modular en favor del colágeno tipo 1, es decir, el aumento de síntesis de colágeno 1 o contenido en el tendón con respecto al colágeno tipo 3. Se apreciará que esto no implica necesariamente un aumento neto de síntesis o contenido de colágeno tipo 1, ya que el miR-29 puede inhibir la síntesis de colágeno tipo 1. Sin embargo, la síntesis de colágeno tipo 3 se inhibe con mayor extensión que la del colágeno tipo 1.

15 A un nivel fisiológico, los metidos descritos en la presente memoria descriptiva se pueden considerar como métodos para la modulación de las propiedades biomecánicas del tendón, preferentemente que mejora las propiedades biomecánicas del tendón, por ejemplo, mejorando o aumentando la fuerza de tensión del tendón.

20 Los métodos de la invención se pueden aplicar en cualquier estadio de tendinopatía, o en cualquier estadio del proceso de cicatrización de un tendón lesionado. Por ejemplo, los métodos se pueden utilizar para modular la relación de colágeno, por lo tanto las propiedades biomecánicas del tendón, durante la cicatrización de la tendinopatía o durante la cicatrización de una lesión tendinosa aguda tal como un tendón roto.

25 Por lo tanto, los métodos de la invención se pueden considerar igualmente como métodos para el tratamiento del daño tendinoso, incluyendo al daño resultante de la lesión tendinosa y tendinopatía.

30 Se puede observar la IL-33 en el tendón durante un corto periodo después de la lesión y en los estadios tempranos de tendinopatía. Sin el deseo de quedar ligados por ninguna teoría en particular, la IL-33 puede estar implicada en el cambio de la síntesis de colágeno del tipo 1 al tipo 3. Sin embargo, se cree que el desequilibrio en la síntesis de colágeno persiste después de la implicación de IL-33 inicial. Los métodos de la invención no están restringidos al tratamiento en los estadios tempranos de la lesión tendinosa, pero son igualmente aplicables al estadio tardío de la lesión o enfermedad, por ejemplo, tendinopatía crónica.

35 Por lo tanto, el tratamiento se puede administrar en cualquier estadio después de la aparición de los síntomas o después de un evento traumático que produzca un daño al tendón. Por ejemplo, el tratamiento se puede administrar 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o más después de la aparición de los síntomas o un evento traumático. Se puede administrar, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más después de la aparición de los síntomas o un evento traumático. Se puede administrar 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o más después de la aparición de los síntomas o un evento traumático.

40 Sujetos para el tratamiento

45 Aunque los sujetos más comunes para el tratamiento serán seres humanos, los métodos de la invención se pueden extender a cualquier otro mamífero, incluyendo otros primates (especialmente grandes monos tales como gorilas, chimpancés y orangutanes, pero también en monos del viejo mundo y nuevo mundo) así como roedores (incluyendo ratones y ratas), y otros animales de laboratorio, domésticos y agrícolas (incluyendo pero sin limitarse a conejos, perros, gatos, caballos, vacas, ovejas, cabras, etc.).

50 Los métodos pueden aplicarse particularmente a sujetos equinos, es decir, caballos. Los caballos, y especialmente los caballos purasangre tales como los caballos de carreras, tienen tendencia particularmente a las lesiones tendinosas. Dado el valor de muchos de los animales de referencia, hay una necesidad de alto nivel de tratamientos eficaces.

55 Composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento

60 Las moléculas descritas en el presente documento se pueden formular en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender, además de uno de las sustancias anteriores, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizante farmacéuticamente aceptables u otros materiales bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichos materiales no deberían ser tóxicos y no deberían interferir en la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material puede depender de la vía de administración, por ejemplo, vía oral, intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular e intraperitoneal. Ejemplos de composiciones y métodos adecuados de administración se proporcionan en Esseku y Adeyeye (2011) y Van der Mooter G. (2006).

65 Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, polvos o líquido. Un comprimido puede incluir un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente incluyen un vehículo líquido tal como agua, vaselina, aceites animales o

vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Se pueden incluir solución salina fisiológica, solución de dextrosa u otra solución sacarídica o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

5 Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o la inyección en el sitio de la lesión, el principio activo estará en forma de una solución acuosa aceptable parenteralmente que esté libre de pirógenos y tiene un pH adecuado, isotonicidad y estabilidad. Los expertos en la técnica relevante son bien capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como la solución para inyección de cloruro sódico, solución para inyección de Ringer, solución para inyección de lactato de Ringer. Se pueden incluir conservantes, estabilizantes, tampones, oxidantes y/u otros aditivos, según se necesite.

10 En vista de la naturaleza localizada de las afecciones que se van a tratar, la administración por inyección local puede ser particularmente adecuada. La inyección se puede suministrar en el tendón afectado o en la vecindad inmediata del tendón afectado.

15 Cualquiera que sea la naturaleza del agente activo que se va a dar a un individuo (por ejemplo, una célula, polipéptido, molécula de ácido nucleico, otro agente farmacéuticamente útil de acuerdo con la presente invención), la administración es preferentemente en una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según pueda ser el caso, aunque la profilaxis puede considerarse una terapia), que sea suficiente para mostrar un beneficio al individuo. La cantidad actual que se administre, y la tasa y curso de la administración, dependerá de la naturaleza y gravedad de lo que se trate. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones de dosificación, etc., es responsabilidad de los médicos generales y otros doctores médicos y veterinarios clínicos, y normalmente se tienen en cuenta el trastorno que se va a tratar, la afección del paciente individual, el sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por los clínicos. Ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª Edición, 2000, pub. Lippincott, Williams y Wilkins.

La invención se describirá ahora con más detalle, a modo de ejemplo y sin limitación, por referencia a los dibujos y ejemplos adjuntos.

### 30 Descripción de los dibujos

#### Figura 1: expresión de IL-33/ST2 en tendones.

35 Expresión genéticas (A) IL-33, (B) ST2 soluble (sST2) y (C) ST2 de membrana (mST2) en muestras de tendones. Veces de cambio de expresión genética de IL-33, ST2 soluble, de membrana en controles (n = 10), en muestras de tendones humanos del supraespinatus rasgado y el subscapularis equivalente (n = 17). Los puntos de datos muestran la expresión relativa en comparación con el gen constitutivo 18S (media de análisis duplicados). La media  $\pm$  SD refleja las comparaciones de la población de pacientes por ensayo-t. (D) Valoración de Bonar Modificada para las muestras de tendones mostrando la media y SEM. n = 10 para tendones control (Ctl), n = 17 para tendones rasgados y tendinopatía temprana. El sistema de valoración de Bonar modificado representa la valoración media por muestra basándose en 10 campos de alta potencia. 0 = sin tinción, 1 = <10 %, 2 = 10-20 %, 3 = >20 % de tinción + de células por campo de alta potencia. (E) Veces de cambio de la expresión genética de IL-33, y ST2, 24 horas después de la incubación con dosis respectivas de TNF $\alpha$  solo, IL-13 sola y en combinación. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SD de muestras por triplicado y a su vez, son experimentos representativos llevados a cabo en tres muestras de pacientes individuales. \* p<0,05, \*\* p<0,01 en comparación con las muestras de control. (F) veces de cambio de la expresión genética de *col1* y *col3* con 50 y 100 ng/ml de rhIL-33 24 horas tras la incubación. (G) Tiempo de curso para la expresión genética de *col1* y *col3* después de la incubación con 100 ng/ml de IL-33. (H) Expresión proteica de colágeno 1 y 3, 24 horas tras la incubación con concentraciones crecientes de rhIL-33. Para F, G y H, se muestran los datos como la media  $\pm$  SD en muestras por triplicado y a su vez son representativas de experimentos llevados a cabo en tres muestras de pacientes individuales. \* p<0,05, \*\* p<0,01 en comparación con las muestras de control.

#### 55 Figura 2: Eje IL-33/ST2 en cicatrización tendinosa *in vivo*

60 (A, B) Expresión genética de IL-33 y expresión genética de ST2 soluble los Días 1, 3, 7 y 21 tras la lesión. Los datos que se muestran son la media de veces de cambio  $\pm$  SD (datos agrupados de 4 ratones por grupo llevados a cabo en cuatro ocasiones secuenciales por tanto n = 16 por afección) \* p<0,05, \*\* p<0,01 del control frente a los ratones lesionados. (C, D) niveles de ARNm *col1* y proteína de colágeno 1 en TS y ST2 -/- tras la lesión los Días 1 y 3 tras la lesión. (E, F) niveles de proteína de ARNm *col3* y proteína colágeno 3 en TS y ST2 -/- los días 1 y 3 tras la lesión. Los datos que se muestran son la media  $\pm$  SD de muestras por duplicado y son representativas de experimentos utilizando cuatro ratones por afección (n = 16). \* p<0,05, \*\* p<0,01 del control frente a ratones lesionados. + p<0,05, ++ p<0,01 de ratones TS lesionados frente a ST2 -/- lesionados. (G) porcentaje de cambio en la fuerza del tendón para tendones lesionados y no lesionados de TS y ST2 -/- los días 1 y 3 tras la lesión. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SD y son representativas de los experimentos utilizando cuatro ratones por afección (n = 16). \* p<0,05, \*\* p<0,01 ratones de control frente

lesionados. # p<0,05 ST2<sup>-/-</sup> ratones lesionados frente a WT lesionados.

**Figura 3: productor de promotores IL-33 de colágeno 3 y fuerza tendinosa reducida mientras que el IL-33 atenúa estos cambios en el daño tendinosos *in vivo***

5 (A) ARNm col1, (B) proteína colágeno 1, (C) ARNm col3 y (D) proteína colágeno 3 en ratones TS y ST2<sup>-/-</sup> tratados con rhIL-33 el Día 1 tras la lesión. Se muestran los datos como la media ± SD de muestras duplicadas y son representativos de los experimentos utilizando 4 ratones por grupo (n = 16). \*\* p<0,01, ratones lesionados frente a no lesionados. + p<0,05 ratones TS frente a ST2<sup>-/-</sup>. (E) porcentaje de cambio en la fuerza tendinosa en ratones no lesionados de TS los días 1 y 3 después del tratamiento con rhIL-33. Los datos se muestran como la media ± SD y son representativos de los experimentos utilizando cuatro ratones por grupo (n = 16). \*\* p<0,01, ratones lesionados frente a no lesionados. (F) ARNm col1, (G) proteína colágeno 1, (H) ARNm col3 y (I) niveles proteicos de colágeno 3 después del tratamiento con anti-IL-33 los días 1 y 3 después de la lesión tendinosa en ratones de TS. (J) cambio de porcentaje en la fuerza tendinosa en ratones Ts con tratamiento anti-IL-33 los días 1 y 3 después de la lesión. Los datos se muestran como la media ± SD y son representativos de experimentos utilizando cuatro ratones por afección (n = 16). \* p<0,05, \*\* p<0,01, ratones lesionados frente a no lesionados. A-J, Los datos se muestran como la media ± SD de muestras duplicadas y son representativos de experimentos utilizando cuatro ratones por afección (n = 16).

**Figura 4: El microARN 29 se dirige directamente al ST2 soluble – implicaciones de los cambios de la matriz de colágeno en la enfermedad tendinosa**

25 (A) Todos los miembros de la familia miR-29 (miR-29a, miR-29b, y miR-29c) se expresaban en tenocitos tendinopáticos (n = 6 muestras de pacientes). Los valores menores de ACT indican altos niveles de expresión. Expresión genética de la familia miR-29 en Control, supraespinatus rasgado (Tendón rasgado) y tendón suprascapularis equivalente (Tendinopatía Temprana). Los datos se muestran como la media ± SD de muestras duplicadas y representan los experimentos en diez muestras de pacientes. \* p<0,05, \*\* p<0,01. (B) Transcurso de la expresión de miR-29a después de la adición de 100 ng/ml de rhIL-33. (C y D) ARNm de col1 y col3 y expresión proteica de colágeno 1 y 3 después del a transfección con el mimético desordenado, miR-29a mimético o antagomir de miR 29a. (E) Niveles proteicos de colágeno 3 después de la adición del miR-29a mimético/antagomir y 100 ng de rhIL-33. Para B-E los datos mostrados son la media ± SD de muestras duplicadas y representan experimentos de cinco muestras de explantes de tendones. (n = 5) p<0,05, \*\* p<0,01. (F) Actividad de luciferasa en tenocitos humanos primarios transfectados con el precursor de miR-29a que contiene la 3' UTR de Col1a1, Col1a2, o Col3a1. Se determinó la actividad respecto a los controles transfectados con ARN desordenado, que se definió como el 100 %. Esto se repitió en 3 experimentos independientes. \* p<0,05, \*\* p<0,01 frente al control desordenado. (G) sitios de unión del miR-29a y MRE en col3a1 y formas larga/corta de col1a1/col1a2 que resaltan los sitios de poliadenilación alternativos. (H) porcentaje de transcripciones de colágeno largo/corto en tenocitos (T) siguiendo la transfección con miR-29a. (I) ARNm de col1a1, col1a2 y col3a1 después de la transfección con mimético desordenado y antagomir del miR-29a. Los datos que se muestran son la media ± SD de muestras duplicadas y representan experimentos de tres muestras de explantes de tendones (n = 3) p<0,05, \*\* p<0,01.

**Figura 5: IL-33/ST2 regula miR-29 en la cicatrización de tendones *in vivo***

45 (A) Co-transfección de células HEK 293 con pre-miR-29a que contiene la 3' UTR de ST2 soluble junto con elementos reguladores (MRE) de miARN de la 3' UTR del ST2 soluble y ensayo de la actividad luciferasa resultante. \*\*\* p < 0,001 frente al control desordenado (n = 3) (B) Niveles de ARNm de sST2 y ST2 unido a la membrana después de la adición de un mimético desordenado, un miR-29a mimético o un antagomir de miR-29a. (D) Producción de proteína sST2 humana (ng/ml) después de la incubación con miR-29a mimético/antagomir. (n = 5) p< 0,05, \*\* p< 0,01. (D) PCR cuantitativa que muestra la media de veces de cambio ± SD en el miR-29a en animales de TS frente a animales no lesionados los días 1 y 3 después de la lesión. (E) PCR cuantitativa que muestra la media de veces de cambio ± SD en ratones de TS y ST2<sup>-/-</sup> en animales lesionados frente a no lesionados después del tratamiento con rhIL-33 o PBS el Día 1 después de la lesión. (F) Expresión de miR-29a después de la adición de anti-IL-33 en animales de TS después de la lesión los días 1 y 3. Los datos se muestran como la media de veces de cambio ± SD de muestras duplicadas que son representativas de los experimentos utilizando cuatro ratones por grupo (n = 16) p< 0,05, \*\* p< 0,01.

**Figura 6: Eje IL-33/miR-29 en patología tendinosa**

60 Diagrama esquemático que ilustra el papel de IL-33/miR-29a en la patología tendinosa. Una lesión tendinosa o microdesgarros que producen un estrés que experimenta la célula tendinosa da como resultado la liberación de IL-33 y la fosforilación corriente abajo de NFκB que a su vez reprime el miR-29a que produce un aumento de colágeno tipo 3 y la producción de ST2 soluble. Un aumento de colágeno 3 reduce la fuerza de tensión final de los tendones dando lugar a una rotura precoz mientras que el ST2 soluble actúa de manera autocrina que puede ser en último término, un mecanismo protector de manera que se elimine el exceso de

IL-33 del sistema.

**Figura 7**

5 (A) Figura que muestra las regiones semilla de los sitios MIRE de miR-29a previsto por el Targetscan: 29-1 y 29-2. (B) Actividad de luciferasa en células HEK 293 transfectadas con precursores de miR-29 a/b/c (pre-miR-29) que contenían las 3' UTR de Col1 o Col3. Se determinó la actividad con respecto a los controles con ARN desordenado, que se definió como el 100 %. Esto se repitió en 3 experimentos independientes. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  frente al control desordenado. (C) Co-transfección de células HEK 293 con pre-miR-29a, b, c que contienen 3' UTR de ST2 soluble que muestran que el miR-29a reduce significativamente la actividad de luciferasa relativa en comparación con los controles transfectados con ARN desordenado ( $n = 3$ ). (D) El sitio de unión de miR-29 restante presente en la variante corta de 3' UTR de col3a1 se ensayó en un ensayo de luciferasa en cuanto a su sensibilidad a miR-29a y se descubrió que era completamente activo. (E) Secuencias de productos 3' RACE de transcripciones de colágeno de tenocitos de seres humanos y caballos. Las señales de poliadenilación están subrayadas. Los MRE de miR-29a se muestran en cursiva en la transcripción Col3a1 (3' UTR corta) humana y en la transcripción Col3a1 de caballo.

**Figura 8**

20 (A) ARNm de Col3, (B) proteína colágeno 3, (C) ARNm de Col1 y (D) niveles proteicos de colágeno 1 después del tratamiento con miR-29a mimético después de la lesión en el tendón en ratones de TS. Los datos del ARNm son el número total de copias del gen vs el gen constitutivo 18S en muestras duplicadas. Los datos son la media  $\pm$  SD de muestras duplicadas, representativas de 6 ratones por grupo, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  vs control. (ANOVA).

**Descripción detallada de la invención**

**Materiales y métodos**

30 *Modelo humano de tendinopatía*

Todos los procedimientos y protocolos se aprobó por el Comité de Ética bajo el ACEC Nº 99/101. Se recolectaron quince muestras del tendón supraspinatus de pacientes con desgarros del manguito rotador sometidos a cirugía de hombro (Tabla 1). La edad media de los pacientes con rotura del manguito rotador era de 54 años (intervalo, 35-70 años) – la media de tamaño del desgarro era de 2,5 cm. También se recolectaron muestras del tendón subscapularis de los mismos pacientes. Los pacientes se incluyeron solo si no había pruebas detectables de tendinopatía del subscapularis en una exploración por MRI o daño macroscópico del tendón subscapularis en el momento de la artroscopia – por estos criterios representaban una cohorte verdaderamente pre-clínica. Se obtuvo un grupo de control independiente que comprendía 10 muestras de tendón subscapularis recolectado de pacientes sometidos a cirugía artroscópica para la estabilización del hombro sin desgarros del manguito rotador. La ausencia de desgarros en el manguito rotador se confirmó por examen artroscópico. La edad media del grupo de control era de 35 años (intervalo de 20-41 años).

*Recolección de tejidos y preparación*

45 La reparación artroscópica del manguito rotador se llevó a cabo utilizando la técnica convencional de tres portales como se había descrito previamente. El tamaño transversal del desgarro del manguito rotador se estimó y registró como se había descrito anteriormente<sup>39</sup>. El tendón subscapularis se recolectó artroscópicamente desde el borde superior del tendón 1 cm lateral a la cavidad glenoidea. El tendón supraspinatus se recolectó desde 1,5 cm del final del desgarro antes de la reparación quirúrgica. Para la tinción inmunohistoquímica las muestras de tejidos se fijaron inmediatamente en un 10% (v/v) de formalina durante 4 a 6 hora y entonces se embebieron en parafina. Las secciones se cortaron con un grosor de 5  $\mu$ m utilizando un microtomo Leica-LM (Leica Microsystems, Alemania) y se colocaron en portaobjetos de cristal Superfrost Ultra Plus (Gerhard Menzel, Alemania). Se retiró la parafina de las secciones de tejido con xileno, se rehidrataron en alcohol graduado y se utilizaron para la tinción histológica e inmunohistoquímica por metodologías establecidas previamente<sup>40</sup>.

Se explantaron células derivadas del tendón humano del tejido tendinoso de la corva de 5 pacientes (edad 18-30 años) sometidos a reconstrucción ACL del tendón de la corva. Se mantuvieron los cultivos a 37 °C en una atmósfera humidificada de un 5 % de CO<sub>2</sub> durante 28 días. Las células se subcultivaron y tripsinizaron cuando confluían. Se utilizaron células del 3º y 4º pasajes en condiciones normóxicas.

*Técnicas histológicas e inmunohistoquímicas*

65 Se tiñeron las secciones humanas con hematoxilina y eosina y azul de toluidina para la determinación del grado de tendinopatía como se evaluó por una versión modificada de la valoración de Bonar<sup>41</sup> (Grado 4 = tendinopatía marcada, Grado 3 = tendinopatía avanzada, 2 = degeneración moderada, 1 = degeneración leve, 0 = tendón normal). Esto incluía la presencia o ausencia de edema y degeneración junto con la celularidad de fibroblastos y

metaplasia condroide. A continuación, se tiñeron las secciones con anticuerpos dirigidos contra los siguientes marcadores: - IL-33 (Alexis, monoclonal de ratón), ST2 (Sigma Aldrich, policlonal de conejo), IL-1RaCP (ProSci, policlonal de conejo), CD68 (pan macrófagos), CD3 (células T), CD4 (células T auxiliares), CD206 (macrófagos M<sub>2</sub>), y triptasa de mastocitos (mastocitos) (Vector Labs).

5 La actividad de peroxidasa endógena se inactivó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % (v/v), y la unión no específica de los anticuerpos se bloqueó con un 2,5 % de suero de caballo en tampón TBST durante 30 minutos. La recuperación de antígeno se llevó a cabo en tampón de citrato 0,01 M durante 20 minutos en un microondas. Las secciones se incubaron con el anticuerpo primario en 2,5 % (p/v) de suero de caballo/suero humano/TBST a 4 °C durante una noche. Después de  
10 dos lavados, se incubaron los portaobjetos con el kit de Reactivo Vector ImmPRESS según las instrucciones de los fabricantes durante 30 minutos. los portaobjetos se lavaron e incubaron con la solución Vector ImmPACT DAB chromagen durante 2 minutos, seguido por un lavado exhaustivo. Finalmente las secciones se contratiñeron con hematoxilina. Se incluyeron especímenes de control positivo (tejido tonsilar humano) y negativo, además de los especímenes quirúrgicos de cada técnica de tinción individual del anticuerpo. La omisión del anticuerpo primario y el  
15 uso de los isotopos de control negativo confirmó la especificidad de la tinción.

Los inventores aplicaron un sistema de valoración basándose en métodos previos<sup>42</sup> para cuantificar la tinción inmunohistoquímica. Se evaluaron diez campos de alta potencia aleatorios (x400) por tres evaluadores independientes (NLM, JHR, ALC). En cada campo, se hizo el recuento del número de células teñidas positiva y negativamente y el porcentaje calculado de células positivas daba la siguiente graduación semi-cuantitativa: Grado 0 = sin tinción, Grado 1 = < 10 % de células teñidas positivamente, 2 = 10-20 % de células teñidas positivamente, Grado 3 = > 20 % de células positivas.  
20

Las secciones de ratón se procesaron utilizando el protocolo anterior con anticuerpos dirigidos contra los siguientes marcadores: -IL-33 (R&D Systems, monoclonal de ratón), ST2 (Sigma Aldrich, policlonal de conejo), F4/80 (Serotec, monoclonal de ratón) y AntiHistamina (Sigma Aldrich, policlonal de conejo).  
25

#### *Regulación de la matriz*

30 Los tenocitos se evaluaron por tinción inmunocitoquímica del colágeno 1 y colágeno 3 para evaluar la producción de matriz de tenocitos (Abcam). Se midió el colágeno soluble total de sobrenadantes del cultivo utilizando el kit de ensayo Sricol (Bicolor Ltd., Carrickfergus, Irlanda del norte) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se añadió 1 ml del reactivo colorante Sricol a 100 µl de muestra de ensayo y se mezcló durante 30 min a temperatura ambiente. El complejo colágeno-colorante se precipitó por centrifugación a 10.000 x g durante 10 min; y entonces se lavó dos  
35 veces con 500 µl de etanol. El aglomerado se disolvió en 500 µl de reactivo alcalino. Se midió la absorbancia a 540 nm por un lector de microplacas.

Se montó la curva de calibración basándose en la referencia de colágeno proporcionado por el fabricante. De manera adicional se evaluó la concentración de colágeno 1 y 3 humanos y de ratón utilizando un ELISA con el cambio de color medido a 450 nm por un lector de microplacas junto con referencias suministradas por el fabricante (USCNK Life Science Inc).  
40

#### *Experimentos de señalización*

45 Se evaluaron el estado de fosforilación de proteína cinasas activadas por mitógeno (MAPK), cinasas reguladas por señal extracelular (ERK1/2), c-Jun N-terminal cinasa (JNK) e isoformas p38 utilizando la matriz Human Phospho-MAPK (R&D Systems Europa, RU) según las instrucciones del fabricante. Se adquirió el inhibidor de ERK (FR180204) en CalbioChem (Merck KGaA, Alemania) y se utilizó a una CI<sub>50</sub> = 10 mM, una concentración determinada anteriormente que ofrecía una inhibición específica óptima con respecto a los efectos de apagado de  
50 diana que se utilizaron previamente en el laboratorio de los inventores<sup>43</sup>.

Se evaluó la fosforilación de NFKβ p65 utilizando el ELISA InstantOne y lisados celulares de tenocitos tratados y no tratados. La absorbancia se midió a 450 nm por el lector de microplacas con controles positivos y negativos suministrados por el fabricante. La absorbancia relativa de células estimuladas frente a no estimuladas se utilizó  
55 para evaluar el NFKβ p65 total o fosforilado de cada muestra.

#### *Extracción de ARN y PCR cuantitativa*

60 Las células se aislaron de experimentos Trizol normóxicos e hipóxicos antes de la extracción de ARNm. Se utilizaron columnas QIAgen mini (Qiagen Ltd, Crawley RU) para limpiar el ARN con una etapa incorporada en la columna DNase según las instrucciones del fabricante. Se preparó el ADNc de las muestras de ARN de acuerdo con el kit de síntesis de ADNc de temperatura múltiple AffinityScript™ (Agilent Technologies, CA, USA) según las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo la PCR en tiempo real utilizando SYBR verde o Taqman FastMlx (Applied Biosystems, CA, USA) de acuerdo con si se utilizó una sonda con los cebadores. El ADNc se diluyó 1 en 5 utilizando  
65 agua libre de RNasa. Cada muestra se analizó por triplicado. Los cebadores (Integrated DNA Technologies, Bélgica) eran los siguientes: GAPDH, 5'-TCG ACA GTC AGC CGC ATC TTC TTT-3' (d) y 5' -ACC AAA TCC GTT GAC TCC

GAC CTT-3' (i); IL-33 humano GGA AGA ACA CAG CAA GCA AAG CCT (d) TAA GGC CAG AGC GGA GCT TCA TAA (i); IL-33 murino GGA AGA ACA CAG CAA GCA AAG CCT (d) TAA GGC CAG AGC GGA GCT TCA TAA (i); Total ST2 humano ACA ACT GGA CAG CAC CTC TTG AGT (d) ACC TGC GTC CTC AGT CAT CAC ATT (i); sST2 murino CCA ATG TCC CTT GTA GTC GG (d) CTT GTT CTC CCC GCA GTC (i), TCC CCA TCT CCT CAC CTC  
 5 CCT TAA T (sonda); ST2L murino TCT GCT ATT CTG GAT ACT GCT TTC, TCT GTG GAG TAC TTT GTT CAC C (i) AGA GAC CTG TTA CCT GGG CAA GAT G (sonda); humano ST2L ACA AAG TGC TCT ACA CGA CTG (d) TGT TCT GGA TTG AGG CCA C (i); CCC CAT CTG TAC TGG ATT TGT AGT TCC G (sonda); humano sST2 GAG ACC TGC CAC GAT TAC AC (d) TGTTAAACCCTGAGTTCCAC (i), CCC CAC ACC CCT ATC CTT TCT CCT (sonda); Col 3A Humano TTG GCA GCA ACG ACA CAG AAA CTG (d) TTG AGT GCA GGG TCA GCA CTA CTT (i) Col 3A  
 10 Mouse GCT TTG TGC AAA GTG GAA CCT GG (d) CAA GGT GGC TGC ATC CCA ATT CAT (i); COL 1A1 Humano CCA TGC TGC CCT TTC TGC TCC TTT (d) CAC TTG GGT GTT TGA GCA TTG CCT (i) COL 1A1 Mouse TTC TCC TGG CAA AGA CGG ACT CAA (d) GGA AGC TGA AGT CAT AAC CGC CA (i)

*Aislamiento de ARN y análisis de PCR cuantitativa en tiempo real de miARN*

15 Se aisló el ARN total con el kit miRNeasy (Qiagen). Se utilizó el kit miScript Reverse Transcription (Qiagen) para la preparación de ADNc. Se utilizaron los ensayos de ARNm Taqman (Applied Biosystems) o el ensayo de cebador miScript (Qiagen) para la determinación semi-cuantitativa de la expresión de miR-29a (MS00001701) 29b (MS00006566) y c (MS00009303) humanos y 29a (MS00003262), 29b (MS00005936) y c (MS00001379) de ratón.  
 20 Las expresiones del ARN nuclear pequeño U6B o beta-actina se utilizaron como controles endógenos.

*Cuantificación de las transcripciones alternativas de colágeno poliadenilado*

25 Los niveles absolutos de las formas cortas y largas de 3' UTR de transcripciones tipo 1 y 3 se determinaron por q-PCR respecto a las referencias. Se generó el ADNc utilizando AffinityScript (Agilent) con ambos cebadores oligo-dT y hexámeros aleatorios. Se llevó a cabo una PCR-cuantitativa SYBR verde utilizando los siguientes cebadores: Las muestras se normalizaron al GAPDH endógeno de control. Col1a2\_S DIR 5' GCCTGCCCTTCCTTGATATT 3' Col1a2\_S INV 5'TGAAACAGACTGGGCCAATG 3' col1a2\_DIR 5' TCAGATACTGAAGAATGTTGATGG 3' col1a2\_L  
 30 INV 5' CACCACACGATACAACCTCAATAC 3' Col1a1\_S DIR 5' CTTACCTACAGCGTCACT 3' Col1a1\_S INV 5' TTGTATTCAACTACTGTCTTGCC 3' col1a1\_T DIR 5' CCACGACAAAGCAGAAACATC 3' col1a1\_L INV 5' GCAACACAGTTACACAAGGAAC 3' COL3A1\_S DIR 5' CTAT-GACATTGGTGGTCCTGAT 3' COL3A1\_S INV 5' TGGGATTTTCAGATAGAGTTTGGT 3' COL3A1\_L DIR 5' CCAC-CAAATACAATTCAAATGC 3' COL3A1\_L INV 5' GATGGGCTAGGATTCAAAGA 3'.

*Extensión rápida 3' de extremos de ADNc (RACE)*

35 Para caracterizar las secuencias humanas, se llevó a cabo un 3' RACE sobre el ADNc que se había generado a partir del ARN total aislado de los tenocitos humanos utilizando el kit de transcriptasa inversa MiRscript (Qiagen). Se amplificaron los extremos del ADNc por PCR utilizando los siguientes cebadores directos enumerados posteriormente junto con el cebador inverso universal del kit.  
 40

Cebadores directos específicos genéticos del 3' RACE humano:

45 RACE-Col1a1-L DIR 5' GACAACTTCCCAAAGCACAAAG 3'  
 RACE-Col1a1-S DIR 5' CTTCTGTAAACTCCCTCCATC 3'  
 RACE-Col1a2-L DIR 5' TCTTCTTCCATGGTTCCACAG 3'  
 RACE-Col1a2-S DIR 5' CTTCTTGTGATATTGCACCTTTG 3'  
 RACE-Col3a1-L DIR 5' CTATGACATTGGTGGTCCTGAT 3'  
 50 RACE-Col3a1-S DIR 5' GTGTGACAAAAGCAGCCCCATA 3'

55 Para caracterizar las secuencias de caballo, se amplificaron las transcripciones de 3' UTR de Col1a1, Col1a2 y Col3a1 expresadas en los tenocitos de caballo utilizando la Extensión rápida de los extremos 3' de ADNc (3' RACE). Los fragmentos de ADNc amplificados se secuenciaron y se identificó la señal de poliA de acuerdo con la localización de la señal de poliA canónica AATAAA localizada a 10 y 30 nucleótidos 5' de la cola poliA.

Cebadores 3' RACE de caballo:

60 col1a1 GSP1 de Caballo CCCTGGAAACAGACAAACAAC  
 col1a1 GSP2 de Caballo CAGACAAACAACCCAAACTGAA  
 col1a2 GSP1 de Caballo GCTGACCAAGAATTCGGTTTG  
 cola2 GSP2 de Caballo ACATTGGCCAGTCTGTTT  
 col3a1 GSP1 de Caballo AGGCCGTGAGACTACCTATT  
 col3a1 GSP2 de Caballo CTATGATGTTGGTGGTCCTGAT  
 col1a1 q-PCR de Caballo dir CAGACTGGCAACCTCAAGAA  
 65 col1a1 q-PCR de Caballo inv TAGGTGACGCTGTAGGTGAA  
 col1a2 q-PCR de Caballo dir GGCAACAGCAGGTTCACTTAT

col1a2 q-PCR de Caballo inv GCAGGCGAGATGGCTTATTT  
 col3a1 q-PCR de Caballo dir CTGGAGGATGGTTGCACTAAA  
 col3a1 q-PCR de Caballo inv CACCAACATCATAGGGAGCAATA

5 Los productos de PCR resultantes se clonaron en el pCR2.1 TOPO (Invitrogen) y se secuenció.

*Transfección de miARN*

10 Las células se transfectaron con miARN maduro sintético en cuanto a miR 29 a y b o con control negativo (miR-67 mimético de *C. elegans* marcado con Dy547, Thermo Scientific Inc) a una concentración final de 20 nM con el uso de reactivos de transfección de siARN Dharmacon® DharmaFECT® 3 (Thermo Scientific Inc). A las 48 horas después de la transfección se recolectaron lisados celulares para analizar la expresión de los genes de interés.

15 La eficacia de transfección se evaluó por citometría de flujo utilizando el Dy547 mimético marcado y se confirmó por PCR cuantitativa del mimético desordenado de control y la respectiva familia mimética de miR 29.

*Ensayo de luciferasa indicadora para el direccionamiento a colágeno 1 y 3 y ST2 soluble*

20 El sitio diana de miARN 2 humano se generó hibridando los oligos: para 3' UTR de COL 1 y 3 y ST2 soluble que se clonaron en ambas orientaciones en sentido y anti-sentido corriente abajo del gen de luciferasa en el vector de luciferasa pMIR-REPORT (Ambion). Estas construcciones se secuenciaron para confirmar las inserciones y se llamaron pMIR-COL I/COL III/ sST2-miR29a/b/c y pMIR(A/S) - COL I/COL III/ sST2-miR29a/b/c, y se utilizaron para la transfección de células HEK 293. Las células HEK 293 se cultivaron en placas de 96 pocillos y se transfectaron con 0,1 µg de pMIR-COL I/COL III/ sST2-miR29a/b/c, pMIR(A/S)-COL I/COL III/ sST2-miR29a/b/c o pMIR-REPORT, junto con 0,01 µg del vector pRL-TK (Promega) que contenía luciferasa de Renilla y 40 nM de miR-155 o miARN desordenado (Thermo Scientific Dharmacon®). Las transfecciones se hicieron utilizando Effectene (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Veinticuatro horas después de la transfección, se midió la actividad de la luciferasa utilizando el Ensayo Indicador de Luciferasa Dual (Promega). Se amplificó la 3' UTR de sST2 humana a partir del ADN genómico utilizando los siguientes cebadores de sST2 dir  
 30 5'AGTTTAAACTGGCTTGAGAAGGCACACCGT3' y el sST2 inv 5'AGTCGACGGGCCAAGAAAGGCTCCCTGG3' con los sitios PmeI y Sall creados respectivamente. Estos sitios se utilizaron para clonar el producto amplificado por PCR en los mismos sitios del pmiRGLO (Promega). Las regiones semillas de los dos sitios MRE de miR29a previstos por Targetscan: 29-1 y 29-2 se mutaron utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange (Agilent). Cada vector junto con el miR29a o el control mimético de control se transfectaron en las células HEK 293 utilizando Attractene (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. después de 24 horas se midió la actividad de luciferasa utilizando el ensayo de luciferasa Glo Dual (Promega) estando normalizada la actividad de luciferasa a Renilla. La actividad de luciferasa normalizada se expresaba como un porcentaje del control desordenado de las mismas construcciones.

40 *Producción de citocinas*

Un ensayo de citocinas humanas 25-Plex se evaluó en la determinación cuantitativa *in vitro* de 25 citocinas humanas separadas utilizando tecnología Luminex. Sobrenadantes (n = 3).

45 *Modelo de lesión del tendón rotuliano*

50 En la preparación para el procedimiento quirúrgico, se anestesiaron los ratones con una mezcla de isoflurano (al 3 %) y oxígeno (al 1 %) y se afeitaron ambas extremidades traseras. Durante el procedimiento quirúrgico, se suministró la anestesia mediante una mascarilla con el nivel reducido al 1 % con oxígeno. Después se hizo la incisión cutánea con dos cortes paralelos al tendón en el retináculo de cada lado, se colocaron entonces unas tijeras planas por debajo del tendón rotuliano. Con los filos de las tijeras sirviendo como soporte, se utilizó un punzón de biopsia de 0,75 mm de diámetro (World Precision Instruments) para crear una transección parcial de espesor completo en el tendón rotuliano derecho. El tendón rotuliano izquierdo se sometió a un procedimiento simulado, que consistía en solo colocar el plástico trasero debajo del tendón si crear una lesión. Las heridas cutáneas se cerraron con grapas de piel y los ratones se sacrificaron el día 1, día 3 y días 7 y 21 tras la cirugía. Los ratones se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub> y se pesaron inmediatamente. Se utilizaron ratones de dos grupos, de control BALB/c (CTL) y BALBc ST2<sup>-/-</sup>. Cada grupo contenía 16 ratones (n = 8 BALB/c ST2<sup>-/-</sup> y 8 BALB/c) por punto de tiempo. Estos experimentos se repitieron en 4 ocasiones separadas.

60 Para ensayar si la IL-33 inducía la mala regulación de la matriz tendinosa, se estableció un modelo de inyección de citocina. Se ensayó la IL-33 en un modelo informado previamente descrito inicialmente para la aplicación de IL-23 o IL-22<sup>44-45</sup>. Se inyectaron i.p. los ratones ST2<sup>-/-</sup> (n = 4/grupo/tratamiento/experimento) diariamente con IL-33 (0,2 µg por ratón diluido en 100 µl de PBS) los días -3, -2, -2 y el día de la lesión. 24 horas después de la inyección final los ratones se sacrificaron según el protocolo. Los ratones de control recibieron de manera similar un volumen de PBS igual. Los inventores también ensayaron los anticuerpos neutralizantes a IL-33 (0,5 mg/ml R&D Systems) inyectando i.p. inmediatamente después de la lesión en ratones de TS y ST2<sup>-/-</sup> con controles de IgG de nuevo con

4/grupo/tratamiento/experimento.

*Análisis biomecánicos*

5 Para el análisis biomecánico, los tendones rotulianos de los ratones de cada grupo se lesionaron y ocho ratones se sacrificaron en uno de los tres puntos de tiempo para el ensayo mecánico como se había descrito anteriormente por Lin et al<sup>10</sup>. En resumen, los tendones rotulianos se diseccionaron y limpiaron, dejando sol la rótula, el tendón rotuliano y la tibia como una unidad. La anchura del tendón y el espesor se cuantificaron entonces y se calculó el área de la sección transversal como el producto de los dos. La tibia se embebió en Isopon p38 (Relleno de Celulosa de alta construcción) en una mezcla diseñada a medias y se aseguró en el lugar con una pinza metálica. La rótula se mantuvo en el sitio con pinzas de presión utilizadas con el instrumento de ensayo BOSE ElectroForce® 3200. Cada espécimen de tendón se sometió al siguiente protocolo, se sumergió en un paño salino a 37 °C – se recargó con 0,02 N, se pre-condicionó durante 10 ciclos desde 0,02 a 0,04 a una tasa de 0,1 % (0,003 mm/s), y se mantuvo durante 10 s. Inmediatamente después, se llevó a cabo un experimento de tensión-relajación alargando el tendón hasta una tensión del 5 % (0,015 mm) a una tasa del 25 % (0,75 mm/s), seguido por una relajación de 600 s. Finalmente se aplicó una tracción hasta rotura a una tasa de 0,1 %/s (0,003 mm/s). A partir de estos ensayos, se determinó la tensión máxima y se calculó el módulo utilizando la regresión lineal desde la región lineal próxima de la curva de esfuerzo de estrés.

20 *Administración in vivo del miR29a mimético*

Se preparó un complejo de transfección que contenía 150 ng/ml de miR-29a mimético, 9 mg/ml de polietilenimina (PEI) y un 5 % de glucosa. Se inyectaron 50 µl de este complejo en el tendón rotuliano del ratón inmediatamente después de la cirugía. Los animales se sacrificaron después de 1 y 3 días y se midieron los niveles de ARNm de col1a1 y col3a1 y proteicos. El miR-29a mimético marcado de manera fluorescente se utilizó para evaluar la distribución *in vivo* de miR-29a mimético en tendón por inmunofluorescencia, utilizando la contratinción con faloidina (para mostrar la estructura citoesquelética) y núcleos (DAPI).

El miR29a mimético era de la siguiente manera:

30 Cadena pasajera:

mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUmAdG

35 Cadena guía:

/5Fos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArUrCrGrGmUmUmA

/5Fos/= 5' fosfato

40 mA= ribonucleótido 2'O-metil adenosina;  
 mC= ribonucleótido 2'O-metil citosina;  
 mG= ribonucleótido 2' O-metil guanina;  
 mU= ribonucleótido 2' O-metil uracilo;  
 rA= ribonucleótido adenosina;  
 rC= ribonucleótido citosina;  
 45 rG= ribonucleótido guanina;  
 rU= ribonucleótido uracilo;

*Análisis estadístico*

50 Todos los resultados se representan como la media +/- error estándar medio (SEM) y se hicieron todos. Los análisis estadísticos por ensayo T de student, ensayo ANOVA o ensayo de Mann Whitney, como se indica en las leyendas de la figura, utilizando el software Graph Pad Prism 5. Un valor de p < 0,05 se consideraba estadísticamente significativo.

55 **Resultados**

*Expresión de IL-33 y ST2 en tendinopatía humana*

60 Los inventores investigaron primero la expresión de IL-33 en la tendinopatía humana utilizando el modelo desarrollado previamente<sup>22</sup>. Las transcripciones de IL-33, ST2 soluble y unido a la membrana estaban significativamente reguladas positivamente en la tendinopatía temprana en comparación con el control o las biopsias de tendón rasgado (Fig. 1A-C). Los tejidos de tendinopatía temprana presentaban una tinción significativamente mayor para IL-33 y ST2 en comparación con el tendón rasgado o las biopsias de control (Fig. 1D). La tinción predominaba en las células endoteliales y particularmente en células tipo fibroblastos, a saber tenocitos que se consideran esenciales para la regulación de la tendinopatía temprana (datos no mostrados). En paralelo, los tenocitos cultivados *in vitro* expresaban IL-33 nucleares que estaban regulados positivamente a niveles de ARNm y

proteicos después de la estimulación con TNF e IL-1 $\beta$  (Fig. 1E y datos no mostrados). Por el contrario el ST2 se expresaba constitutivamente tanto en tenocitos en reposo y no estimulados (datos no mostrados).

#### La IL-33 regula la matriz de colágeno de tenocitos y la síntesis de citocinas proinflamatorias

5 La mala regulación de la matriz hacia la expresión de colágeno 3 es un cambio fenotípico temprano clave en la tendinopatía, que de esta manera acelera la reparación; el colágeno es sin embargo biomecánicamente inferior. La dosis inducida de IL-33 y el tiempo dependiente de la regulación positiva de proteína colágeno total (datos no mostrados), que se tienen en cuenta para el aumento de expresión del ARNm del colágeno tipo 1 pero particularmente de tipo 3 y proteína (Fig. 1F, G). Después del análisis de matriz (datos no mostrados) y consistente con la señalización<sup>12,16</sup> de IL-33 corriente abajo, esto fue anulado por la inhibición de ERK (datos no mostrados). La rhIL-33 también elevaba significativamente la producción de IL-6, IL-8 y MCP-1 (datos no mostrados), que estaba regulada por inhibición de NF-kB que sugiere que la IL-33 opera en los tenocitos mediante su ruta de señalización canónica IL-1R (datos no mostrados). Por el contrario los inventores descubrieron que no había efectos sobre la producción de otras citocinas manteniendo los perfiles de producción de citocinas inducida por IL-33 informada anteriormente en fibroblastos<sup>20-23</sup>.

#### Modelo de la ruta IL-33/ST2 *in vivo* después de la lesión tendinosa

20 Los inventores extendieron estas observaciones a un modelo *in vivo* bien establecido de lesión tendinosa. El ARNm de IL-33 estaba elevado en los días 1 y 3 después de la lesión tendinosa en ratones TS (Fig. 2A). Estaba reducido significativamente en ratones ST2<sup>-/-</sup> lesionados sugiriendo una regulación autocrina. La ST2 soluble estaba significativamente regulada positivamente en todos los puntos de tiempo después de la lesión en ratones TS en comparación con los controles sin lesionar (Fig. 2B) mientras que el ARNm de ST2 estaba elevado solo el día 3 después de la lesión (datos no mostrados). No se encontraron cambios significativos en la expresión de las transcripciones de IL-33 o ST2 o proteica en los ratones de TS los días 7 o 21 después de la lesión, o para la expresión de IL-33 en ratones ST2<sup>-/-</sup>, sugiriendo que el impacto de la expresión de IL-33 se manifiesta pronto, en mantenimiento con la actividad tipo 'alarmina' en la lesión/reparación tendinosa.

30 El análisis de síntesis de colágeno revelaba una expresión de colágeno 3 significativamente mayor en todos los puntos de tiempo después de la lesión en ratones de TS en comparación con los controles no lesionados o ratones ST2<sup>-/-</sup> lesionados (Fig. 2E, F y datos no mostrados). El colágeno 1 estaba regulado negativamente al principio (días 1, 3) a niveles de ARNm (Fig. 2C) en ratones de TS lesionados pero se revertía hacia niveles pre-lesionales los días 7 y 21 (datos no mostrados) con una tendencia similar en la expresión proteica de colágeno 1 (Fig. 2D). Por el contrario, los ratones ST2<sup>-/-</sup> lesionados presentaban una reducción prolongada de la síntesis de colágeno 1 (días 1, 3 y 7) volviendo a la línea bases solo el día 21 (datos no mostrados). De manera importante la lesión de los tendones de ratones de TS daba como resultado una disminución significativa de la fuerza biomecánica el día 1 después de la lesión en comparación con ST2<sup>-/-</sup> (Fig. 2G) que se recuperaba los días 7 y 21 (datos no mostrados). Estos datos sugieren la síntesis alterada de matriz de colágeno en ratones ST2<sup>-/-</sup> que implica IL-33/ST2 como un modulador temprano de los cambios de colágeno en la lesión tendinosa que tiene una significación biomecánica.

#### La manipulación de IL-33 modifica el colágeno 3 *in vivo*

45 Para confirmar esta posibilidad los inventores deseaban modificar directamente la biología efectora de IL-33 *in vivo*. La administración de rhIL-33 no afectaba la síntesis de colágeno 1 (Fig. 3A, B) pero aumentaba significativamente la síntesis de colágeno 3 en tendones lesionados (Fig. 3D, E y datos no mostrados). Además la administración de rhIL-33 reducía significativamente la fuerza final del tendón en cualquier punto de tiempo después de la inyección en ratones de TS (Fig. 3E y datos no mostrados) sugiriendo que dichos cambios tenían un impacto funcional. La administración de IL-33 no afectaba a la síntesis de matriz de colágeno o la fuerza tendinosa final de la cicatrización del tendón en ratones ST2<sup>-/-</sup> confirmando que la IL-33 actuaba mediante una ruta dependiente de ST2 (datos no mostrados).

Los inventores dirigieron directamente IL-33 *in vivo* a continuación. Los anticuerpos neutralizantes contra IL-33 atenuaban el cambio de colágeno 1 a 3 los días 1 y 3 después de la lesión en ratones de TS lesionados (Fig. 3F-I) lo que da como resultado un aumento significativa de la fuerza biomecánica el día 1 después de la lesión en tendones de ratones de TS (Fig. 3J). Este efecto no se veía en los puntos de tiempo tardíos (datos no mostrados). En los experimentos de control los inventores no observaron efectos sobre los ratones ST2<sup>-/-</sup> (datos no mostrados) confirmando adicionalmente la contribución de IL-33 endógena en la tendinopatía inducida por una lesión.

#### IL-33 promueve la regulación diferencial de colágeno 1/3 mediante miR-29 en tenocitos

65 Habiendo establecido que la IL-33 dirige la regulación diferencial de colágeno 1 y 3 en tenocitos los inventores postularon un papel mecánico para la red de miARN en este proceso. Los estudios previos han demostrado que la familia miR-29 se dirige directamente a numerosos genes de la matriz extracelular, incluyendo los colágenos de tipo 1 y 3<sup>24-25</sup> y está implicada en la regulación de inmunidad<sup>26</sup> innata y adaptativa. Los algoritmos computacionales predicen que el miR-29 puede dirigirse también a sST2. Los inventores descubrieron que todos los miembros de la

familia miR-29 se expresaban en biopsias de tendones humanos y tenocitos explantados (Fig. 4A) con miR-29a que muestra la expresión más alterada. En un cultivo de tenocitos la IL-33 reducía significativamente la expresión de miR-29a a las 6,12 y 24 horas (Fig. 4B) actuando mediante una señalización dependiente de NFkB mientras que observaron efectos inconsistentes en miR-29b y c (datos no mostrados). Aunque los cambios de matriz de colágeno 3 mediado por IL-33 podía regularse por miR-29a los inventores analizaron los efectos funcionales de la manipulación de miR-29a sobre la síntesis de matriz de colágeno *in vitro*. En primer lugar, utilizando ensayos de luciferasa, los inventores confirmaron que el miR-29a se dirige directamente a col1a1 y 3a1 como se había demostrado previamente<sup>27</sup> (Fig. 7B). Los inventores también observaron una interacción previamente no reconocida con la transcripción de la subunidad col 1a2 (Fig. 7). Para ensayar si el miR-29a regula además los niveles de ARNm diana candidatos en células relevantes de enfermedad, los inventores transfectaron los tenocitos con miR-29a mimético y antagomir. La manipulación de miR-29a regula selectivamente la expresión del ARNm del colágeno 3 pero no del colágeno 1 y proteica en tenocitos primarios (Fig. 4C, D) Además, la sobre-expresión del miR-29a elimina significativamente la síntesis de ARNm de colágeno 3 y proteica inducida por UL-33 (Fig. 4E). Adicionalmente, la inhibición de miR-29a daba como resultado un aumento significativo de la expresión de col3a1 indicando que el miR-29a no solo regula activamente estas transcripciones en tenocitos humanos sino de cuya pérdida es un factor importante en el aumento de producción de colágeno tipo 3 observada en la tendinopatía. Por el contrario, los niveles de transcripción col 1a1 no cambiaron (Fig. 4I).

Dado que el miR-29a era capaz de reprimir el col1a1 y 1a2 con igual o mayor eficacia que el colágeno 3 en los ensayos de indicador de luciferasa, era improbable que fuera el resultado de que el miR-29a tuviera mayor afinidad por sus MRE en las transcripciones de tipo . (Fig. 4F). Una explicación mecánica bien documentada para las transcripciones que modulan su sensibilidad para la regulación de miARN es mediante la utilización de señales de poliadenilación alternativa (Fig. 4G). Para ensayar esto, los inventores compararon los niveles de transcripciones de longitud completa (que contenía miR-29a) niveles totales por q-PCR (Fig. 4H) que demostraban que en los tenocitos, menos del 5 % de las transcripciones col1a1 y 1a2 utilizan la señal de poliadenilación distal mientras que la mayoría de transcripciones de col3a1 lo hacen.

Esto se confirmó por amplificación rápida de extremos 3' de ADNc (RACE) (Fig. 7E) confirmando que col1a1, 1a2 pero no col3a1, utilizan las señales de poliadenilación no reconocidas previamente (Fig. 4G). La 3' UTR truncada resultante carecía de MRE de miR-29a. (Se apreciará que las secuencias que se muestran en la Fig. 7E son secuencias de ADNc; las secuencias de ARNm contendrían por supuesto U en vez de T). Estos datos sugieren que en los tenocitos, el miR-29a regula específicamente col 3a1, mientras que col 1a1 y col 1a2 son insensibles a la inhibición por miR-29a debido a la utilización de señales de poliadenilación alternativas. Esta utilización de señales de poliadenilación alternativas no estaba influenciada por la presencia de IL-33 (datos no mostrados). La pérdida de miR-29a con la señalización de IL-33 da como resultado la depresión de colágeno 3 que contribuye probablemente al aumento de este colágeno observado en tendones lesionados.

Los resultados de la 3' RACE de tenocitos humanos revelaban que dos UTR de col3a1, la más cortas de las cuales [denominada Col3a1 (3' UTR corta) en la Fig. 7E] contiene un MRE de miR-29a, mientras que la larga contiene dos. Ambas están reguladas por el miR-29a como se muestra en la Fig. 7D.

La caracterización de las transcripciones de 3' UTR de col1a1, cola2, y col3a1 expresadas en los tenocitos equinos mostraba que utilizan las mismas señales de poliA conservadas utilizadas en las transcripciones ortólogas de colágeno expresadas en tenocitos humanos. En col1a1 y cola2, el uso de estas señas de poliA proximales dan como resultado transcripciones con 3' UTR que están entre 100 y 350 nucleótidos de longitud y que no contiene sitios de unión al miR-29 y por lo tanto son insensibles a la regulación por este miARN. Por el contrario ambas 3' UTR de col3a1 contienen sitios de unión a miR-29 haciéndolas sensibles a la regulación por el miR-29.

#### *El ST2 soluble es una diana directa de miR-29*

El análisis computacional revelaba que el ST2 soluble se puede dirigir por miR-29a sugiriendo un papel regulador fiable en las funciones efectoras de IL-33. Se generó un gen indicador de luciferasa que contenía la 3' UTR de sST2 humano que se predecía que poseía los dos sitios potenciales de unión miR-29abc. La co-transfección del plásmido indicador de luciferasa-sST2 con miR-29 miméticos daba como resultado una reducción significativa de la actividad de luciferasa con respecto al control desordenado (Fig. 7B). Además, la actividad de luciferasa se restauraba completamente cuando las regiones semilla de ambos MRE del miR-29 en sST2 estaban mutadas, demostrando conclusivamente que el sST2 es una diana dirigida de miR-29a (Fig. 5A). Para investigar si el miR-29a regula además los niveles de ARN m diana candidato en tenocitos, los inventores transfectaron de nuevo el miR-29a mimético y antagomir en tenocitos humanos. El mensaje de ST2 soluble estaba alterado significativamente ( $p < 0,01$ ) por la transfección con miR-29a mimético/antagomir aproximadamente unas 5 veces (Fig. 5B) con un cambio correspondiente significativo en la proteína ST2 soluble confirmando el miR29a como una diana para el ST2 soluble (Fig. 5C).

*IL33/sST2 regula la expresión de miR-29 en modelos in vivo de cicatrización tendinosa*

Finalmente, los inventores investigaron la expresión de miR-29a en el modelo de tendinopatía *in vivo*. La lesión tendinosa en ratones de TS daban como resultado un aumento de 22 veces en el miR29a el día 1 que revertía a una disminución de 6 veces (frente a la línea base) el día 3 (Fig. 5D y datos no mostrados) sin diferencia significativa el día 7. Este efecto se anulaba significativamente en ratones ST2-/- (datos no mostrados). Además, la administración de rh-UL-33 reducía la expresión de miR-29a en tendones no lesionados en todos los puntos de tiempo en comparación con los controles inyectados con PBS (datos no mostrados). Este efecto era más profundo en ratones de TS lesionados, con adición de rhIL-33 que mediaba una reducción de 10 veces adicional en el miR-29a (Fig. 5E). La adición de rhIL-33 en ratones ST2-/- no tenía un efecto significativo en la expresión de miR-29a en tendones lesionados o no lesionados de nuevo sugiriendo que la regulación negativa del miR-29a está en parte directamente mediada por señalización dependiente de IL-33/ST2. La adición de un anticuerpo neutralizante contra IL-33 reducía significativamente el efecto de la lesión sobre la expresión genética de miR-29a los días 1 y 3 después de la lesión (Fig. 5F).

*Administración in vivo de miR29a mimético en un modelo de lesión del tendón rotuliano*

Se suministró miR-29a mimético en los tenocitos de tendones rotulianos de ratón de TS mediante inyección directa de un complejo miR-29a/PEI. Se utilizó una tinción de inmunofluorescencia para el mimético (rojo), se contratiñó con faloidina (verde, para la estructura citoesquelética) y DAPI (para mostrar los núcleos) para visualizar la localización del mimético alrededor de los tenocitos a las 24 h después de la inyección del miR-29a mimético (no mostrado). Como se muestra en la Figura 8, los niveles del ARNm del colágeno 3 y proteicos estaban reducidos significativamente en los tendones inyectados con el miR-29a mimético en comparación con los controles. Por el contrario los niveles de colágeno 1 no cambiaban.

**Conclusión**

Los microARN han aparecido como reguladores potentes de diversos procesos celulares con importantes papeles en la enfermedad y remodelación de tejidos. Estos estudios utilizan la tendinopatía como un modelo de sistema que revela por primera vez la capacidad de un único microARN (miR-29) para regular de manera cruzada la función efectora de citocinas inflamatorias y la regulación de la matriz extracelular en procesos biológicos tempranos complejos que dan lugar a la reparación tisular.

Los inventores proporcionan nuevas pruebas de un papel de la IL-33 en las etapas iniciales que dan lugar a la entidad clínica importante de tendinopatía. La IL-33 recientemente cada vez se asocia más con patologías musculoesqueléticas<sup>16</sup>. Los datos de los inventores muestran que la IL-33 está presente en las biopsias tendinosas humanas en el estadio temprano de la enfermedad, mientras que las biopsias en estadio final tienen una expresión de IL-33 significativamente menor a nivel de mensaje y proteico que promueven el concepto de que la IL-33 es un mediador tisular temprano en la lesión tendinosa y remodelación tisular posterior. Con las señales de peligro endógeno de lesión celular, llamados patrones moleculares asociados al daño, se liberan por las células necróticas que incluyen proteínas de choque térmico<sup>28</sup>, IMGB1<sup>29</sup>, ácido úrico<sup>30</sup> y miembros de la familia de la IL-1<sup>31-32</sup> que incluye la IL-33<sup>33-34</sup>. Estas señales de peligro se reconocen posteriormente por distintas células inmunitarias que inician respuestas inflamatorias y de reparación. Nuestros datos implican la IL-33 como una alarma en la tendinopatía temprana, y de manera importante los datos biomecánicos sugieren que dicha expresión tiene un papel patológicamente relevante. La adición de rhIL-33 reduce significativamente la carga a rotura de ratones de TS aproximadamente un 30 % en los puntos de tiempo tempranos, probablemente como consecuencia de los cambios de la matriz de colágeno 3 concomitante que da como resultado un tendón mecánicamente inferior<sup>35</sup>. Por lo tanto, un mecanismo plausible para los eventos que median la reparación temprana del tendón que es biomecánicamente inferior, puede ser que con una micro lesión repetida la IL-33 está regulada positivamente con su liberación posterior mediante tensión mecánica/necrosis, que a su vez dirige la degeneración de la matriz y la producción de citocinas pro-inflamatorias que propulsan el tendón hacia un estado patológico tal como el que se ve en las biopsias de tendinopatía temprana. De manera interesante, la adición de anticuerpos neutralizantes a los ratones lesionados revertía el fenotipo de colágeno 3 pero solo era capaz de mejorar temporalmente la fuerza del tendón el día 1 después de la lesión. Mientras que esto puede negar que el bloqueo de IL-33 en lesiones deportivas a largo plazo, el microtraumatismo repetitivo asociado con cambios patológicos del tendón puede permitir por el contrario que la neutralización de IL-33 actúe como un freno de comprobación para una mala regulación de la matriz no deseada posterior.

Estudios emergentes resaltan los miARN como reguladores clave de la función de leucocitos y la red de citocinas mientras que se orquesta la proliferación y diferenciación de linajes estromáticos que determinan la composición de la matriz extracelular<sup>36</sup>. El nuevo hallazgo de un papel del miR-29a en la regulación de los efectos mediados por IL-33 'alarmina' proporciona una visión mecánica en las redes de regulación cruzada de miARN que implican la inflamación y la regulación de la matriz en la preparación tisular. Los datos de los inventores proporcionan pruebas convincentes de un papel funcional para el miR-29 como regulador post-transcripcional de colágeno en la lesión tendinosa murina y humana. La regulación de colágenos por la familia miR-29 se ha resaltado en varios estudios anteriores<sup>37, 27, 38</sup>. Los resultados de los inventores sugieren ahora que el miR-29 actúa como un represor crítico para

regular la expresión de colágeno en la cicatrización tendinosa. Además, su expresión reducida en biopsias humanas sugiere que su disminución funcional permite permisivamente el desarrollo de tendinopatías. A pesar de que la patología tendinosa se caracteriza por el aumento de la deposición de colágeno 3 que resulta en una inferioridad biomecánica y degeneración, la premisa molecular para este 'cambio' hasta el momento es desconocida. Los inventores describen por primera vez que la deficiencia de miR-29a inducida por IL-33 da como resultado la sobreproducción de colágeno 3 mientras que simultáneamente se pone en marcha, mediante sST2 la inhibición del a IL-33, la resolución final de este proceso de reparación temprano. Contrariamente a las expectativas en tenocitos humanos, el miR-29 solo era capaz de influenciar la expresión de col3a1 y colágenos no del tipo 1. La caracterización posterior de la 3' UTR de colágenos de tipo 1 y 3 revelaba un patrón no informado anteriormente de poliadenilación alternativa en ambas subunidades de tipo 1, dando como resultado transcripciones que carecen de sitios de unión a miR-29a haciéndolos insensibles a la represión por este miARN. Este no era el caso de las transcripciones de colágeno tipo 3, que mantienen ambos sitios de unión para miR-29a. En los tenocitos humanos, el colágeno 3 está reprimido activamente por el miR-29a, como se demuestra por la capacidad de los inhibidores de miR-29a para aumentar significativamente los niveles de colágeno 3 mientras que la suplementación de tenocitos con miR-29a en presencia de IL-33 era suficiente para inhibir el aumento de la producción de colágeno 3. De manera importante, en el sistema de modelo de los inventores el miR-29a se dirigía adicionalmente al receptor sST2 señuelo de IL-33. Por lo tanto la pérdida de la expresión de miR-29a dirigida por IL-33 da como resultado la represión simultánea de colágeno 3 y sST2, con una posterior inhibición de IL-33 auto-regulada que promueve la resolución de la respuesta de alarma inmediata.

Basándose en este trabajo, los inventores proponen a la IL-33 como una alarma que influencia en el área clínica no conseguida de la lesión tendinosa temprana y la tendinopatía, que puede ser importante en el equilibrio entre la reparación y degeneración. Un nuevo papel para el miR-29 como regulador post-transcripcional de genes de la matriz/inflamatorios en la cicatrización tendinosa y tendinopatía ha sido descubierto. Una de las grandes promesas para explotar miARN con fines terapéuticos ha sido el potencial de un único microARN para regular genes diana funcionalmente convergentes. El descubrimiento de los inventores de una ruta reguladora dependiente de un único microARN en la cicatrización tisular temprana, resalta la terapia de remplazo de miR-29 como una opción terapéutica prometedora para la tendinopatía con implicaciones en muchas otras patologías humanas en las que está implicada la mala regulación de la matriz.

Mientras que la invención se ha descrito en conjunción con realizaciones a modo de ejemplo descritas anteriormente, muchas modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica que se dan en la presente divulgación. En consecuencia, las realizaciones a modo de ejemplo de la invención expuestas se consideran ilustrativas y no limitantes.

## Referencias

1. Deming, S.A., Crie, T. y Davidson, J.M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 127, 514-525 (2007).
2. McCormick, A., Charlton, J. y Fleming, D. Assessing health needs in primary care. Morbidity study from general practice provides another source of information. *BMJ* 310, 1534 (1995).
3. Nakama, L.H., King, K.B., Abrahamsson, S. y Rempel, D.M. Evidence of tendon microtears due to cyclical loading in an *in vivo* tendinopathy model. *J Orthop Res* 23, 1199-1205 (2005).
4. Sharma, P. y Maffulli, N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am* 87, 187-202 (2005).
5. Millar, N.L., Wei, A.Q., Molloy, T.J., Bonar, F. y Murrell, G.A. Cytokines and apoptosis in supraspinatus tendinopathy. *J Bone Joint Surg Br* 91, 417-424 (2009).
6. Pufe, T., Petersen, W., Tillmann, B. y Mentlein, R. The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor is expressed in foetal and ruptured tendons. *Virchows Arch* 439, 579-585 (2001).
7. Tsuzaki, M., et al. IL-1 beta induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 beta and IL-6 in human tendon cells. *J Orthop Res* 21, 256-264 (2003).
8. Tohyama, H., Yasuda, K., Uchida, H. y Nishihira, J. The responses of extrinsic fibroblasts infiltrating the devitalised patellar tendon to IL-1beta are different from those of normal tendon fibroblasts. *J Bone Joint Surg Br* 89, 1261-1267 (2007).
9. John, T., et al. Effect of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines on human tenocytes. *J Orthop Res* 28, 1071-1077 (2010).
10. Lin, T.W., Cardenas, L., Glaser, D.L. y Soslowsky, L.J. Tendon healing in interleukin-4 and interleukin-6 knockout mice. *J Biomech* 39, 61-69 (2006).
11. Zhang, N. y Oppenheim, J.J. Crosstalk between chemokines and neuronal receptors bridges immune and nervous systems. *J Leukoc Biol* 78, 1210-1214 (2005).
12. Schmitz, J., et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23, 479-490 (2005).
13. Gao, P., Wange, R.L., Zhang, N., Oppenheim, J.J. y Howard, O.M. Negative regulation of CXCR4-mediated chemotaxis by the lipid phosphatase activity of tumor suppressor PTEN. *Blood* 106, 2619-2626 (2005).
14. Chen, X., Murakami, T., Oppenheim, J.J. y Howard, O.M. Triptolide, a constituent of immunosuppressive Chinese herbal medicine, is a potent suppressor of dendritic-cell maturation and trafficking. *Blood* 106, 2409-2416

- (2005).
15. Lamkanfi, M. y Dixit, V.M. IL-33 raises alarm. *Immunity* 31, 5-7 (2009).
  16. Liew, F.Y., Pitman, N.I. y McInnes, I.B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol* 10, 103-110.
  - 5 17. Asirvatham, A.J., Magner, W.J. y Tomasi, T.B. miRNA regulation of cytokine genes. *Cytokine* 45, 58-69 (2009).
  18. Pritchard, C.C., Cheng, H.H. y Tewari, M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet* 13, 358-369 (2012).
  19. Matthews, T.J., Hand, G.C., Rees, J.L., Athanasou, N.A. y Carr, A.J. Pathology of the torn rotator cuff tendon. Reduction in potential for repair as tear size increases. *J Bone Joint Surg Br* 88, 489-495 (2006).
  - 10 20. Xu, D., et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 10913-10918 (2008).
  21. Zaiss, M.M., et al. IL-33 shifts the balance from osteoclast to alternatively activated macrophage differentiation and protects from TNF-alpha-mediated bone loss. *J Immunol* 186, 6097-6105 (2011).
  - 15 22. Rankin, A.L., et al. IL-33 induces IL-13-dependent cutaneous fibrosis. *J Immunol* 184, 1526-1535 (2010).
  23. Palmer, G. y Gabay, C. Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 7, 321-329.
  24. Ogawa, T., et al. Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 316-321.
  - 20 25. Bartel, D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233 (2009).
  26. Ma, F., et al. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon-gamma. *Nature immunology* 12, 861-869 (2011).
  27. Maurer, B., et al. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 62, 1733-1743 (2010).
  - 25 28. Basu, S., Binder, R.J., Suto, R., Anderson, K.M. y Srivastava, P.K. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 12, 1539-1546 (2000).
  29. Scaffidi, P., Misteli, T. y Bianchi, M.E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191-195 (2002).
  - 30 30. Shi, Y., Evans, J.E. y Rock, K.L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425, 516-521 (2003).
  31. Chen, C.J., et al. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med* 13, 851-856 (2007).
  - 35 32. Eigenbrod, T., Park, J.H., Harder, J., Iwakura, Y. y Nunez, G. Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells. *J Immunol* 181, 8194-8198 (2008).
  33. Mousson, C., Ortega, N. y Girard, J.P. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells *in vivo*: a novel 'alarmin'? *PLoS One* 3, e3331 (2008).
  - 40 34. Cayrol, C. y Girard, J.P. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 9021-9026 (2009).
  35. James, R., Kesturu, G., Balian, G. y Chhabra, A.B. Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. *J Hand Surg Am* 33, 102-112 (2008).
  36. Brown, B.D. y Naldini, L. Exploiting and antagonizing microRNA regulation for therapeutic and experimental applications. *Nat Rev Genet* 10, 578-585 (2009).
  - 45 37. Roderburg, C., et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* 53, 209-218 (2011).
  38. Ogawa, T., et al. Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 316-321 (2010).
  - 50 39. Millar, N.L., Wu, X., Tantau, R., Silverstone, E. y Murrell, G.A. Open versus two forms of arthroscopic rotator cuff repair. *Clin Orthop Relat Res* 467, 966-978 (2009).
  40. McInnes, I.B., et al. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med* 184, 1519-1524 (1996).
  41. Khan, K.M., Cook, J.L., Bonar, F., Harcourt, P. y Astrom, M. Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. *Sports Med* 27, 393-408 (1999).
  - 55 42. Millar, N.L., Wei, A.Q., Molloy, T.J., Bonar, F. y Murrell, G.A. Heat shock protein and apoptosis in supraspinatus tendinopathy. *Clin Orthop Relat Res* 466, 1569-1576 (2008).
  43. Kurowska-Stolarska, M., et al. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol* 181, 4780-4790 (2008).
  44. Zheng, Y., et al. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 445, 648-651 (2007).
  - 60 45. Hedrick, M.N., et al. CCR6 is required for IL-23-induced psoriasis-like inflammation in mice. *The Journal of clinical investigation* 119, 2317-2329 (2009).

**REIVINDICACIONES**

1. Un agente terapéutico para su uso en un método de tratamiento del daño de un tendón o que aumenta la fuerza de tensión de un tendón, en donde el agente terapéutico es miR-29, un mimético del mismo o un precursor de cualquiera de ellos.
2. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el agente terapéutico es un miR-29 mimético o un precursor que comprenden:
- (i) uno o más restos de azúcar modificados;
  - (ii) uno o más enlaces internucleósidos modificados;
  - (iii) una o más bases modificadas; y/o
  - (iv) un resto de tránsito de membrana.
3. Un agente terapéutico para su uso en un método de tratamiento del daño de un tendón o que aumenta la fuerza de tensión de un tendón, en donde el agente terapéutico es un ácido nucleico que codifica un miR-29, un mimético del mismo o un precursor de cualquiera de ellos.
4. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en asociación con (por ejemplo, formando un complejo con o encapsulado por) un vehículo.
5. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 en el que el vehículo:
- (i) comprende un lípido o un polímero farmacéuticamente aceptables; y/o
  - (ii) comprende un agente de direccionamiento capaz de unirse a la superficie de la célula diana.
6. Un agente terapéutico para su uso en un método de tratamiento del daño de un tendón o que aumenta la fuerza de tensión de un tendón, en donde el agente terapéutico es un vector vírico que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3.
7. Un agente terapéutico de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el vector vírico es un vector adenovírico, un virus adeno-asociado (AAV), un retrovirus o un herpesvirus, por ejemplo, un vector lentivírico.
8. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que el miR-29 es miR-29a, miR-29b1, miR-29b2 o miR-29c o una combinación de los mismos.
9. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 en el que la combinación comprende un miR-29a.
10. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que el miR-29 o el mimético del mismo comprenden una cadena guía que comprende la secuencia semilla AGCACCA.
11. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 en el que la cadena guía comprende la secuencia:
- UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA (hsa-miR-29a);  
 UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU (hsa-miR-29b1; hsa-miR-29b2); o  
 UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA (hsa-miR-29c).
12. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que el precursor es pre-mir-29.
13. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 12 en el que el pre-mir-29 comprende la secuencia:
- AUGACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAGAGUCAAUUAAUUUUUCUAGCACCAUCUGAAAUCGGUUAU  
 (hsa-pre-mir-29a: alternativa (i));  
 AUGACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAGAGUCAAUUAAUUUUUCUAGCACCAUCUGAAAUCGGUUAU  
 AAUGAUUGGGG (hsa-pre-mir-29a: alternativa (ii));
- CUUCAGGAAGCUGGUUUCAUUAGGUGGUUAGAUUUAAUAGUGAUUGUCUAGCACCAUUUGAAAUCAG  
 UGUUCUUGGGGG (hsa-pre-mir-29b1);
- CUUCUGGAAGCUGGUUUCACAUGGUGGCUUAGAUUUUCCAUCUUUGUAUCUAGCACCAUUUGAAAUC  
 A GUGUUUAGGAG (hsa-pre-mir-29b2); o

AUCUCUUACACAGGCUGACCGAUUUCUCCUGGUGUUCAGAGUCUGUUUUUGUCUAGCACCAUUUGAAAUCGGUUUAUGAUGUAGGGGGA (hsa-pre-mir-29c)

(en las que las secuencias de la cadena guía madura están subrayadas).

- 5 14. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en el que el miR-29 mimético comprende una cadena guía que comprende la secuencia:

10 UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA (hsa-miR-29a);  
UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU (hsa-miR-29b1 y 2); o  
UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA (hsa-miR-29c)

(en las que la secuencia semilla está subrayada en cada caso);  
o que se diferencia de dicha secuencia en:

- 15 (i) no más de tres posiciones dentro de la secuencia semilla; y  
(ii) no más de cinco posiciones fuera de la secuencia semilla.

15. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el tendón está afectado por una lesión tendinosa o por tendinopatía.

- 20 16. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el sujeto al que se va a administrar el agente es humano o equino.

- 25 17. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el tendón afectado es el tendón de Aquiles, el tendón del supraspinatus, el tendón flexor común, el tendón extensor común o el tendón flexor superficial.

Figura 1

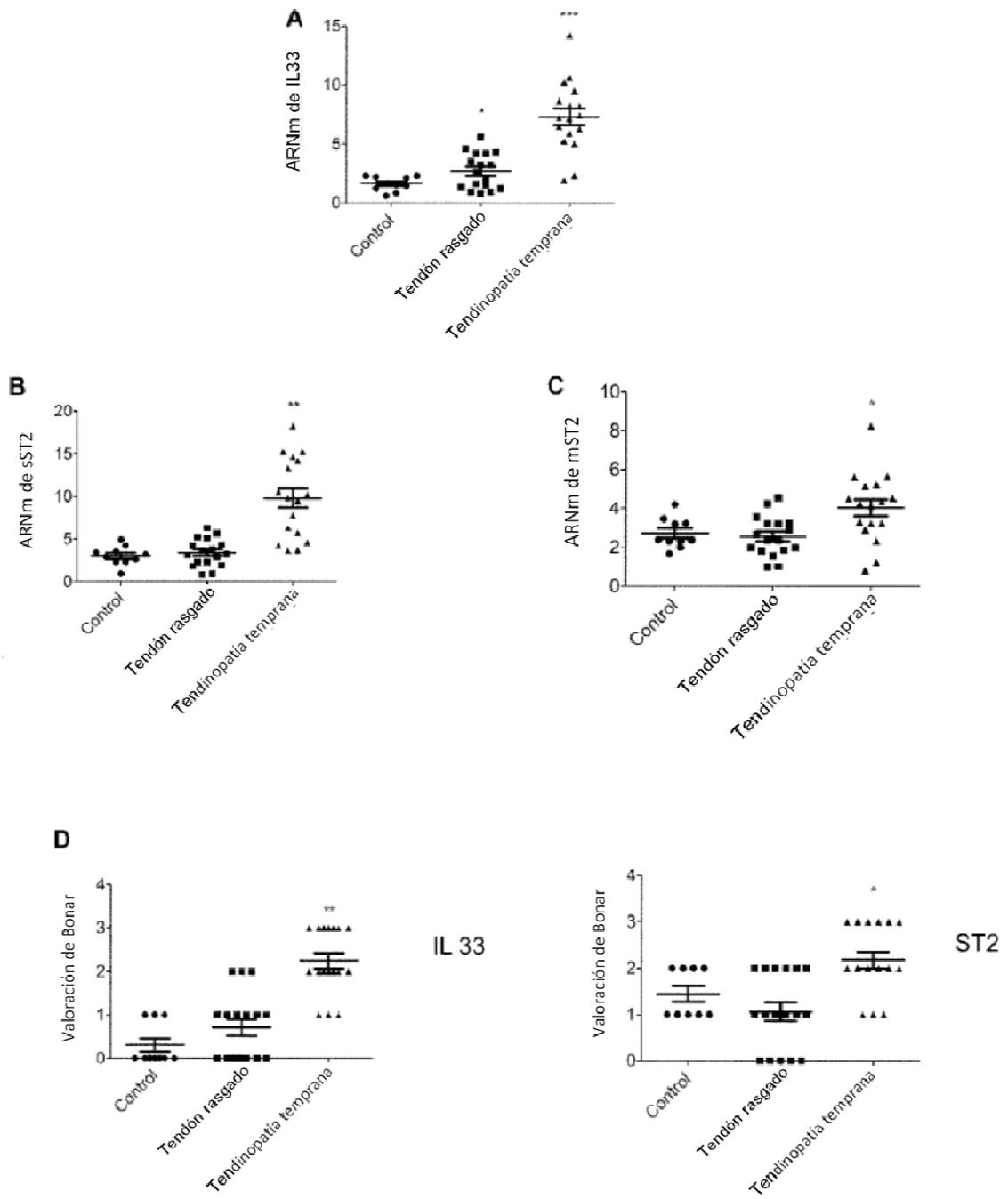


Figura 1 cont.

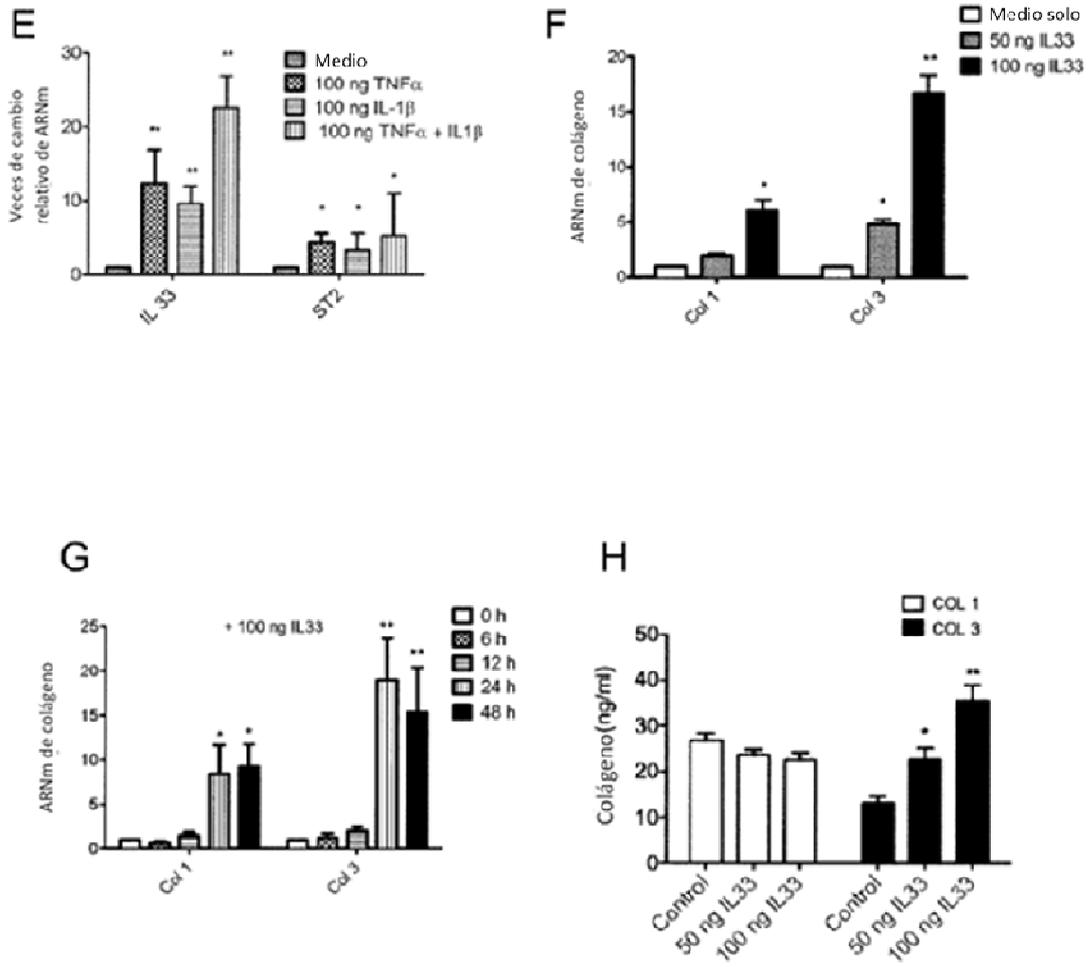


Figura 2

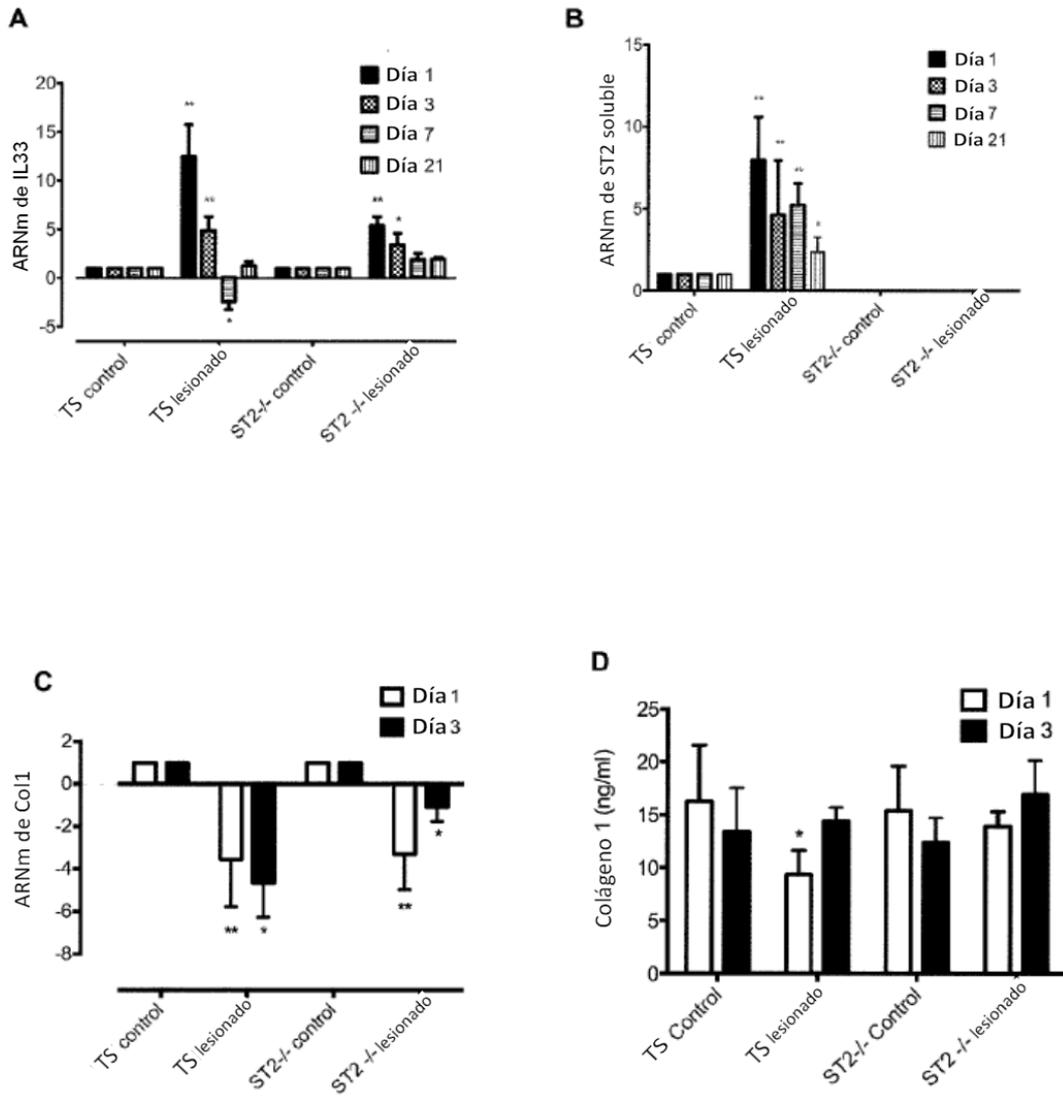


Figura 2 cont.

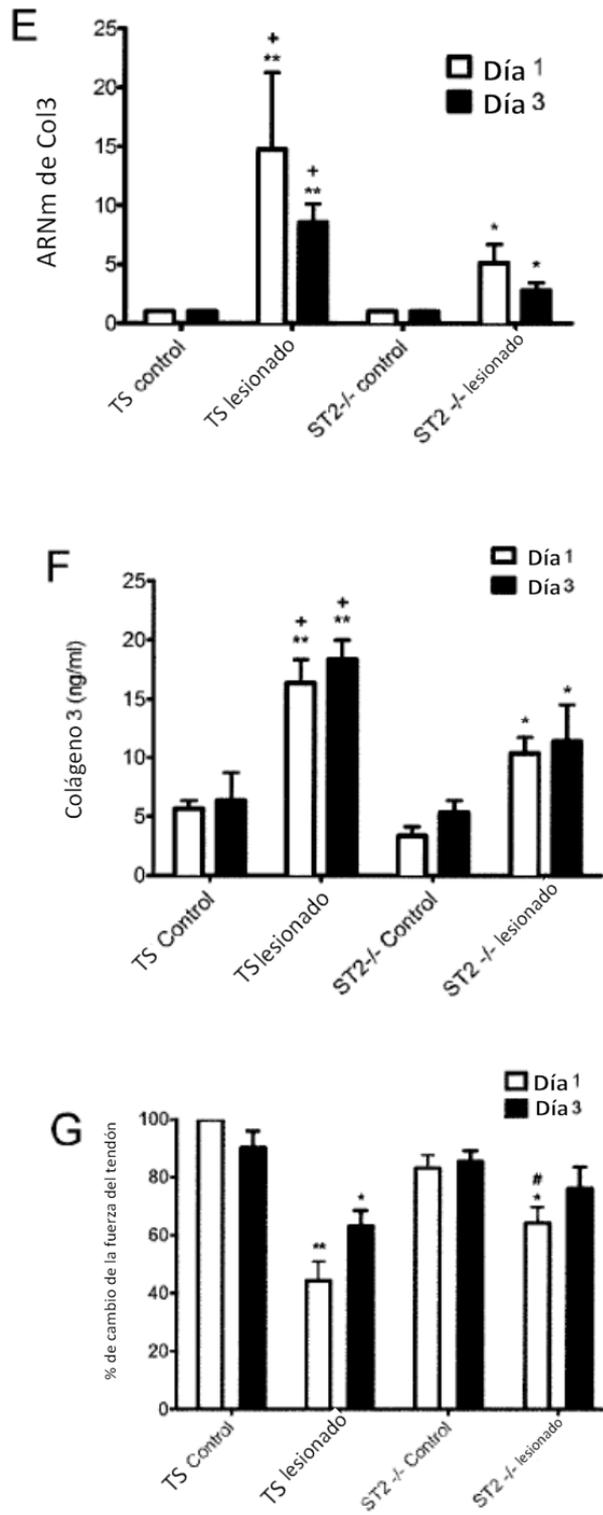


Figura 3

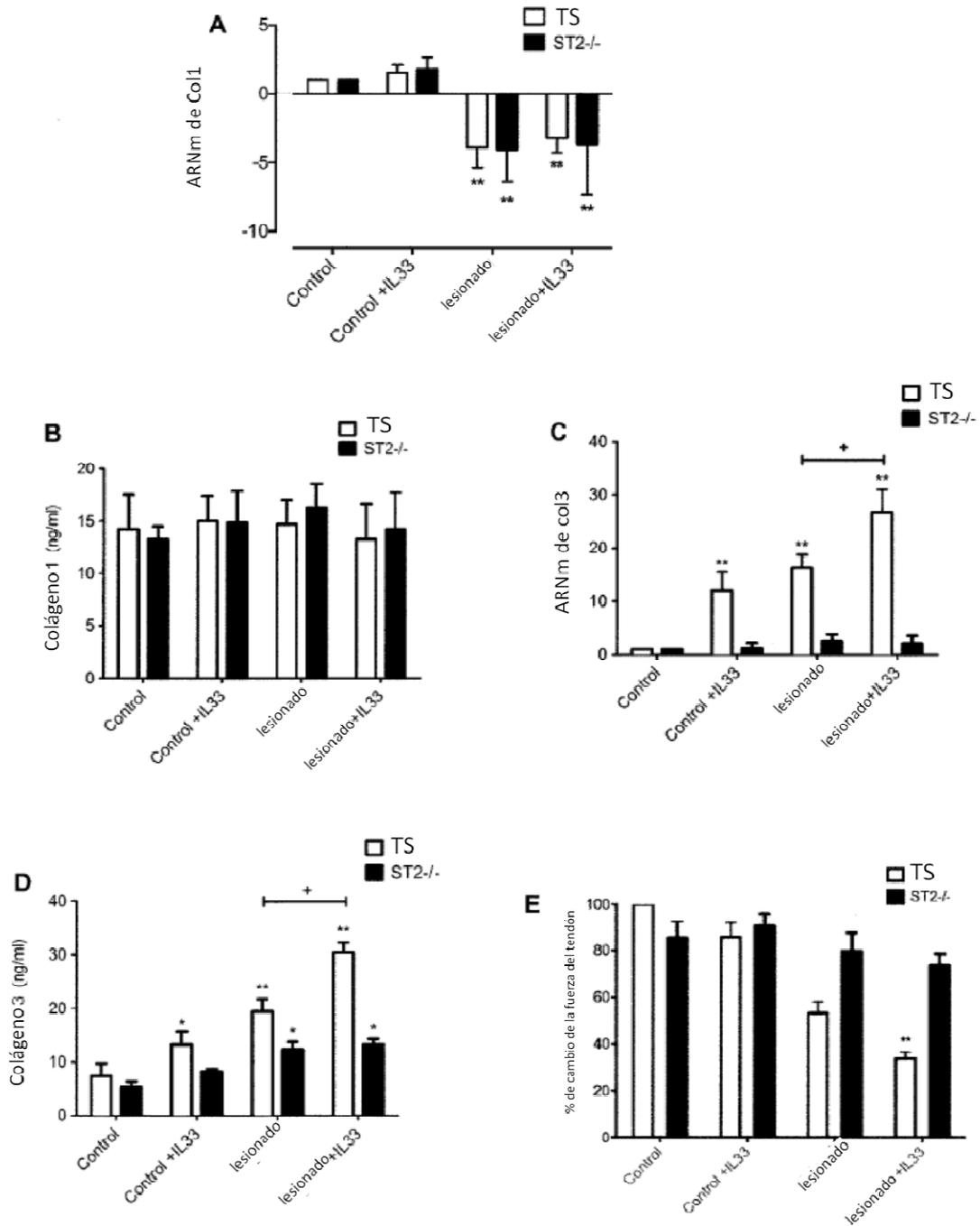


Figura 3 cont.

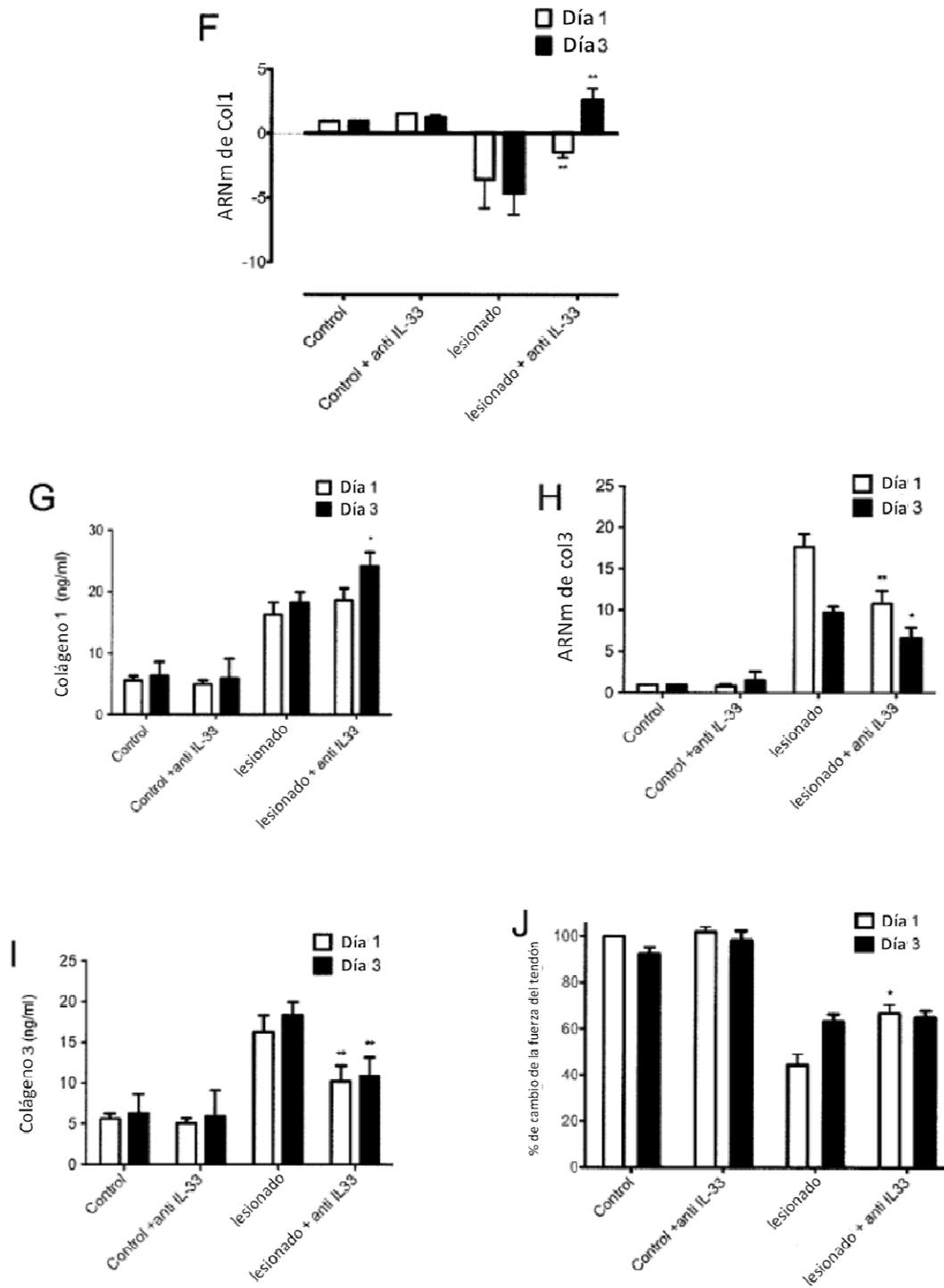


Figura 4

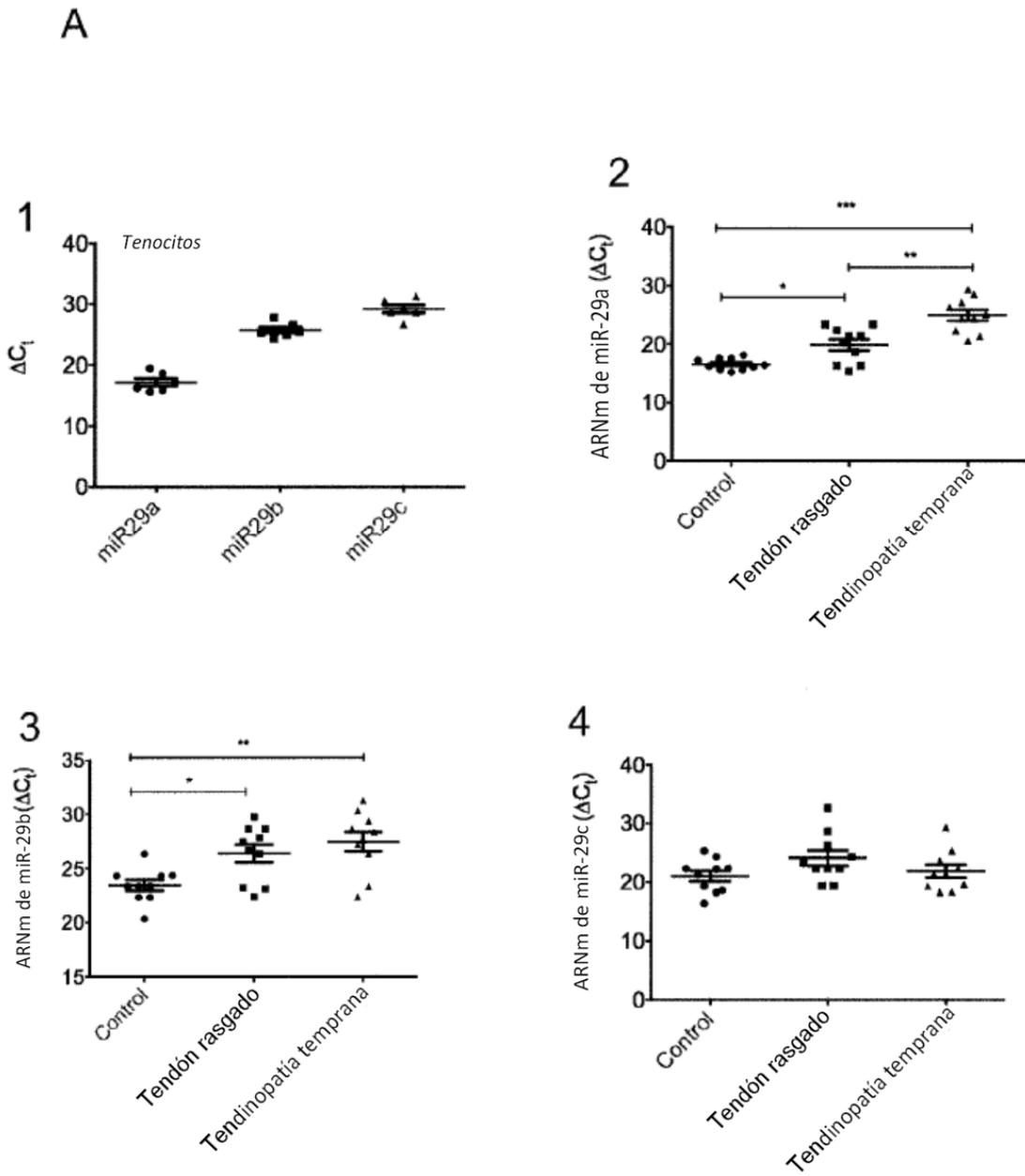


Figura 4 cont.

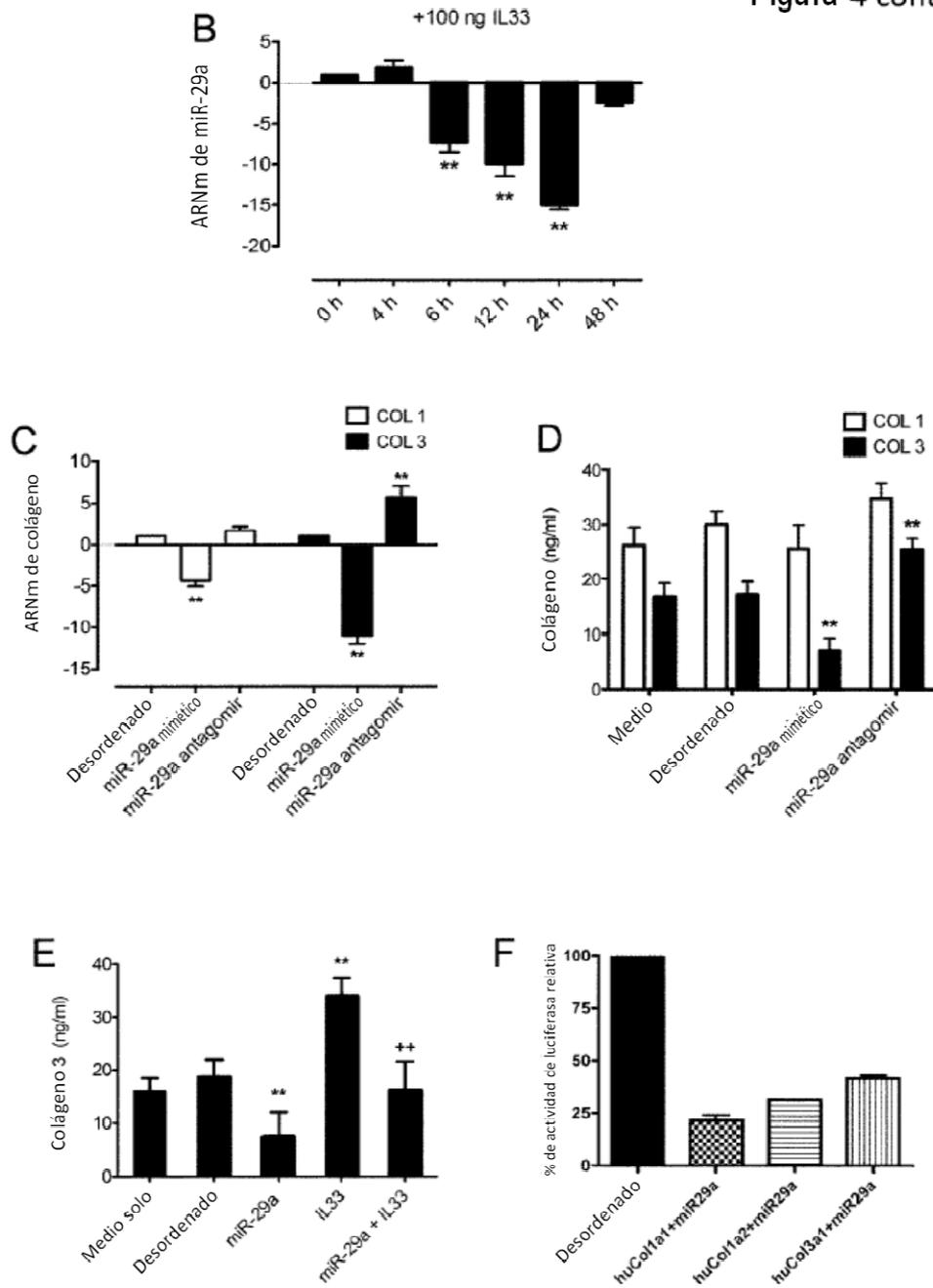


Figura 4 cont.

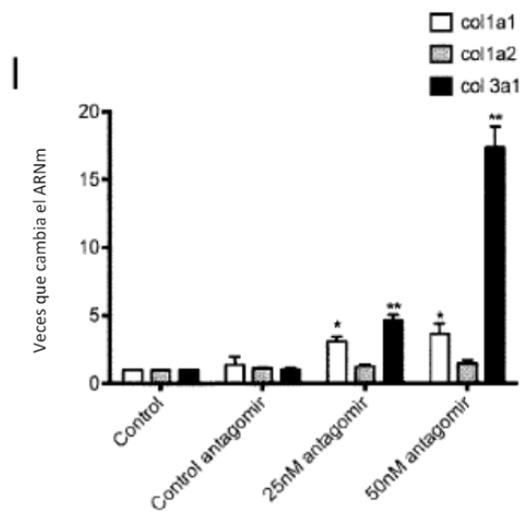
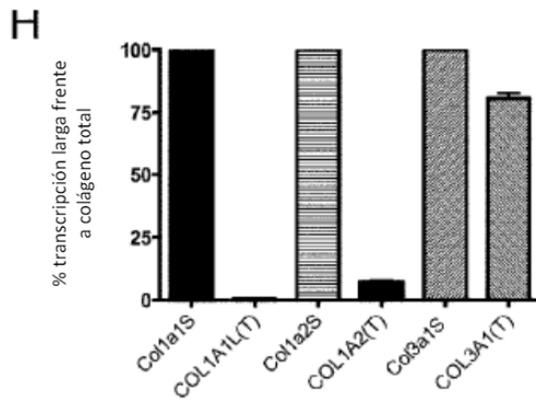
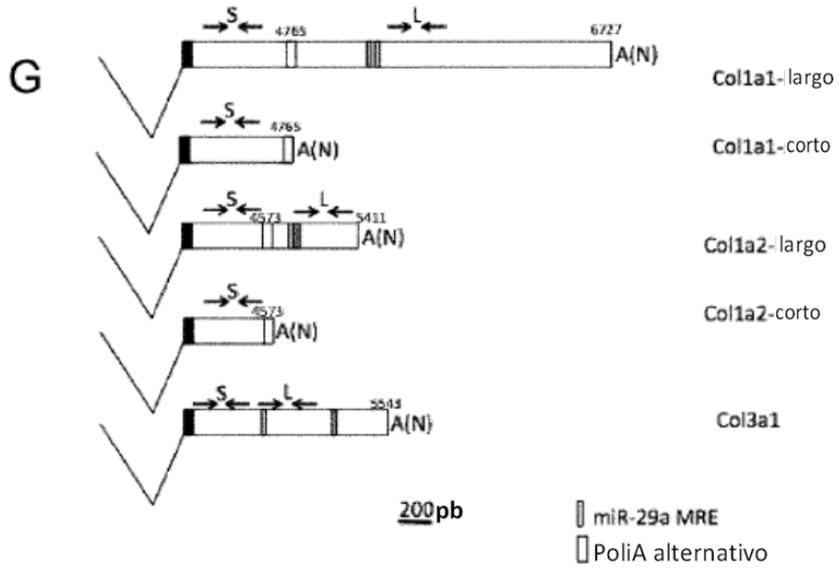
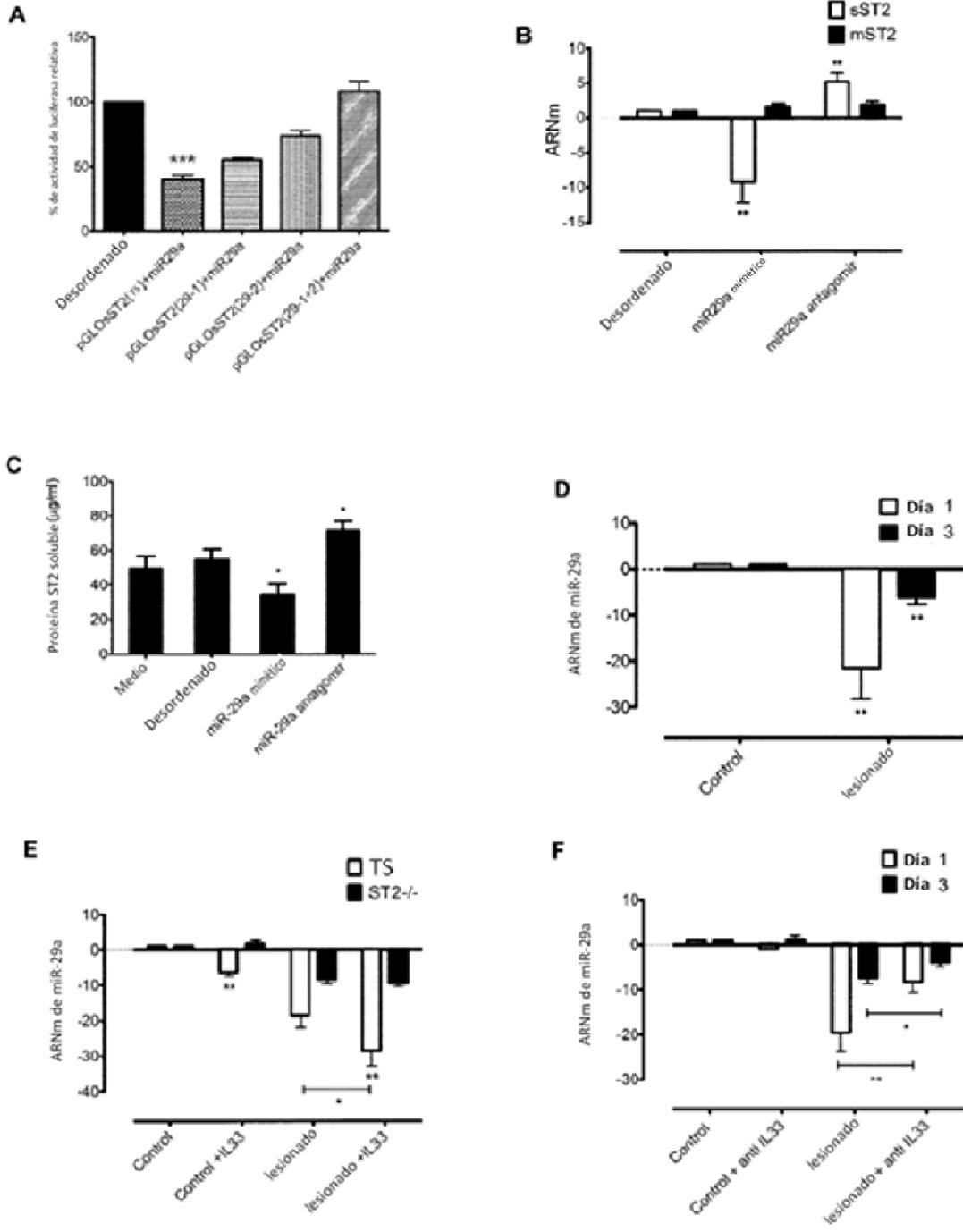


Figura 5



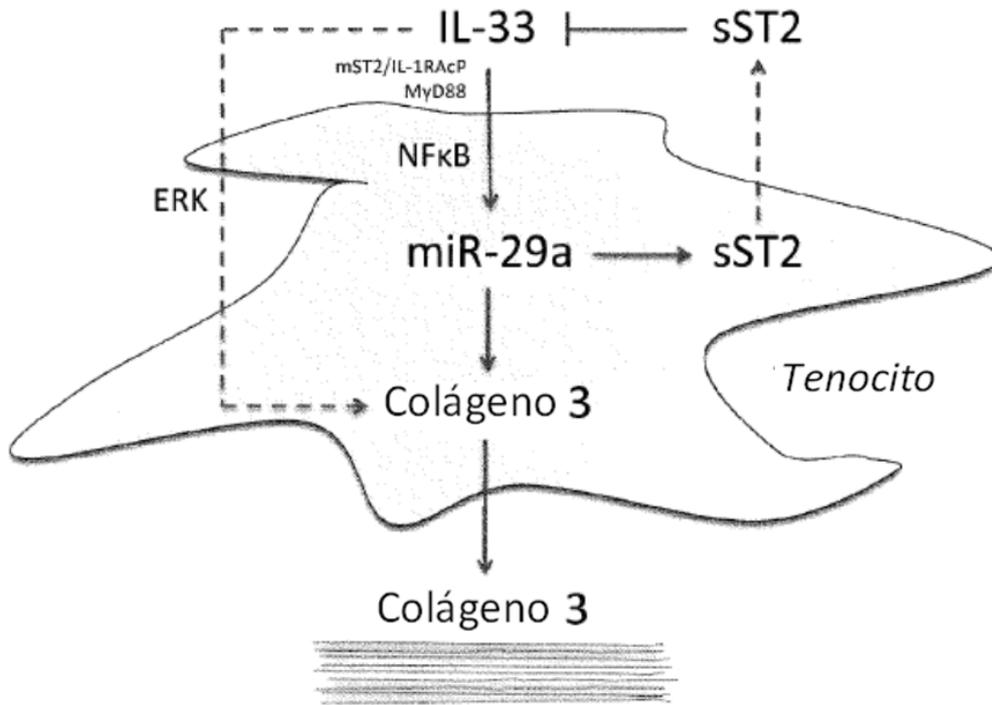
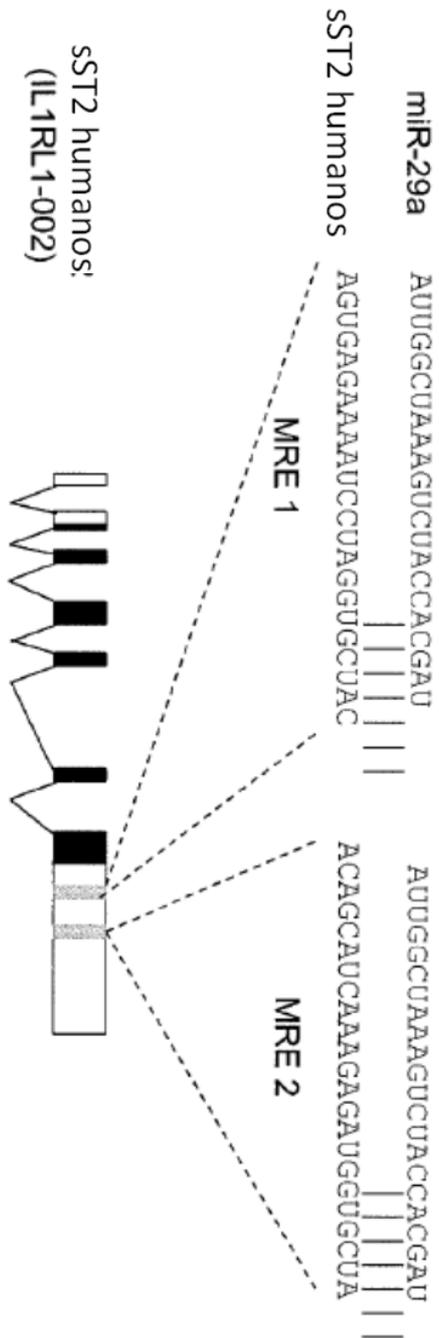


Figura 6

Figura 7

A



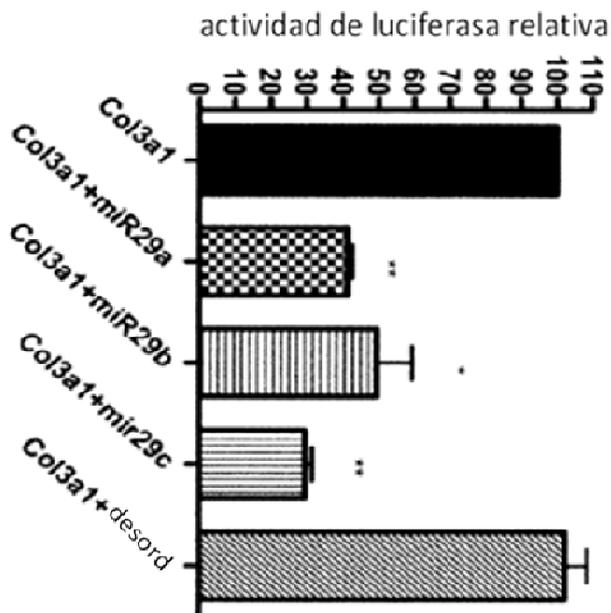
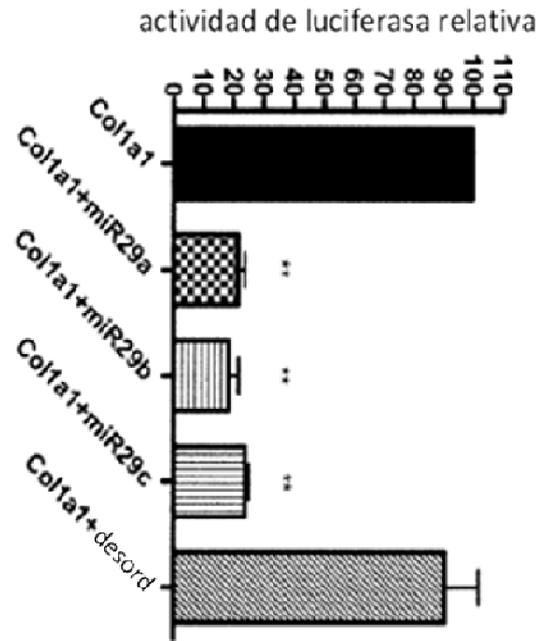


Figura 7 cont.

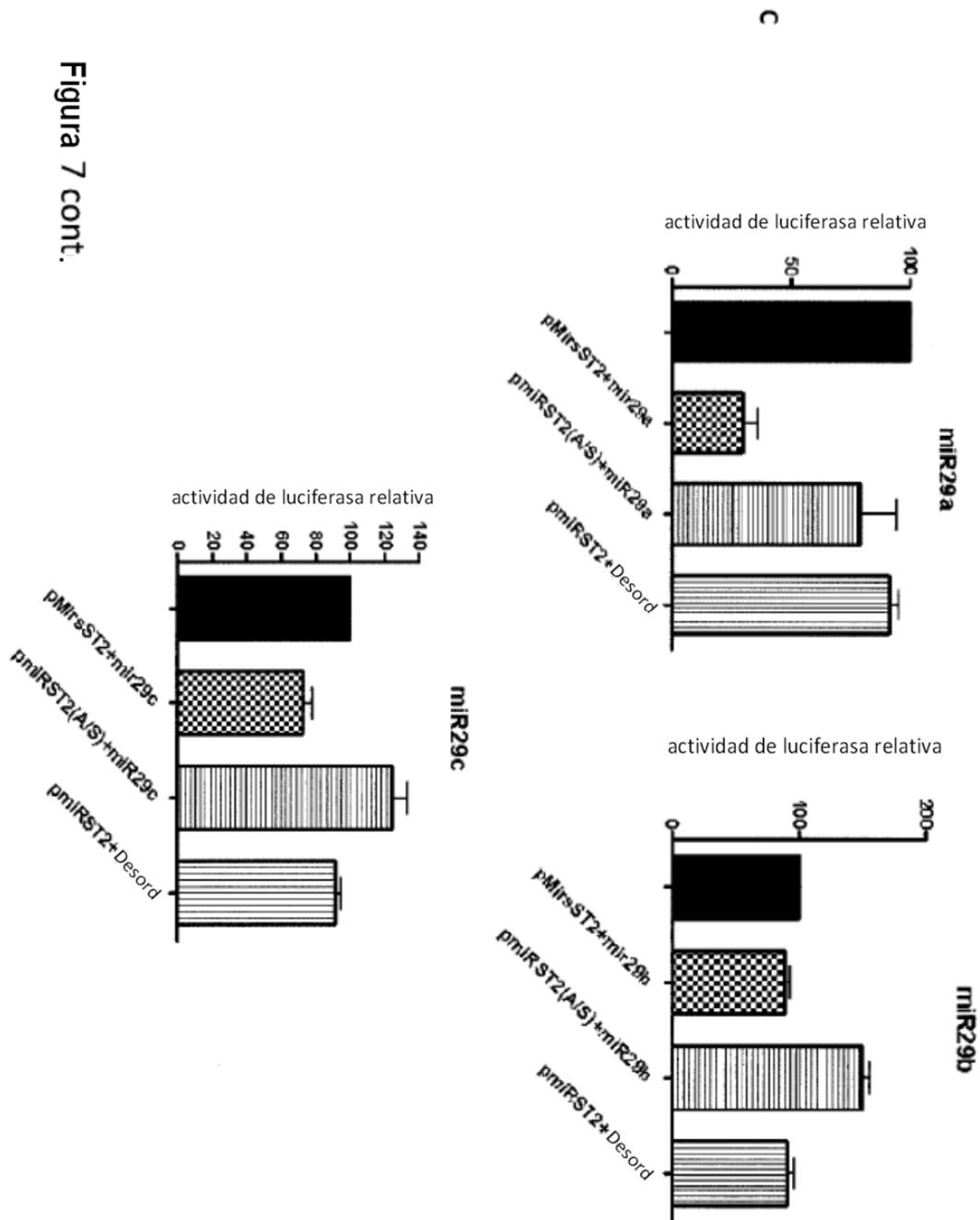


Figura 7 cont.

Figura 7 cont.

D

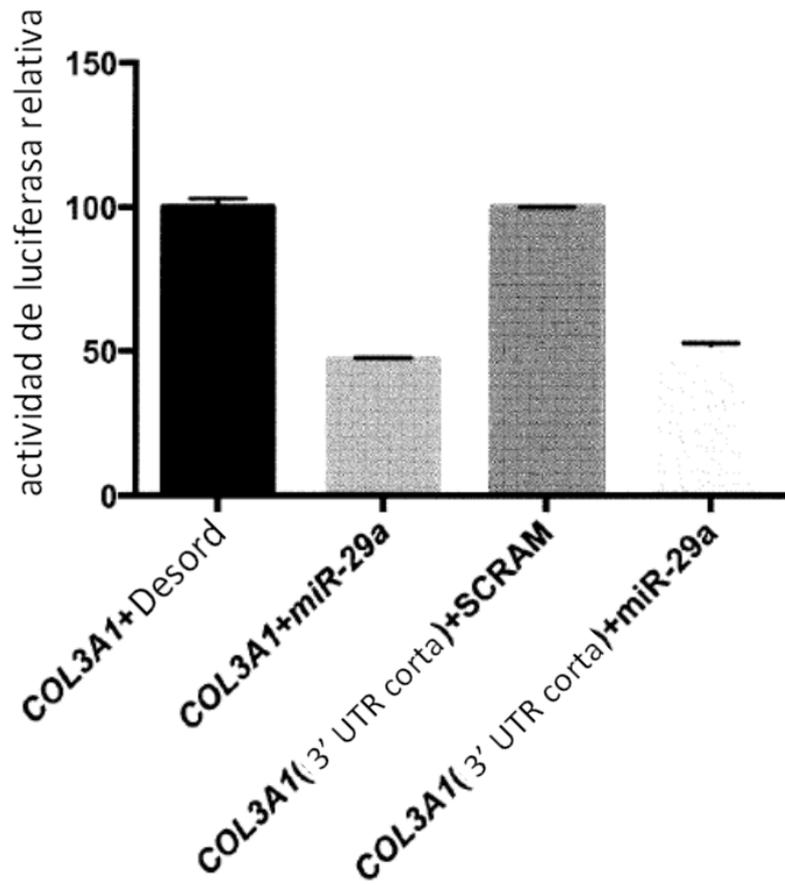




Figura 8

